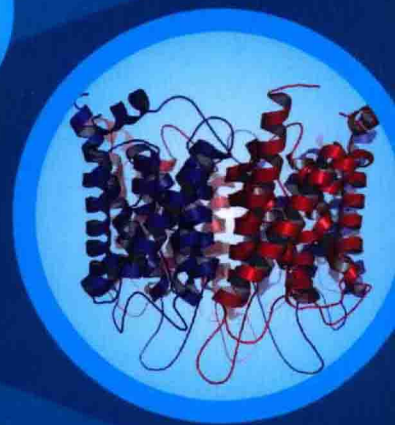


AQUAPORIN

水通道蛋白

主 编 靳世平



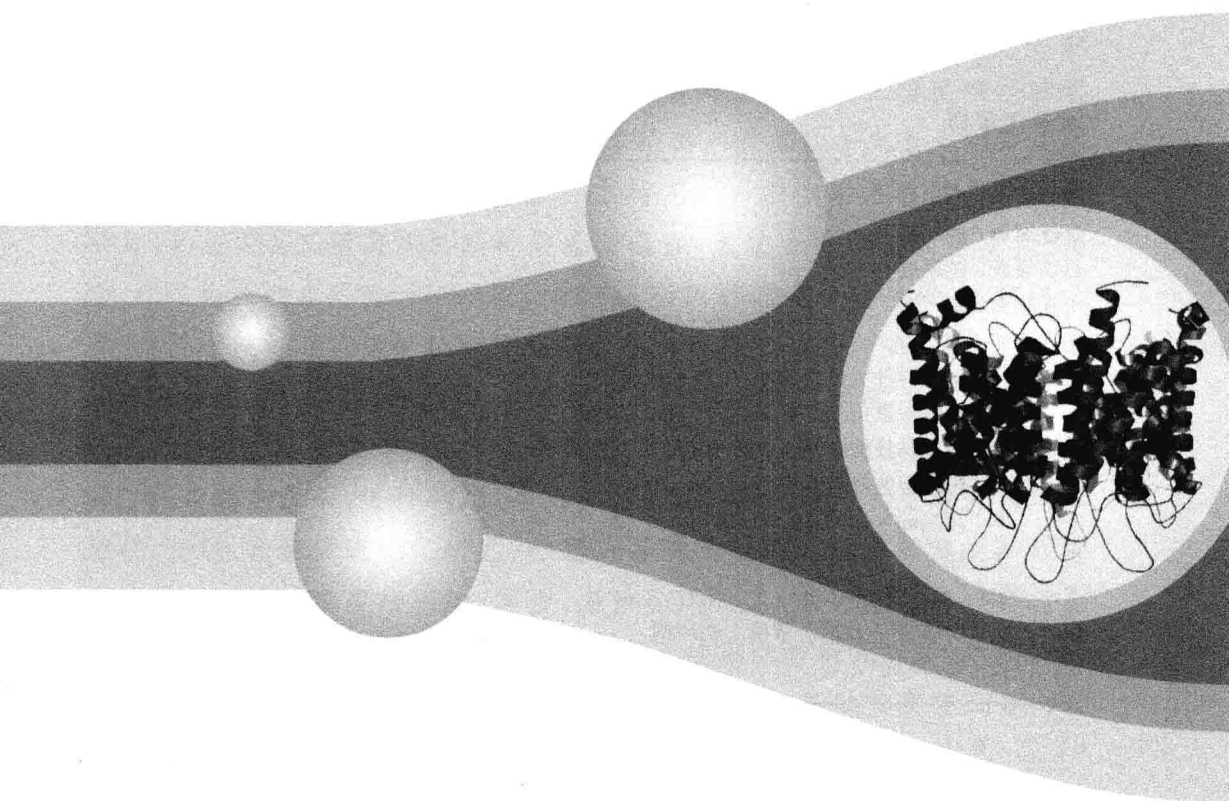
华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

水通道蛋白

主 编 靳世平

副主编 林 鹏 谭景艺 李 坤



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

内 容 简 介

本书介绍了水通道蛋白的发现历程和最新研究进展,填补了国内缺乏水通道蛋白相关专著
的空白,分别阐述了植物水通道蛋白、细菌水通道蛋白和人体水通道蛋白的相关内容,介绍了人体水
通道蛋白的功能以及它们与人类疾病的关系。

