

ГОУ ВПО РОССИЙСКО-АРМЯНСКИЙ (СЛАВЯНСКИЙ) УНИВЕРСИТЕТ

Составлен в соответствии с государственными требованиями к минимуму содержания и уровню подготовки выпускников по указанному направлению 06.05.01. Биотехнология и биоинформатика и Положением «Об УМКД РАУ».



УТВЕРЖДАЮ:

Директор А.А. Аракелян

«24» 06 2021г.

протокол № 5

Институт: Биомедицины и Фармации

Кафедра: Биотехнологии, биоинформатики и молекулярной биологии

Специальность: 06.05.01. Биотехнология и биоинформатика

АВТОР: к.б.н. Цаканова Гоар Васильевна

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС**

Дисциплина: Белковая инженерия и нанобиотехнология

ЕРЕВАН

**Аннотация:** Программа “Белковая инженерия и нанобиотехнологии” имеет междисциплинарный характер. Являясь фундаментальным направлением, белковая инженерия имеет решающее значение в развитии биотехнологии. Белковая инженерия изучает теоретические основы и методы применения генетического материала, что, в свою очередь имеет обширное прикладное значение, так как позволяет построить рекомбинантные молекулы ДНК и генетически модифицированные организмы путем усовершенствования штам-продуцентов и создания совершенно новых уникальных технологий получения ценных продуктов.

Программу планируется осуществлять при помощи лекций, семинаров, аудиторских курсов интерактивного характера, самостоятельных работ, самостоятельных творческих работ, направленных на решение конкретных задач, подготовок и презентаций докладов по материалам литературы и практических занятий. Знания студентов в течение программы планируется проверять при помощи контрольных работ, собеседований, рефератов, курсовых работ и экзаменов.

Дисциплина состоит из двух отдельных, но, тем не менее, тесно связанных разделов – “Белковая инженерия” и “Нанобиотехнологии”.

Раздел “Белковая инженерия” охватывает следующие вопросы: Введение; История основания белковой инженерии; Основные функции белков; Структура и функции белковых молекул; *In vitro* построение белков; Рациональный дизайн и редизайн белковых молекул; Направленная эволюция белков; Биохимия белковых молекул; *In vivo* построение белков; Достижения белковой инженерии; Применение белковой инженерии для поиска полипептидов, соответствующих современным требованиям биотехнологии.

Раздел “Нанобиотехнологии” охватывает следующие вопросы: Введение; Основные понятия и определения наук о наносистемах и нанобиотехнологий; История возникновения нанобиотехнологий у наук о наносистемах; Междисциплинарность и мультидисциплинарность; Структурные и функциональные аспекты нанобиотехнологии. Нанообъекты и наносистемы, их особенности и технологические приложения; Объекты и методы нанобиотехнологий; Биофункционализация наноматериалов. Особенности физических взаимодействий на наномасштабах; Основные принципы формирования наносистем; Физические и химические методы в нанобиотехнологии; Методы получения нанообъектов «сверху — вниз»; Методы получения нанообъектов «снизу — вверх»; Классификация наночастиц и нанообъектов; Примеры молекулярного моделирования наноструктур, молекулярных переключателей, белков, биомембран, ионных каналов, молекулярных машин; Методы исследования и диагностика нанообъектов и наносистем; Использование белков и пептидов для решения задач нанобиотехнологии; Использование полисахаридов в качестве нанобиоматериалов; Наноструктуры, образуемые липидами, биомембраны; Активный центр фермента как функционализированная наночастица и наномашина; Применение вирусных структур как инструментов нанотехнологий; Размерные эффекты в нанодиапазоне в белковом катализе; Нанобиоаналитические системы; Биосенсоры;

Нанобиобезопасность; Митотехнологии; Применение нанотехнологий в медицине; Принципы и перспективы развития нанобиотехнологий.

**2. Требования к исходным уровням знаний и умений студентов:** В основе данной дисциплины лежат знания в области экспериментальных методов биоорганической химии, физической биохимии, метаболической биохимии, генетической инженерии, микробиологии, прикладной молекулярной биологии, биотехнологии, биофизики, которые студенты получили в предыдущих этапах учебного процесса.

