

363408

亚分子生物学导论

A. 圣乔其 著

科学出版社

6
24

亚分子生物学导论

A. 圣乔其 著

林克椿 译

科学出版社

, 1965

404808

ALBERT SZENT-GYÖRGYI

INTRODUCTION TO A SUBMOLECULAR BIOLOGY

Academic Press Inc.

New York, 1960

內 容 簡 介

本书是作者在前一本著作“生物能力学”中所提出的基本概念的发展。在前一本书中强调的是激发态的作用,在这本书中则着重指出“电荷迁移络合物”在生物体内能量传递现象中的意义。虽然重点不同,但中心思想是一贯的,这就是生物体内的能力学过程必需利用量子力学的概念和方法才能深刻理解。换句话说,作者在这二本书中提出了“量子生物学”的基本思想。各国学者对于 A. Szent-Györgyi 通过这些著作所提出的富于创造性的见解在近年来对于量子生物学的逐渐形成和发展中所起到的推动作用给予很高的评价。

本书的前半部用通俗的语言叙述了电荷迁移络合物的基本概念及其在能量传递中的意义。在后半部,作者试图从这一基本概念出发来探讨一些实际问题,诸如药物作用、ATP、胸腺等。

本书可供生物物理学、生物化学、理论物理学和医学研究工作者参考之用。

亚分子生物学导论

A. 圣乔 著

林 克 椿 译

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街117号

北京市书刊出版业营业许可出字第061号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1965年1月第一版 开本: 850×1168 1/32

1965年1月第一次印刷 印张: 2 3/4

印数: 0001—3,250 字数: 69,000

统一书号: 13031·2067

本社书号: 3169·13—10

定价: [科七] 0.50 元

略 写 符 号

~ 高能鍵(主要是磷酸鍵)

A 接受体

ADP 二磷酸腺甙

AMP 一磷酸腺甙

ATP 三磷酸腺甙

D 給予体

DPN 二磷酸吡啶核甙酸

EA 电子亲合势

EV 电子伏特

ESR 电子自旋共振

FAD 黄素腺嘌呤二核甙酸

FMN 黄素单核甙酸

IP 电离势

IR 紅外線

P 磷酸根

TPN 三磷酸吡啶核甙酸

UV 紫外綫

目 次

略写符号	v
------	---

第一部分 一般概念

1. 引言	1
2. 为什么提出亚分子生物学? 問題的提出	5
3. 生命的能量循环	9
4. 单位与度量	15
氧化还原势	15
电离势与电子亲合势	17
軌道能	20
5. 电子活动性	29
电磁偶合, 能量的共振轉移	30
半导体性	31
电荷传递	33
6. 电荷传递的問題	40
7. 电荷传递的三个例子	45
醌-氫醌	45
核黄素 (FMN) 与血清素	50
皮質酮 I ₂	55
8. 雜記	58
水	58
离子	60
因光异色現象	62

第二部分 問題与研究途径

9. 論葯物作用的机制	66
-------------	----

10. 論 ATP	71
11. 論胸腺的化学	74
12. 活态	76

第一部分 一般概念

1. 引言

研究工作的基本构思是由推理、測量和計算的綫索交織而成的。

这本小册子是我所写“生物能力学”^[1]一书的化身,那本书不外乎是一种設想。因此,当我知道它已經被苏联科学院譯成俄文,并且知道其引言是由苏联科学界的第一流人物 A. Теренин 所撰写时,我感到非常惊讶。二年以后,在 1959 年的秋天,原子能委员会在布鲁克哈文 (Brookhaven) 組織了一次有关“生物能力学”的討論会,这次会议使得生物能力学成为含义比較明确的一个研究領域。

1957 年以后,我的思想漸趋定型,尽管我还不能提出最后的答案,我至少可以比較合理地提几个根据測量、推理和計算而得到的問題。虽然如此,我在出版这本书时也并不是毫无顧慮的,不知道这本书是否会是我屢次被迫轉行到不熟悉的領域的最后一个例子。这种情况已經重复出現了好几次。我最初从事于組織学的研究。由于不滿足于細胞形态学所能給我的有关生命的知識,我就轉向生理学。发现生理学太复杂了,我又去从事藥理学的研究,藥理学中有一样东西——藥物的性質是比較簡單的。后来发现情况仍然太复杂,我又轉向細菌学。当我发现細菌学也太复杂时,我只好退回到分子水平,学起化学和物理化学来。有了这些体验之后,我着手进行了肌肉的研究。做了二十年工作后,我得到一个