本书可供国内研究者、教师和学生参考,也可供科技爱好者参阅。

图书在版编目(CIP)数据

水通道蛋白/靳世平主编. —武汉:华中科技大学出版社,2015.1
ISBN 978-7-5680-0596-8

I. ①水… II. ①靳… III. ①蛋白质-研究 IV. ①Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 022829 号

水通道蛋白

靳世平 主编

策划编辑:熊彦

责任编辑:熊彦

封面设计:范翠璇

责任校对:邹东

责任监印:朱玢

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录排:华中科技大学惠友文印中心

印刷:虎彩印艺股份有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:10

字数:143千字

版次:2015年3月第1版第1次印刷

定 价:48.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

作者简介

靳世平, 华中科技大学能源与动力工程学院教授, 博士生导师。1977 年华中工学院机械制造专业毕业, 1992 年前武汉冶金设备制造公司设计研究所工程师、室主任, 1995 年华中理工大学工程热物理专业硕士毕业, 1999 年华中理工大学工程热物理专业博士毕业后留校任教, 现任华中科



技大学能源与动力工程学院热能利用新技术研究所副所长、教育部能源动力装置节能减排工程中心副主任。作为第一起草人负责起草了两项冶金行业燃烧器标准《YB/T 062—1994 冶金工业炉燃烧器技术条件》、《YB/T 160—1999 冶金工业炉燃烧器性能试验方法》; 负责开发的步进梁式加热炉产品曾获武汉市新产品二等奖, 科技进步三等奖。博士论文获湖北省优秀博士学位论文奖, 并为两项实用新型专利和三项发明专利发明(设计)人, 获 2004 年国家技术发明二等奖。回流区分级着火燃烧技术专利排名第二。发表论文 40 多篇。主持完成一项湖北省自然科学基金项目, 参与完成三项国家自然科学基金项目, 成功主持多项大型电力、冶金、化工企业的应用型科研课题。担任本科课程能源科学导论、工程热力学、燃烧污染与环境保护和研究生课程气液两相流动与传热、热工信号处理与可视化、能源科学展望教学任务。进行高效低污染燃烧技术的开发研究, 在劣质煤、重渣油、低热值煤气稳定燃烧和污染物燃烧控制方面取得了国内领先成果; 进行锅炉、工业炉窑、其他热能动力装置节能减排及燃烧、传热、系统性能优化研究, 开发出各种热能高效利用新技术和新型加热炉、换热器, 在国内钢铁、冶金、石油和煤化工、电力等行业得到推广应用。进行生物质粉末燃料加工、运输和直接燃烧的研究工作, 取得阶段性成果。目前研究方向: 高效低污染工业燃烧技术、高效热交换设备与技术、工业热设备及系统性能优化、可再生新能源开发利用。

序



FOREWORD

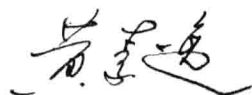
随着科学技术的快速发展和教育水平的不断提高,科学前沿的应用与人们日常生活的结合也越来越紧密。水通道蛋白就是一个很好的例子。从2003年获得诺贝尔化学奖,到今天的正渗透膜的研究,我们看到的是科技不再是仅仅为了自身的进一步发展,而更多的是推动造福人类或解决与人相关的问题的技术进步。事实上,科学与技术的本质就是以人为本,这也是当今科技发展的正确方向。

2003年的水通道蛋白对于人们甚至对于大部分科学工作者而言,都是一个新的话题。人们也许知道,研究水通道蛋白是研究水进出细胞的过程,可是他们也会疑惑不解,研究水是怎么进出细胞的,究竟有什么用呢?这本书给出了答案。水通道蛋白对人类的进化、对人类的疾病都起到了非常重要的作用,研究水通道蛋白,许多当今医学手段难以解决的疾病也许会有所转机。不仅如此,水通道蛋白结合正渗透技术,目前是比较热门的话题。这项技术一旦成熟,淡水制备和污水处理的效率将大大提高,将很大程度上解决许多国家缺水和水污染问题。