**3. Цель и задачи дисциплины:**

**Цель:** Целью дисциплины “Белковая инженерия и нанобиотехнологии” является ознакомить будущих исследователей с современными методами изучения структуры у функции белков, основами механизмов переноса генетического материала на молекулярном и клеточном уровнях, методам изменения генетического материала, направленного изменения аминокислотной последовательности белковых молекул и построения трансгенных организмов с требуемыми свойствами.

**Задачи лабораторных работ:** Характеристика пептидов и белков по их структуре и свойствам; Изучение форм белок-белок взаимодействий и факторов, влияющих на них; Изучение белковых структур; Ознакомление с методами нанобиотехнологии; Методы исследования белков и биологических наночастиц.

**4. Требования к уровню освоения содержания дисциплины**

*После прохождения дисциплины студент должен:*

- **знать:** Основы, принципы, методы и области применения белковой инженерии и нанобиотехнологии.
- **уметь:** Представить основные принципы и этапы методов и возможности применения белковой инженерии и нанобиотехнологии; Выбрать конкретный метод белковой инженерии и нанобиотехнологии для осуществления поставленной задачи.
- **владеть:** Основными принципами, знаниями и методами белковой инженерии и нанобиотехнологии.

**5. Объем дисциплины и виды учебной работы по рабочему учебному плану**

Виды учебной работы	Всего часов	Количество часов по семестрам							
		— сем.	— сем.	— сем.	— сем.	— сем.	— сем.	9 сем.	сем.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I. Общая трудоемкость изучения дисциплины по семестрам, в т. ч.:	108							108	
I.1. Аудиторные занятия, в т. ч.:	90							90	
I.1.1. Лекции	18							18	

1.1.2. Практические занятия тренингового типа, в т. ч.	54							54	
1.1.2.1. Обсуждение прикладных проектов (с защитой тезисов)									
1.1.2.2. Кейсы (анализ практич. ситуаций)									
1.1.2.3. Деловые игры, тренинги (а также ролевые игры, имитация ситуаций)									
1.1.3. Семинары (а также групповые обсуждения)									
1.1.4. Лабораторные работы (практич. эксперименты, демонстрац. опыты)	18							18	
1.1.5. Другие виды аудиторных занятий: Моделирование игрового взаимодействия (компьютерный тренажер)									
1.2. Самостоятельная работа	18							18	
2. Консультации									
3. Письменные домашние задания									
4. Контрольные работы									
5. Курсовые работы									
6. Эссе и рефераты									
7. Расчетно-графические работы									
8. Другие методы и формы занятий **									
9. Форма текущего контроля: Устный опрос на семинаре и тестирование умений									
10. Форма промежуточного контроля: 3 письменных контрольных по темам									
11. Форма итогового контроля:								Зачет	

### 6. Методика формирования итоговой оценки

Распределение весов по формам контроля и оценки академической успеваемости

	Вес формы текущего контроля в результирующей оценке текущего контроля	Вес формы промежуточного контроля в итоговой оценке промежуточного контроля	Вес итоговых оценок промежуточных контролей в результирующей оценке промежуточного контроля	Вес оценки посещаемости, результирующей оценки промежут. контролей и оценки итог. контроля в результирующей оценке

Вид учебной работы/контроля							Итогового контроля
	M1 <sup>1</sup>	M2	M3	M1	M2	M3	
Контрольная работа						0.5	
Тест							
Курсовая работа							
Лабораторные работы							
Письменные домашние задания							
Эссе (реферативного типа)			1				
Устный опрос (семинарс.)							
Реферат							
Вес результирующей оценки текущего контроля в итоговых оценках промежут. контролей						0.5	
Вес итоговой оценки 1-го промежуточного контроля в результирующей оценке промежут. контролей							
Вес итоговой оценки 2-го промежуточного контроля в результирующей оценке промежут. контролей							
Вес итоговой оценки 3-го промежуточного контроля в результирующей оценке промежут. контролей т.д.						1	
Вес результирующей оценки промежуточных контролей в результир. оценке итогов. контроля							1
Экзамен/зачет (оценка итогового контроля)							0
	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$