^[1] “Bioenergetics”, Academic Press, New York, 1957. (中譯本:“生物能力学”,科学出版社,1962)

結論，這就是：要懂得肌肉，必須要退回到電子水平，它的規律性是受波動力學所支配的。因此在這裡我又一次被迫轉入到我根本不懂的一個領域。在以往每次改變專業時，我總希望能掌握這門學科。對量子力學來說，情況就不同了。這就是我產生顧慮的原因。

我提到我的個人經歷，並不是因為它本身有什麼重要意義。我提到它是因為它涉及到一個非常重要的問題：由於生物學家們不熟悉量子力學的錯綜複雜內容，他們是否因此就可以迴避這個電子領域呢？目前既掌握生物學又掌握量子力學的人是極少的。也許這個數目永遠也不會很大，因為人的壽命和精力都是有限的。這兩門學科都需要全部智力和整個一生的時間才能精通。因此，至少在目前，需要相互滲透才能有所發展。

按我的看法，至少在一個時期內，最好的解決辦法不是讓生物學家轉行到物理學中，或者反過來，讓物理學家轉行搞生物學，而是在於生物學家和物理學家的共同協作。為此，就沒有必要讓生物學家熟悉波動力學的錯綜複雜內容。和物理學家建立一種共同語言、直觀地掌握一些量子力學的基本概念和它的应用限度、能向物理學家提出問題，並且懂得他的回答是什麼意思，這就已經夠了。與此相似，物理學家與其變成一個第二流的生物學家，還不如留在他自己學科那一邊。舉例來說，作為一個生物學家，如果我对一種物質的能級發生了興趣，並且有人告訴我說一物質的最高軌道的 K 值比如說是 0.5，我就可以從這一點出發開始研究。對我來說，知道 $K = 0.5$ 表示什麼意思就夠了，我沒有必要確切地了解這個數值是怎么得來的。換過來說，我能提出一些物質來引起物理學家的注意，這些物質的 K 值也許具有特殊的重要性。

對那些想在物理學問題中冒一番風險的生物學家，我只想提出一點勸告。物理學和生物學有一個根本的不同點。物理學是研究可能事件的學科。如果有一種過程有 999 次是以某種方式發生，而只有 1 次是以另一種方式發生時，物理學家就會毫不猶豫地認為第一種方式就是唯一的方式。生物學是研究不象會有的事件

的学科,而且我认为,从原则上說,机体是仅以統計学上不象会发生的反应为基础而工作着的。假如代謝是由一系列可能的、而且从热力学来看能自动发生的反应所組成,那么我們就会被烧毁,机器就会停下来,就象钟表失去了調节一样。由于反应在統計学上是不象会发生的,而且要有特殊訣窍才能使其发生,因此才有可能掌握这些反应,而这些特殊訣窍就可以作为調节之用。因此对活的机体來說,看来仿佛不象会发生的——或者至少对物理学家來說不可能的——反应却是有可能发生的。当图騰(Tutankhamen)*的坟墓被发掘出来时,发现他的早餐在經過 3000 年之后还没有被氧化掉。这代表一种物理学的可能事件。假如这位皇帝起来并吃掉了他的供餐,那么它就会立即被烧毁。这是一种生物学的可能事件。这位皇帝本身一定曾經是由非常复杂而且高度有序的由原子核和电子所組成的一种結構,其統計几率接近于零。我的意思并不是說生物学反应不遵从物理学規律。在最后这个例子中,必須由物理学来解释这些生物学反应,但也只能拐弯抹角地加以解释,初看起来这种解释好象完全没有可能似的。如果大自然想做什么,它一定会找到如何去做的一条途径,只要这条途径不违反自然界的基本規律就行。它是有时間去这样做的¹⁾。

这一切都使得物理学家和生物学家之間的关系很难处理。生物学家要依靠物理学家所作出的判断,但当他听到說这件事或那件事不象会发生时,他一定要謹慎一些。要是我过去經常接受物理学家所下的“不可能”的判断,我一定早就放弃我在这方面的研究了。我很庆幸我没有这样做。每个人都可以从一个不正确的理論学习到一个正确的理論,因为正确的理論固然可以引导出新的展望和富于启发性的实验,但是不正确的理論却多半为了挽救它們的創始人而能产生出新的理論来。