当然,由于水通道蛋白受到了科技界的关注,它也遭到了“利用”。比如,许多日化用品制造商打着水通道蛋白的名号虚假宣传其产品。对于此,本书也做了比较科学的分析。其实不仅仅是水通道蛋白,每年诺贝尔奖的成果,都或多或少会被拿来进行不法利用,我们需要的正是一本科学的、专业的书籍来向科技工作者和群众澄清事实。

水通道蛋白毕竟是一个新的课题,仍然需要大量的研究。然而国内外关于水通道蛋白的书籍少之又少,国内甚至尚未有一本专门介绍水通

道蛋白的书籍。一本系统的、全面的书籍对于科学研究具有很好的辅助作用,本书便是如此。编者们参考了国内外最新的研究成果,非常全面地介绍了水通道蛋白的发现与对其的各方面研究。相信此书的出版,将大大推动国内对于水通道蛋白的研究。本书的意义也将随着越来越多的研究者进入到这个领域而日益凸显。



2014 年 10 月于华中科技大学

前言



PREFACE

生命起源于水,水进出生物细胞或组织是生命代谢最基本的过程。如何实现水分子的跨膜运输是生命科学中的一个基本问题。水通道蛋白(Aquaporin)是一种位于细胞膜上的蛋白质,在细胞膜上组成“孔道”,可控制水在细胞上的进出。水通道蛋白大量存在于动物、植物等多种生物中。由于水通道蛋白的存在,细胞才可以快速调节自身体积和内部渗透压。由此可见,水通道蛋白对于生命活动至关重要。

2003年10月8日瑞典皇家科学院正式宣布,将2003年度诺贝尔化学奖授予美国科学家彼得·阿格雷和罗德里克·麦金农,以表彰他们在细胞膜通道方面做出的开创性贡献。这对人类探索肾脏、心脏、肌肉和神经系统等方面的诸多疾病具有极其重要的意义。早在100多年前,人们就猜测细胞中存在特殊的输送水分子的通道。但直到1988年,彼得·阿格雷才成功分离出了一种膜蛋白质,之后他意识到它就是科学家孜孜以求的水通道蛋白。

水通道蛋白不仅是生物医学和化学领域的一次重大发现,也对人们研究渗透热效应及其微观动力学、热力学机制有很强的启发作用,对于解决能源危机、环境问题和水资源稀缺问题也具有非常重要的意义。已经有科学家将水通道蛋白仿生技术与正渗透技术相结合来进行海水盐差能、污水处理以及海水淡化等相关研究。这一革命性的技术一旦成熟,将具有巨大的商业前景和经济价值。

本次诺贝尔化学奖,使许多从事水通道蛋白研究的学者为之一振,有时也将不为人所知的水通道蛋白带入了大众的视野。这一领域,国外研

究者颇为深入,然而国内研究者甚少,更缺乏一本系统介绍水通道蛋白的书籍。本书由编者结合自己的背景知识,综合参考和研究国内外最新的成果编写而成,涵盖生物医学、化学、能源、水处理、渗透和热力学等不同方面的内容,其目的是向广大读者介绍水通道蛋白,可供国内研究者、教师和学生参考,也可供科技爱好者参阅。

本书力求语言精练、内容全面、知识前沿。为照顾更多读者,书中不仅有通俗易懂的叙述,也有深入的理论探讨,使读者最大程度上了解和学习关于水通道蛋白的知识。全书共分为五章,第一章介绍了水通道蛋白的发现历程和最新研究进展,讲述了该领域几位重要贡献者的事迹,第二章和第三章分别阐述了植物水通道蛋白和细菌水通道蛋白的相关内容,第四章解释了人体水通道蛋白的结构和原理,第五章重点介绍了人体水通道蛋白的功能以及它们和人类疾病的关系。