**7. Содержание дисциплины:**

**7.1. Тематический план (Разделы дисциплины и виды занятий) по учебному плану:**

Разделы и темы дисциплины	Всего ак. часов	Лекции, ак. часов	Практ. занятия, ак. часов	Семинары, ак. часов	Лабор, ак. часов	Другие виды занятий,

<sup>1</sup> Учебный Модуль

						ак. часов
1	3=4+5+ 6+7+8	4	5	6	7	8
<b>Раздел 1. БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ</b>						
Общая характеристика белковой инженерии	3	1	2			
Структурно-функциональные особенности белков, пептиды	4	1	2		1	
Виды белок-белковых взаимодействий	4	1	2		1	
Структурно-функциональные особенности ферментов	4	1	2		1	
Принципы белковой инженерии	3	1	2			
Циклы белковой инженерии	3	1	2			
Методы белковой инженерии. Рациональный дизайн	3	1	2			
Методы рационального дизайна белков	4		3		1	
Методы белковой инженерии. Направленная эволюция белков	3		2		1	
Методы направленной эволюции белков	4		3		1	
Методы белковой инженерии. Направленный мутагенез	4	1	2		1	
Другие методы белковой инженерии	3		2		1	
Применение белковой инженерии	3		2		1	
<b>Раздел 2. НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ</b>						
Фундаментальные основы нанобиотехнологий	3	1	2			
Структурные и функциональные аспекты нанобиотехнологии	4	1	2		1	
Основные направления исследований нанобиотехнологий	3	1	2			
Методы исследования и диагностика нанобъектов и наносистем	4		3		1	
Нанопроизводство	4	1	2		1	
Особенности физических взаимодействий на наномасштабах	4	1	2		1	
Использование белков и пептидов для решения задач нанобиотехнологии	4	1	2		1	
Использование других клеточных компонентов в качестве нанобиоматериалов	4	1	2		1	
Применение нанобиотехнологий	3	1	2			
Доставка биоактивных соединений (БАС) при использовании нанопереносчиков	4		3		1	
Биосенсоры, биочипы	4	1	2		1	
Углеродные наноструктуры. Общая характеристика.	4	1	2		1	

Получение. История открытия.						
Физико-химические свойства						
Итого	90	18	54		18	

## 7.2. Содержание разделов и тем дисциплины:

### Раздел 1. БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

**Тема 1.1. Общая характеристика белковой инженерии.** Введение в белковую инженерию. Основы белковой инженерии. Основные понятия. История формирования и развития. Динамика развития. Развитие белковой инженерии на всемирном рынке. Основные группы белков.

**Тема 1.2. Структурно-функциональные особенности белков, пептиды.** Аминокислотный состав белков, аббревиатуры. Структурные уровни белков – первичные, вторичные, третичные и четвертичные структуры. Механизмы формирования пространственной структуры белков. Самоорганизация макромолекулярных комплексов. Структурно-функциональные особенности белков. Особенности формирования пептидов. Виды пептидов.

**Тема 1.3. Виды белок-белковых взаимодействий.** Виды белок-белковых взаимодействий в условиях *in vivo* и *in vitro*. Формирование гомо- и гетероолигомеров. Двухгибридный анализ /скрининг/, варианты двухгибридных систем, преимущества и недостатки данного метода.

**Тема 1.4. Структурно-функциональные особенности ферментов.** Характеристика ферментов. Структурно-функциональные особенности ферментов. Внутриклеточная локализация ферментов. Каталитические свойства ферментов. Функциональные части ферментов. Классификация ферментов. Основные виды ферментов. Значение ферментов в биологических процессах, в экономике и промышленной сферах.

**Тема 1.5. Принципы белковой инженерии.** Свойства белков, лежащих в основе белковой инженерии. Активность белков как важнейший аспект белковой инженерии. Увеличение термостабильности белков как самое распространенное направление белковой инженерии. Достижения в области стабилизации белков в растворителе. Роль органических растворителей в белковой инженерии. Роль субстратной специфичности в белковой инженерии.