自从我不断地工作在目前这一行以来,一切都使我更感兴趣。

* 图騰是紀元前十四世紀初期埃及的法老,其墓于 1922 年被发现——譯者注。

1) 生物界还常常利用更复杂的系統来工作,这些系統比物理学家用来檢驗他的理論所用的系統要复杂得多。

甚至每天早晨我都比以往任何时候更渴望干到我的实验室去工作。

在这一行中进行探索的生物学家既不会无人支援，也不是没有令人鼓舞的先例的。C. A. Coulson 在“肿瘤研究进展”(“Advances in Cancer Research”, Academic Press, New York, 1953) 第一卷中写了一篇有关量子力学基本概念的、极为清楚的非数学的综述。在同一杂志的第三卷(1955)中，A. Pullman 与 B. Pullman 同样清楚地写了络合物指数的问题。喜欢读法文的人还可以找到这二位作者所写的“化学物质的致癌作用及其分子结构”一书(“Cancérisation par les substances chimiques et structure moléculaire”, Masson, Paris, 1955)。要了解详情和一些数学推演，可以读 B. Pullman 与 A. Pullman 的“有机化学的电子理论”一书(“Les théories électroniques de la chimie organique”, Masson, Paris, 1952)。另一种极端，也就是非常简单而通俗的梗概可在 B. Pullman 的“分子结构”(“La structure moléculaire”, Press Universitaires France, 1957)一书中找到。当然，书桌上不能没有 L. Pauling 的“化学键的本质”(“The Nature of the Chemical Bonds”, Cornell University Press, 1948) 和 Th. Förster 的“有机物质的荧光”(“Fluoreszenz Organischer Verbindungen”, Göttingen, 1951)。我们很迫切地等待其下一(英文)版的出现¹⁾。

我愿意提出 A. Pullman 与 B. Pullman 的大胆的开创性研究作为一个例子，说明在这一领域中的研究是会有成果的。他们从致癌的电子结构的研究开始，建立了电子结构与致癌能力之间的关系，这也許是有助于了解癌症的最重要步骤之一。如果说在我这本书中没有包括有关这一题目的一章，这只是因为 Pullman 他们自己已经总结过这项工作，不能比他们写得更清楚了。他们还在量子生物学的其它多方面做了一些工作，为许多重要的生物

1) 尽管已经有了这样一些值得称道的贡献，但很难否认仍然极其需要有一本主要为生物学家所写的、尽可能用非数学的语言的、内容广泛的最新著作。

催化剂确定了电子指数^[2-4],甚至还涉及到酶^[5]和高能磷酸键^[6]。

上面所举的这些例子可能会使对生物学有兴趣的物理学家感到鼓舞。我还可以引証 B. Commoner^[7-10]及其共同工作者在电子順磁共振方面的开创性研究来鼓励对亚分子现象有兴趣的生物学家。正是这项工作第一次用实验証明了 L. Michaelis^[11] 在其经典性研究中所指出的单电子酶促电子传递过程中有自由基参与这一論断的正确性。

2. 为什么提出亚分子生物学? 問題的提出。

从远一点来考虑,生物化学的历史似乎只是由一系列惊人成就、一大堆光荣事件累积起来似的。它的进展速率从未下降过,看来仿佛不久以后我們就可以把“不知”这个字眼从詞汇中取消了。那么,为什么在分子生物化学还没有发展到頂以前,又提出了“亚分子生物学”的問題?

对这些成就并没有什么怀疑。虽然如此,如果一个人不証自己被这些成就蒙蔽起来,而是用毫无偏見的眼光来探討生物化学,就会明显地看到在我們的知識中是有很大空白之处的。讓我們从代謝开始来考虑化学生物学中的几个主要問題。生物化学已經闡明了中間代謝的整个复杂过程,并且証明这一代謝的主要目的是

^[2] B. Pullman and A. Pullman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **44**, 1197, 1958.

^[3] B. Pullman and A. Pullman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **45**, 136, 1959.

^[4] B. Pullman and A. M. Perault, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **45**, 1476, 1959.

^[5] A. Pullman and B. Pullman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **45**, 1572, 1959.

^[6] B. Pullman, *Radiation Research*, 1960.

^[7] B. Commoner, J. Townsend, and G. E. Pake, *Nature* **174**, 689, 1954.

^[8] B. Commoner, J. J. Heise, B. B. Lippincott, R. E. Norberg, J. V. Passonneau, and J. Townsend, *Science*, **126**, 3263, 1957.