由于编者水平有限,书中若有疏漏之处,恳请读者批评指正。

《水通道蛋白》编写组

华中科技大学中欧清洁与可再生能源学院

华中科技大学能源与动力工程学院

目 录



CONTENTS

第一章 水通道蛋白的发现历程	(1)
1.1 引言	(1)
1.2 水通道蛋白的首次发现	(2)
1.3 人物——彼得·阿格雷	(9)
1.4 人物——亚瑟·卡斯凯尔·所罗门	(32)
1.5 其他水通道蛋白介绍及其研究进展	(37)
第二章 植物水通道蛋白	(41)
2.1 背景介绍	(41)
2.2 植物水通道蛋白的分类	(42)
2.3 植物水通道蛋白的结构	(48)
2.4 水通道蛋白在植物中存在的部位	(49)
2.5 植物水通道蛋白的功能	(51)
2.6 植物水通道蛋白的调控	(54)
2.7 植物水通道蛋白功能研究的方法学	(60)
2.8 水通道蛋白耐盐性功能专题	(63)
2.9 植物水通道蛋白小结	(66)
第三章 细菌水通道蛋白	(69)
3.1 背景介绍	(69)
3.2 细菌水通道蛋白的分子结构和生化特性	(70)
3.3 细菌水通道蛋白在细菌种群的分布及表达	(71)

3.4	细菌水通道蛋白与细菌生长繁殖的关系	(72)
3.5	细菌水通道蛋白 Z 的研究	(72)
3.6	细菌水通道蛋白 Z 的高效表达	(74)
3.7	细菌水通道蛋白 Z 的功能	(78)
3.8	细菌水通道蛋白 Z 的调控	(79)
3.9	细菌水通道蛋白 Z 研究的应用前景	(82)
3.10	细菌水通道蛋白小结	(83)
第四章	人体水通道蛋白	(85)
4.1	背景介绍	(86)
4.2	水通道蛋白的成员及其组织分布	(89)
4.3	水通道蛋白的结构	(93)
4.4	水通道蛋白对水分子的筛选机理	(96)
4.5	水通道蛋白的调节	(98)
第五章	水通道蛋白的功能与疾病	(105)
5.1	背景介绍	(105)
5.2	水通道蛋白与泌尿系统	(108)
5.3	水通道蛋白与消化系统	(109)
5.4	水通道蛋白与神经系统	(117)
5.5	水通道蛋白与呼吸系统	(131)
5.6	水通道蛋白与生殖系统	(138)
5.7	水通道蛋白与眼	(144)
5.8	水通道蛋白与其他疾病	(148)

1.1 引言

水是万物之源。潺潺溪流滑过光滑的石头,滚滚波涛奔向浩瀚的海洋。大自然里的水是美妙而雄壮的,在河床里流动,在海沟中穿行。

生物体也像一个生态系统,所有的生命物质都是由细胞构成的。就如同宇宙中有数不清的群星那样,人体中有约千亿个细胞,水则是细胞最不可或缺的“营养品”,生物体细胞吸收和释放水分是一个基本的生命现象。

水是活细胞中最丰富的化合物。在动物体内存在两种状态的水:自由水和结合水。自由水又称游离水,存在于细胞中,能够自由运动。结合水又称束缚水或结晶水,难以运动。水在生物体内具有多种重要的生理功能。如同大自然里的水需要河床一样,生物体内水的“流动”——输送,也需要一条途径,而相比之下却是难以观察、悄无声息的。

几十年来,人们一直期待能像观察大自然一样,观察到水进出细胞的样子,许多学者为此奉献了一生。

本书的第一章,将从学者开始关注水的运输问题讲起,介绍彼得·阿格雷发现水通道蛋白以及获得诺贝尔化学奖的过程。接着对阿格雷和亚瑟这两位在该领域极其重要的科学家进行介绍,同时也从不同侧面反映出了诺贝尔奖获得者和做出伟大贡献的科学家们的精彩人生。相信读者可以从本章得到一定的启示。文中对于水通道蛋白发现过程的记录,也为后文对水通道蛋白的详细介绍做了铺垫。

1.2 水通道蛋白的首次发现

本节将介绍最近 50 年来有关水的跨膜运输问题的研究。为了描述这种现象,阐述它的机理,人们运用了各种理论和方法,这其中包括脂质双分子层假说和蛋白质克隆技术。本节回顾了先驱们的开创性工作和近年来高技术的发展所带来的更加清晰、明确的生物物理研究工作,总结了该领域的先进成果和遗留问题。