**Тема 1.6. Циклы белковой инженерии.** Особенности этапов белковой инженерии. Взаимосвязь этапов белковой инженерии. Селекция соответствующего гена, кодирующего необходимый белок. Выбор соответствующих методов белковой инженерии и мутагенеза. Селекция наилучшего варианта из полученных вариантов с необходимыми свойствами.

**Тема 1.7. Методы белковой инженерии. Рациональный дизайн.** Принцип рационального дизайна. Основная характеристика рационального дизайна. Этапы рационального дизайна. Кристаллизация белков. Моделирование белков. Мутагенез белков. Цикл рационального дизайна.

**Тема 1.8. Методы рационального дизайна белков.** Селекция пространственной структуры белков. Сопоставление обратного дизайна белков. Дизайн поверхности белкового глобула. Химическая модификация белков, полученных путем

направленного мутагенеза. Инженерия белковых поверхностей. Применение полусинтетических полипептидов. Лигация синтезированных белков. Лигация синтезированных белков при помощи протеолитических ферментов.

**Тема 1.9. Методы белковой инженерии. Направленная эволюция белков.** Принцип направленной эволюции белков. Основная характеристика направленной эволюции белков. Этапы направленной эволюции белков. Различия и сходства природной и направленной эволюции. Циклы направленной эволюции белков. Применение мутагенеза, селекции и рекомбинации в направленной эволюции белков.

**Тема 1.10. Методы направленной эволюции белков.** Комбинированные клонотеки нуклеиновых кислот. Введение случайных мутаций. Кассетный мутагенез. Аланиновое сканирование. Химический мутагенез. Синтез ДНК с ошибками. Скрининг генов и селекция генов с необходимыми свойствами. Случайный скрининг. Облегченный скрининг. Поиск и селекция. Фазовый дисплей.

**Тема 1.11. Методы белковой инженерии. Направленный мутагенез.** Суть направленного или сайт-специфического мутагенеза. Основные принципы. Этапы направленного мутагенеза. Применение мутантных олигонуклеотидов.

**Тема 1.12. Другие методы белковой инженерии.** Пептидомиметика. *In vitro* системы белковой эволюции. MolCraft. Перегруппировка ДНК. Библиотеки клеточных поверхностей с сортировкой клеток, активируемых флуоресценцией (FACS). Проточная цитометрия. Неклеточные трансляционные системы. Зеленый флуоресцентный белок. QSAR методы, основанные на рецепторах. Механическая инженерия эластомерных белков. Лигация Штудингера. Компьютерные методы. *De novo* инженерия ферментов.

**Тема 1.13. Применение белковой инженерии.** Важность применения белковой инженерии. Необходимость применения белковой инженерии в 21-ом веке. Области применения белковой инженерии. Применение в пищевой промышленности и промышленности моющих средств. Применение в окружающей среде. Применение в медицине. Применение в продукции биополимеров. Применение в нанобиотехнологии. Применение белковой инженерии с разными редокс белками и ферментами. Другие области применения белковой инженерии.

## **Раздел 2. НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ**

**Тема 2.1. Фундаментальные основы нанобиотехнологий.** Основные понятия и определения наук о наносистемах и нанотехнологий. История возникновения нанотехнологий и наук о наносистемах. Междисциплинарность и мультидисциплинарность. Примеры нанообъектов и наносистем, их особенности и технологические приложения. Объекты и методы нанотехнологий.

**Тема 2.2. Структурные и функциональные аспекты нанобиотехнологии.** Нанообъекты и наносистемы, их особенности и технологические приложения; Объекты и методы нанобиотехнологий; Биофункционализация наноматериалов. Классификация нанообъектов. Нанокристаллы. Полимерные мицеллы. Нанокластеры.

**Тема 2.3. Основные направления исследований нанобиотехнологий.** Физико-химические исследования поверхностей биологических объектов на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Исследование механических и электрических



свойств одиночных молекул нуклеиновых кислот и белков. Визуализация структуры и динамики отдельных молекул в биологических системах. Создание молекулярных транспортных систем для направленной доставки биомолекул и биоактивных соединений в клетки-, ткани-, и органы-мишени. Синтез биосовместимых материалов, разработка технологии синтеза материалов путем использования ДНК - и неорганических наночастиц, применение нанотехнологий для усовершенствования методов и подходов генной инженерии.