^[9] B. Commoner, B. B. Lippincott, and Janet V. Passonneau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **44**, 1099, 1958.

^[10] B. Commoner and B. B. Lippincott, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **44**, 1110, 1958.

^[11] Michaelis, *Fundamentals of Oxidation and Reduction*, In "Currents in Biochemical Research" D. E. Green (Ed.), Interscience Publ., New York, 1946.

使食物最終氧化，在氧化过程中，食物所儲存的能量被用来使一个磷酸根和 ADP 偶連，因而产生 ATP（图19）。在这过程中，食物的能量被轉換成一个特殊分子末端的“高能磷酸鍵”（ $\sim$ ）的能量，食物的能量只有在这种形式下才能成为活机器所需要的燃料，并使之开动起来。因此这种“氧化磷酸化作用”乃是代謝的中心問題，它的机制是完全不清楚的。

我們也同样不了解这一过程的逆过程，即 ATP $\sim$ 能量如何释放。这些 $\sim$ 如何推动着生命，其能量怎样轉換成各种形式的功 W ，不管是机械功、电功还是渗透功，我們都不知道，尽管这种轉換可能是生物学中最重要的問題。我們只是从生命的各种表現来理解生命，我們說的所謂“生命”，在很大程度上只是这些不同的 W 的有序的相互作用而已。自从一开始有人类以来，就是根据这些 W 之中少了一种来判断死亡的，这些 W 都以运动的方式表現其本身。我們不了解运动如何产生，化学能如何轉換成机械功。

生理学家已經証明人体的各种机能都受激素管制和調節，生物化学家还能很自豪地拿出一整排装着这些神秘的激素的瓶子来，里面装着的激素大都是极細的粉末状晶体，其中有一些还可以用合成法制备出来。各种維生素也是如此，它的种类已經快要找全了。生物化学家能为我們写出这些物質中絕大部分的結構式，但是真正使人感到興趣的問題并不在于这些物質是什么，而是在于它們干什么，它們如何在分子水平上起作用，以及怎样产生它們的作用。这个問題还没有答案。对大部分葯物來說也是如此。

至于活机器本身，生物化学家会告訴你，它的主要成分是蛋白質、核酸和核蛋白。他能指出对这些物質进行結構分析所取得的巨大进展，指明它們的組成单位是氨基酸和核甙酸，說明它們的連接方式和相对位置关系，还会談談鍵角、間距和所形成的各种螺旋。但是，假如我們問，为什么大自然要把这样大量的原子以这种特殊方式放置在一起，想使这些物質具有什么样的性質，那么我們的生物化学家就会沉默了。生命的基本原則之一是“組織性”，这意思就是說如果二种物質放置在一起，就会产生某种新的物質，其

性質不具有相加性，即不能用它的組成成分的性質來表示。不同程度和類型的組織性都是這樣，例如由電子和原子核組成原子、由原子組成分子、由氨基酸組成肽、肽組成蛋白質、蛋白質與核酸組成核蛋白等等都是如此。大自然在這樣做時想了些什麼，我們到目前甚至還不能猜測。因此在這裡我們也發現中心問題的大門還是鎖著的。

從各方面看都使人對這種現狀感到憂慮。首先是因為這些還沒有解決的問題都是生物學的中心問題。另外一個令人不安的事實是，和基礎知識的空白相對應，在醫學科學中也有一些空白，有許多“內源性”疾病或者“變性性”疾病仍然自由自在地到處肆虐著，引起無休止的疼痛。但是，最使人擔心的事實還是，儘管生物化學在已經有成就的那些領域中還在繼續發展著，而在上述尚未解決的問題方面實際上毫無進展。看來生物化學似乎可以分為兩部分：一部分是現在的生化所能解決的，另一部分是它所無能為力的。看來目前在我們的思路中有個很重要的、整個一大方面是被漏掉了，沒有它就不可能探討這些問題。

被漏掉的這一面究竟是什麼？這在作者的心目中是沒有疑問的。這件事很簡單，也很合乎邏輯。生物化學是在前一世紀末才發展起來的。那時人們認為物質由非常小的、不可分割的單位——原子——所組成。分子是這些原子的聚集体。已經發現大約有90種不同類的原子*，它們可以用不同的字母表示，它們之間的連接則用短橫表示。毫無疑問，這種由字母和短橫所組成的語言可以列為人類智慧的最大成就之一，並使生物化學在各个方面得到了驚人的成功。如果我們看一遍上面所提到過的問題就會發現，生物化學能有成就的是那些有關結構的問題，或者在比較簡單的反應中所發生的結構變化的問題，這些反應大部分都能在均勻溶液中被複製出來，而且可以用字母和短橫表示並得到解答。而到現在仍然不能解決的則是不能用這種語言表達的複雜系統的機能