1.2.1 概述

水跨膜运输的机理在最近 50 年是一个非常引人注目的论题。人们提出了不同的假说(有些是互补的,有些是相悖的)来解释这一与生命体内在密切相关的机理。水通道蛋白的发现终结了对水的运输通道的争论。但是,直到今天,很多重要的论题仍然悬而未决,比如通道内支配渗透机制的微观作用力问题。

下面将介绍学者们对于水跨膜运输机理的观点和科学发现。

1.2.2 水孔假说

1. 理论基础

扩散(diffusion)是指分子的随机热运动所导致的物质从高浓度区域向低浓度区域的移动,是一种自发过程。1855 年,德国科学家 Adolf Fick 发现扩散速率直接与浓度梯度成正比,即某一物质在单位时间内通过垂直于扩散方向的单位截面积的流量(称为扩散通量,diffusion flux)与截面处该物质的浓度梯度成正比,该规律被称为菲克第一定律(Fick's first law)。由于水分子较小,可以慢慢地穿越细胞膜的脂质双分子层的空隙进出细胞。20 世纪 20 年代,随着对细胞膜的脂质双分子层结构的认识,

人们普遍认为水是以简单扩散的形式通过细胞膜的脂质双分子层,即水分子的简单扩散学说。

19 世纪 50 年代到 19 世纪 60 年代的生物物理研究指出,水在特定生物细胞膜上的渗透是由于细胞中存在水孔。

大体上,这个假说包含以下几个参数。

(1) 扩散水通透系数(P_{dw})和渗透水通透系数(P_{som})。 P_{dw} 指的是水的传输没有渗透梯度, P_{som} 指的是水在渗透梯度的作用下运动。 P_{som}/P_{dw} 用来表示水孔是否存在:在纯的液膜中, P_{som}/P_{dw} 等于 1;而当水孔存在时, P_{som}/P_{dw} 将大于 1。

(2) 两个参数的活化能(E_a)。 E_a 为水的跨膜运输的能量势垒提供了一个量度。

(3) 考虑膜对溶质的可渗透性时,对于非电解且非脂溶分子,Staverman 膜反射系数(σ)会在溶质完全透过细胞膜的情况下为 0,在细胞膜没有可透性的情况下为 1。

然而水分子简单扩散学说不能解释一些生理现象,如尿的浓缩、 P_{som}/P_{dw} 大于 1 时水的转运以及有些细胞的水转运可被通道蛋白阻断剂抑制等。人们早就发现,近端肾小管(renal proximal tubules)、髓袢降支细段(the thin descending limb of Henle)具有强烈的吸水功能,平均每天吸收水分大约 150 L;血液中的红细胞在低于 0.45% NaCl 的低渗溶液中会快速吸水膨胀破裂。如果仅通过简单扩散,细胞吸收水分不可能如此快速。所以就产生了另一种理论,认为细胞膜上存在水分子转运的特殊通道,即水通道学说。这种通道具有高度的选择性,水穿过这样的细胞膜几乎没有阻力,而酸性的水合氢离子(H_3O^+)却不能渗透这种细胞膜。

2. 水孔假说的实验支撑

19 世纪 50 年代末,亚瑟及其同事做了关于水跨膜运输的实验。实验方法:用同位素氚标记的水通过人体红细胞膜来估测 P_{dw} 的值,用光散射

方法分析细胞体积变化来得出 P_{som} 的值。

据 Hans Ussing 的研究,扩散(P_{dw})和过滤(P_{som})的渗透常量不同,表明细胞膜内存在水的通道。根据这一模型,水被认为是从圆柱形孔道中通过。细胞多孔性通过这一模型被刻画成理想的近似几何图形,但是这个模型是比较粗略的,并非真实结构的完全呈现。

在 20 世纪六七十年代,水转运领域的先驱们首先提出水通道蛋白的存在,这些前辈们包括:波士顿的亚瑟·卡斯凯尔·所罗门(Arthur K. Solomon),纽约的艾伦·菲克尔斯代恩(Alan Finkelstein),伯克利的罗伯特·梅兹(Robert Macey),罗马尼亚的乔治·本格(Gheorghe Benga),委内瑞拉的盖勒姆·怀特姆拜瑞(Guillermo Whitembury),阿根廷的马里奥·潘瑞斯(Mario Parisi)。他们通过生物物理的方法证实了水通道存在于对水具有高渗透性的一些细胞中,如肾小管、唾液腺、红细胞。然而,他们都没有分离出转运水的蛋白。