**Тема 2.4. Методы исследования и диагностика нанобъектов и наносистем.** Электронная микроскопия. Электронная томография. Электронная спектроскопия. Дифракционные методы исследования. Оптические и нелинейно-оптические методы диагностики. Особенности конфокальной микроскопии. Оптическая микроскопия. Применение лазерной сканирующей зондовой микроскопии в нанотехнологиях.

**Тема 2.5. Нанопроизводство.** Электромеханические системы. BioMEMS/NEMS. Биотехнологические и биомедицинские микросистемы. Нанобиологические системы.

**Тема 2.6. Особенности физических взаимодействий на наномасштабах.** Основные принципы формирования наносистем. Физические и химические методы в нанобиотехнологии. Методы получения нанобъектов «сверху — вниз». Методы получения нанобъектов «снизу — вверх». Классификация наночастиц и нанобъектов. Примеры молекулярного моделирования наноструктур, молекулярных переключателей, белков, биомембран, ионных каналов, молекулярных машин.

**Тема 2.7. Использование белков и пептидов для решения задач нанобиотехнологии.** Биологические моторы. Миозин. Кинезин. Динеин.

**Тема 2.8. Использование других клеточных компонентов в качестве нанобиоматериалов.** Наноструктуры, образуемые полисахаридами, липидами. Биомембраны. Активный центр фермента как функционализированная наночастица и наномашина. Применение вирусных структур как инструментов нанотехнологий. Размерные эффекты в нанодиапазоне в белковом катализе; Нанобиоаналитические системы; Биосенсоры; Нанобиобезопасность; Митотехнологии;

**Тема 2.9 Применение нанобиотехнологий.** Наномшины. Биомолекулярные моторы. Нейромашинный интерфейс. Исследование ДНК. Наномеханические осцилляторы. Сканирующие приборы. Нанобиосенсоры, биочипы. Интеллектуальные системы доставки лекарств. Наноплюидика. Наномедицина. Доставка лекарственных веществ. Новые методы и средства лечения на нанометровом уровне. *In vivo* и *in vitro* диагностика. Медицинские имплантаты.

**Тема 2.10. Доставка биоактивных соединений (БАС) при использовании нанопереносчиков.** Полимерные наночастицы. Липосомы и родственные структуры. Керамические наночастицы. Металлические наночастицы. Углеродные наноматериалы. Дендримеры.

**Тема 2.11. Биосенсоры, биочипы.** Типы биосенсоров. Области применения биосенсоров. Структура биосенсоров. Общие принципы работы биосенсоров. Биосенсоры на основе ферментов и электрохимических преобразователей, биохимические сенсоры. Имобилизация ферментов в биосенсорах. Магнитный биосенсор.

**Тема 2.4. Углеродные наноструктуры. Общая характеристика. Получение. История открытия. Физико-химические свойства. Фуллерены. Производные фуллеренов. Тубулены. Дендримеры. Применение углеродных наноструктур в биологии и медицине.**

### 7.3 Примерные темы контрольных работ

1. Этапы белковой инженерии
2. Рациональный дизайн белков
3. Кристаллизация белков
4. Рентген-структурный анализ белков
5. Моделирование белков
6. Мутагенез белков
7. Химическая модификация белков
8. Инженерия белковых поверхностей
9. Направленная эволюция белков
10. Комбинированные клоноутеки нуклеиновых кислот.
11. Скрининг генов и селекция генов с необходимыми свойствами.
12. Фазовый дисплей.
13. Пептидомиметика.
14. *In vitro* системы белковой эволюции.
15. Библиотеки клеточных поверхностей с сортировкой клеток, активируемых флуоресценцией (FACS).
16. Неклеточные трансляционные системы.
17. QSAR методы, основанные на рецепторах.
18. *De novo* инженерия ферментов.
19. Нанообъекты и наносистемы
20. Нанокристаллы. Полимерные мицеллы. Нанокластеры.
21. Методы исследования нанообъектов и наносистем
22. Методы получения нанообъектов «сверху — вниз» и «снизу — вверх».
23. Биологические моторы
24. Применение вирусных структур как инструментов нанотехнологий
25. Биосенсоры, биочипы
26. Нанобиобезопасность
27. Наномашины
28. Нейромашинный интерфейс
29. Сканирующие приборы
30. Нанофлюидика
31. Доставка лекарственных веществ