* 目前已知的不同原子數已有102種——譯者注。

問題，例如，象肌肉收縮那么复杂的反应(其主要产物不是某种物质而是功 W)怎么能用这些字母和短横表达出来？

现代生物化学的语言仍然是字母和短横的语言，这表示这门学科还和前一世纪刚产生时一样，仍然在同一个分子领域内发展着。但自从那时起，它的母学科——化学——已经和物理学和数学结合在一起，渗入到一个新的领域，这就是亚分子或亚原子领域——电子领域，发生在这一领域中的事件已不再能用经典化学的方法描述，它的规律性是受量子力学或波动力学所控制的。从这门新学科的观点来看，原子不再是一个不可分割的单位，而是由核和外围形状可变的奇妙的电子云所组成，生命的微妙现象很可能就是由这些云的形变和分布所组成。

生物化学并没有随着它的母学科——化学——一同进入到这个可能掌握着了解微妙生物机能之钥的新的亚原子领域中来。可以用一个例子来说明这一点。图1的左边是以经典符号表示的DPN 吡啶端的经典式，它告诉我们，吡啶环由5个相同的C原子和带正电的N原子所组成。同一图的右边是 Pullman 等最近发表的同一种物质的“分子图”¹⁾。附注在每个原子旁的数字代表电荷之值。这些数字告诉我们每个原子带有不同的电荷，因此分子是被结构非常复杂的电子云所包围着的。正电荷不均匀地分布在环中的1个N原子和5个C原子上，而负电荷则被驱逐到侧链上。这

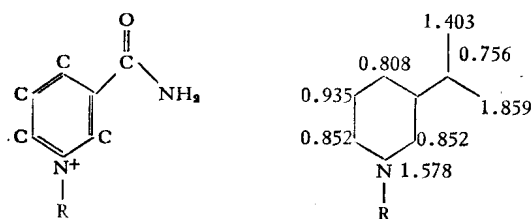


图1 DPN 吡啶端的经典式和分子图

1) 第5页参考文献[3].

个图还需要加上三套数值才算完全，一套给出环中各个原子的所谓“自由价”，另一套描述键的“键序”，第三套则给出“定域能”。經典式只能使我們了解整个分子的外形和偶极矩，而在分子图中，环里面的每个原子都表现出它自己的个性、輪廓和高度的特异性，而且整个結構也开始呈现出一种細微的差异，可以預料，参与生物学反应的任何結構都是具有这种細微差异的。

尽管原子和分子都已被揭示为复杂的小宇宙，但是“固体物理学”却打破了它們各自的严格的独立性。如果許多原子組成一个有規則的密集系統，就会有新的性質出現。例如大量的銅原子或鉄原子以一种特殊的秩序結合在一起，就会显示导电性。这是由于一个个单元的波动力学性質的相互作用而产生的一种整体性質，甚至大分子也可以产生固体性質。因此为了研究生物学的中心問題，有必要把我們的思路向二个相反的方向扩展，即既向亚分子方向也向超分子方向发展。从某种意义上說，这二者是相同的，因为超分子性質只是亚分子成分的集体效应而已，这就給“組織性”提供了又一个新的例子。与此相仿，当这些分子或分子聚集物和生命的一般間質——水——相互作用，并与其組成一个新的統一体系时，可以預料也一定会出現一些新的性質。对所有这些相互关系加以闡明最終將給我們一个“可塑性”的概念，对于研究生命和被称为“細胞”的独特系統的意义來說，这种概念也許是很必要的。

探索这些新領域將是一件很困难的事，我在本书中将要提出的許多概念看来可能是含糊的，而且是令人可疑的。未知的事物所能提供的立足点往往不太穩固。

3. 生命的能量循环

在开始研究时，最好先有一个总的概念。生命現象能力学的总概念是要考虑整个生命界，试图看出能量如何推动这个世界。此能量的最終来源是太阳輻射，这已經成为一种常識了。如果太阳所发射的一个光子和地球上的一个物質粒子相互作用，将会使