1.2.3 无搅动层和人工类脂双层膜

20 世纪 60 年代中期,其他学者利用青蛙表皮细胞进行类似实验,结果表明 $P_{\text{som}}/P_{\text{dw}}$ 大于 1 是因为 P_{dw} 值被低估了。因为整个溶液中水分子的密度与膜两侧狭小区间内的水分子密度并不相同,这样便产生了一定的浓度梯度。将膜两侧的水分进行适当搅拌后,最终测得并校正后的 P_{dw} 与 P_{som} 值相等。因此,水通道假说受到强烈质疑。但是,后续的众多实验又使水通道假说获得重生并最终被接受。例如,红细胞中水的快速渗透能够被汞抑制,清除抑制剂后,红细胞又可恢复对水的快速渗透能力。而汞却不影响细胞膜对水的简单扩散,即不影响 P_{dw} 的值。肾集合管上皮细胞对水的渗透较差,但抗利尿激素(ADH)能够显著增强收集管对水分的回收,即显著增大 P_{som} 和 P_{dw} 的比值。另外,pH 值也影响膜对水的渗透性。随着细胞膜上 Na^+/K^+ 等离子通道的发现,人们推测细胞膜上极可能存在专一性快速运输水分的蛋白分子,即水通道。然而,随后的近 20

年科学家们进行了多种尝试,企图在红细胞、肾小管上皮细胞以及唾液腺中找到水通道蛋白,但都无功而返。

1.2.4 人工水通道

人工添加脂质双层通道这一过程使得“水通道假说”再次被人们接受。Finkelstein 小组的实验验证了在纯液膜中 P_{som} 等于 P_{dw} 这一结论,从而支撑了“扩散—渗透”模型。这使得水孔理论再次复活,并发展为“单线运动理论”。水穿过细胞膜孔的不同途径显示了 P_{som} 和 P_{dw} 的区别所在, $P_{\text{som}}/P_{\text{dw}}$ 则是与特定通道相关的常数。这个数值从 1 到 5 不等。

20 世纪 70 年代末的讨论均是在这个基础之上,集中于推动水分子穿过通道的机理问题。

20 世纪 90 年代,计算机模拟被应用在对水通过脂质双层膜孔的研究上。模拟结果与 1978 年 Rosenberg 和 Finkelstein 的实验结果拟合得很好,证明了这一理论的合理性。

1.2.5 抗利尿激素控制的水通道

以上的观点(如未搅动层的影响, $P_{\text{som}}/P_{\text{dw}}$ 重要性以及分子单线移动的理论等)被应用在抗利尿激素(ADH)控制的水通道的研究上。ADH 能极大促进蟾蜍膀胱管腔膜的水渗透性。在随后的研究中,“单线运动理论”被用来解释水分子通过 ADH 控制的通道的现象。 P_{dw} 和 P_{som} 这两个参数随着 ADH 在不同的温度和搅拌条件下的行为而改变。经过外部未搅动层的校正, $P_{\text{som}}/P_{\text{dw}}$ 维持在一个常数。

现在,我们已经知道 ADH 影响水通过上皮细胞的机理有两个:(1)直接控制细胞膜上的 AQP2 的个数;(2)间接促进 Na^+ 的主动运输来诱导水分转移。

1.2.6 水通道蛋白

1. Peter Agre 早年的研究

1974 年至 1975 年, Peter Agre 在约翰霍普金斯大学药理学系 Pedro Cuatrecasas 的实验室进行研究。1984 年, Peter Agre 在美国约翰霍普金斯大学的老巴洛克式建筑建立了第一个自己的实验室。当时作为血液学家, Peter Agre 和助手 Andy Asimos 开始研究球形红细胞增多症 (spherocytosis), 并分别于 1985 年和 1986 年在 *Nature* 和 *New England Journal of Medicine* 上发表了相关文章, 证明血影蛋白 (spectrin) 的缺乏与临床上球形细胞增多症的严重程度有关。