### 8. Учебно-методическое обеспечение дисциплины

#### 8.1. Рекомендуемая литература:

1. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. *Наука*, Москва, 2004, Т.1, 530 с.
2. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. *Сиб. унив. изд-во*, Новосибирск, 2004, 2-е изд., 496с.

3. Boyajyan A.S. Biosensors. Lecture notes. Institute of Molecular Biology NAS RA. Yerevan, 2014, 32 pages.
4. G. Tsakanova, E. Arakelova, A. Melkonyan. Proteomics (In Armenian). Publisher. Elen Print. 2018. 165 pp.
5. G. Tsakanova, A. Boyajyan. Protein engineering (In Armenian). Lecture notes. Publisher "Science" NAS RA, Armenia. 2015. 50 pp.
6. Alvizo O, Allen BD, Mayo SL. Computational protein design promises to revolutionize protein engineering. *Biotechniques*. 2007; 42(1): 31, 33, 35 passim.
7. Baker M. Protein engineering: navigating between chance and reason. *Nat Methods*. 2011 28; 8(8): 623-626. doi: 10.1038/nmeth.1654.
8. James A. Brannigan & Anthony J. Wilkinson. Protein engineering 20 years on. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002. 3(12), 964-970.
9. Just W. Protein engineering. *FEBS Lett*. 2014 21; 588(2): 205. doi: 10.1016/j.febslet.2013.12.001. Epub 2013 Dec 7.
10. Kazlauskas RJ, Bornscheuer UT. Finding better protein engineering strategies. *Nat Chem Biol*. 2009; 5(8): 526-529. doi: 10.1038/nchembio0809-526.
11. Leisola M, Turunen O. Protein engineering: opportunities and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 75(6): 1225-1232.
12. Lluís MW, Godfroy JI 3rd, Yin H. Protein engineering methods applied to membrane protein targets. *Protein Eng Des Sel*. 2011; 26(2): 91-100. doi: 10.1093/protein/gzr079.
13. Muir TW, Sondhi D, Cole PA. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(12): 6705-6710.
14. Ordu EB, Karagüler NG. Protein engineering applications on industrially important enzymes: *Candida methylica* FDH as a case study, Protein Engineering, Edited by Pravin Kaumaya. 2012. ISBN: 978-953-51-0037-9, InTech, DOI: 10.5772/26675.
15. Rubingh DN. Protein engineering from a bioindustrial point of view. *Curr Opin Biotechnol*. 1997; 8(4): 417-422.
16. Rubingh DN, Grayling RA. Protein engineering. In Biotechnology. EOLSS, UN. Vol. III.
17. Singh RK, Tiwari MK, Singh R, Lee JK. From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(1): 1232-1277. doi: 10.3390/ijms14011232.
18. Turanli-Yildiz B, Alkim C, Cakar ZP. Protein engineering methods and applications. In Protein Engineering. Edited by Pravin Kaumaya 2012. ISBN: 978-953-51-0037-9. InTech, DOI: 10.5772/27306.
19. Walsh G. Proteins: biochemistry and biotechnology. John Wiley & Sons, Inc. 2002.
20. Woodley JM. Protein engineering of enzymes for process applications. *Curr Opin Chem Biol*. 2013; 17(2): 310-316. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.03.017.

#### б) Другие источники

Электронная библиотека (комплект научных, учебных и методических материалов на компьютерных носителях, набор автоматизированных тестов, развивающих игр, виртуальных тренажеров).

Видеотека (комплект видеозаписей на кассетах и дисках: игровые и рисованные фильмы и смонтированные фрагменты из них, научно-популярные и учебные программы).

#### 8.2. Материально-техническое обеспечение дисциплины

Компьютер.

Интернет.  
Компьютерный проектор.