处于基态的一对电子之一上升到一个較高的空軌道上，如图 2. A 向上的箭矢所示。一般說来，电子在极短的一段时间之内又落回到它的基态能级，如图中向下的箭矢所示。生命就在这二个过程之間被推动，并使电子在生命本身的机构中降落，同时就利用了它的能量，如图 2. B 中的半圓所示。为了使这项工作能有效地进行，必須让电子和一种构造特殊的物质相遭遇（多半是叶绿素），这种物质应和一个系統偶合起来，而此系統又能够把活动性很大的电子激发能轉变为比較稳定的化学势，成为化学能，也就是成为一稳定物质的电子系統的能量。根据目前了解，这项工作在很大程度上是通过利用电子激发能使水(H_2O) 的組成元素分离而完成的¹⁾。

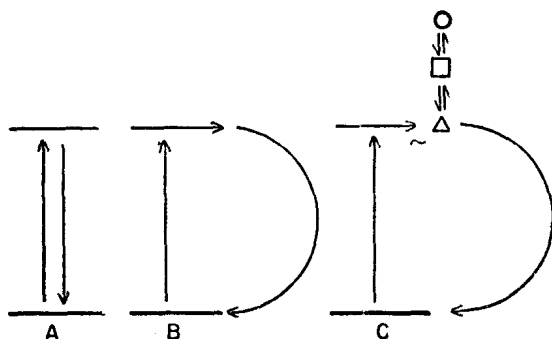


图 2 光合作用图示(見本文)

D. Arnon^[12] 等人的实验証明，O 以 O_2 的形式被送到大氣中，而 H 則和一个吡啶核甙酸 TPN^+ 或 DPN^+ 偶合，因而使它們还原为 $TPNH$ 或 $DPNH$ ，同时 ADP 和 P 組成为 ATP ，把一部分能量轉变为 ATP 的末端“~”。在图 2. C 中吡啶核甙酸用一个三角形表示，而在它上面的方框和圓是表示这样一个事实，即由于吡啶核甙酸和 ATP 不适于大量儲存能量，因此它們的能量可能要轉变为更便于儲存的其它能量形式。这是通过从大氣中吸收 CO_2 并使其还

1) 此处只考虑光合作用中的經典“开放”循环。关于比較简单的和“封閉”或循环問題請参閱 D. I. Arnon^[12] 文章。

[12] D. I. Arnon, *Nature*, **184**, 10, 1959.

原为碳水化合物和水来完成的,如图3左方所示,方框代表碳水化合物,圆代表脂肪。

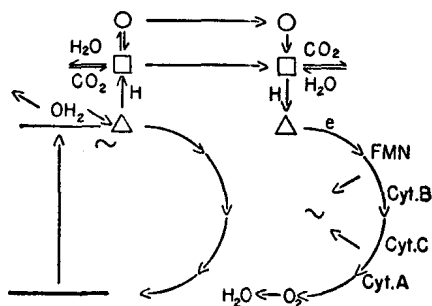


图3 光合作用图示(見本文)
△ TPN, DPN □ 碳水化合物 ○ 脂肪

做到上述这一切需要花不少时间,并且要在有一定体积的装置中完成,因此我们让植物去做这件事,然后吃掉这种植物,或者吃掉已经吃了这种植物的牛。取食这件事在图3中用水平的箭头表示,在同一图的右边,试图以一种简明而且形象化的方式表示我们用这些物质能做些什么。我们把碳水化合物的H原子大部分送回到吡啶核甙酸上,同时把C以 CO_2 的形式释放出来。Vennesland、Westheimer及其合作者们^[13,14]用同位素法确已证明,从代谢物上脱出的H就是和吡啶核甙酸结合的H。DPNH或TPNH又能使黄素单核甙酸(FMN)还原,但 FMNH_2 上的H就不是DPNH或TPNH上的H了,因此由这些物质向FMN迁移的很可能不是H而是电子,而且在试管实验中发现 FMNH_2 上的H可能来自到处都存在着的溶剂——水,带负电的FMN就从水中获得质子。Kosower^[15]等已经证明DPN是良好的电子给予体。

DPN⁺还原为DPNH需要一个H和一个电子。因此它可以

^[13] H. F. Fisher, E. E. Conn, B. Vennesland, and F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.*, **202**, 687, 1953.

^[14] F. A. Loewus, F. H. Westheimer, and B. Vennesland, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5018, 1953.

^[15] E. M. Kosower and P. E. Klinedinst, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 3493 and 3497, 1956.