2. AQP1 的发现

20 世纪 80 年代中期, Peter Agre 研究了不同细胞膜蛋白, 发现其中一种细胞膜蛋白就是人们寻找已久的水通道蛋白。

他在分离 Rh 血型抗原中的 32 kD 大小的整合膜蛋白时, 得到了一个 28 kD 的肽段。起初认为是 Rh 抗原裂解的小片段, 而后 Peter Agre 实验室的博士后 Brad Denker 和助手 Barbara Smith 采用去垢剂纯化这种蛋白质。在去垢剂分离析出物中发现了一条 28 kD 的不连续的条带。Peter Agre 发现这是一种新的蛋白, 这种蛋白主要分布在红细胞和肾小管细胞中, 并且以非糖基化的 28 kD 和 N-糖基化的 40~60 kD 两种形式存在。通过序列的比较表明, 它与一组可能具有膜通道功能的蛋白很相似。与此同时, 另外一个独立的研究小组通过放射性失活研究肾脏的水通透变化, 最后把目标指向一个大约为 30 kD 大小的蛋白。由于该蛋白具有独特的组织分布, Peter Agre 开始意识到这个蛋白可能就是长期以来一直寻找的水通道蛋白。

1992 年, Peter Agre 与其在约翰霍普金斯大学的同事 Bill Guggino 协作, 测试了 28kD 蛋白可能的水转运功能。他们采用非洲爪蟾卵母细

胞。非洲爪蟾卵母细胞几乎对水不通透,因此非常适合进行水通道蛋白的研究。当时非洲爪蟾卵母细胞表达体系已经是非常成熟的用于研究各种通道蛋白、转运蛋白的理想体系。1990年 Rubin Zhang 和 Verkman 等科学家已经利用该系统证实红细胞和肾脏中的确存在水通道蛋白,遗憾的是他们没能克隆水通道蛋白基因。Peter Agre 的研究组给对照组的卵母细胞注射水,给实验组的卵母细胞注射 2 ng 的含 CHIP28 的 cRNA。三天后,对照组和实验组卵母细胞体积完全一样。将其转移到蒸馏水中,因为对照组的卵母细胞对水的通透性非常低,细胞没有膨胀。形成鲜明对比的是,实验组的卵母细胞对水具有高度的渗透性,像爆米花一样膨胀。但是依然有人提出质疑,CHIP28 并非水通道蛋白本身,可能是调节水通道蛋白开闭的蛋白。

为进一步证实 CHIP28 为水通道蛋白,排除其为水通道调控蛋白的可能性,Peter Agre 研究组将蛋白 CHIP28 构建于人造脂膜内,通过对其活化能、渗透系数的测定,以及对 HgCl_2 等抑制剂敏感性等的研究,最终证明 CHIP28 的确为专一水通道蛋白。有趣的是,那些用来表征水通道蛋白遗传信息的参数,仍然是之前 40 年一直采用的 P_{dw} 、 P_{som} 、 $P_{\text{som}}/P_{\text{dw}}$ 、 E_a 等。

Peter Agre 在丹麦奥尔胡斯大学的同事 Maunsbach 等(1994),通过低温电子显微镜对简单囊泡的膜进行了检验。当再造的脂质膜不含有蛋白质时,它的表面是光滑的,而当脂质膜中含有 AQP1 时,膜的内部就可見到许多直径为 $0.01\ \mu\text{m}$ 的小洞。研究进一步证实了 CHIP28 专一转运水的特性而不是诱导或调控爪蟾卵母细胞中水通道的表达。

这个蛋白因此被命名为水通道蛋白,后来被官方命名为 AQP1,它是第一个被定义的水通道蛋白。

2000 年,Peter Agre 与其研究人员一起公布了世界上第一张水通道蛋白的高清晰度立体照片。照片揭示了这种蛋白的特殊结构——只允许水分子通过。水通道蛋白的发现开辟了一个新的研究领域。目前,科学家们发现水通道蛋白广泛存在于动物、植物和微生物中,它的种类很多,