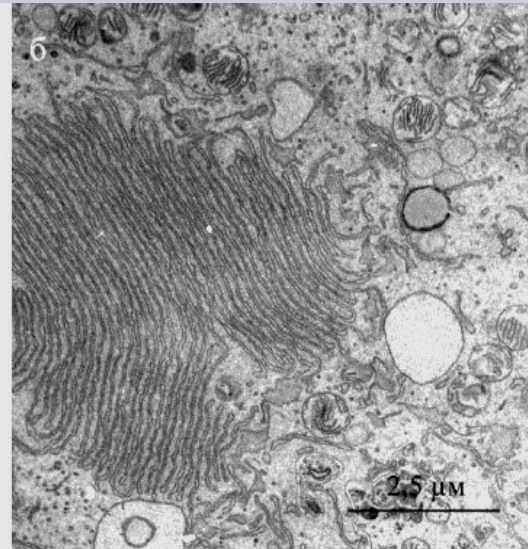
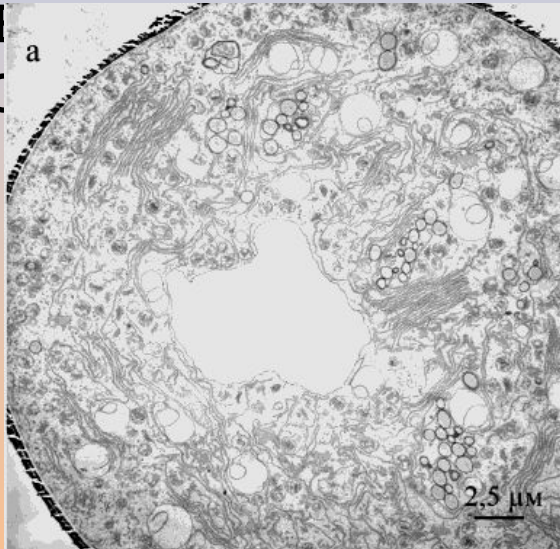


# Лекция 3

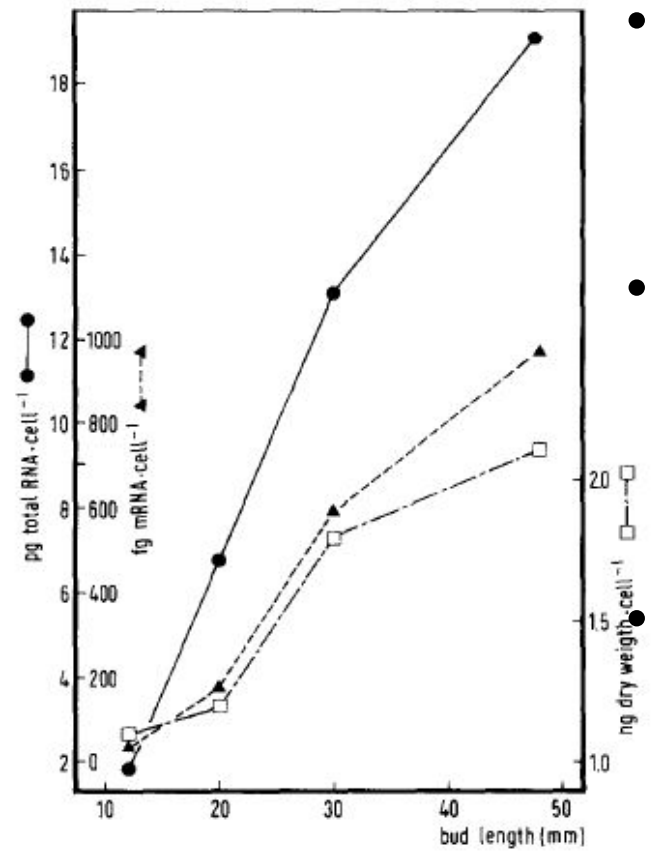
Микрогаметофит. Созревание,  
покой и прорастание

# Метаболизм мужского гаметофита

- На протяжении развития пыльцевого зерна идет интенсивный рост объема и сухой массы вегетативной клетки, увеличивается число органелл, исчезают вакуоли и накапливаются РНК и белки.
- Мужской гаметофит готовится к выходу из-под защиты спорофита, и в то же время создает ресурсы для прорастания и быстрого роста пыльцевой трубки.
- Перед к физическому приближается к физическому приближается уется.



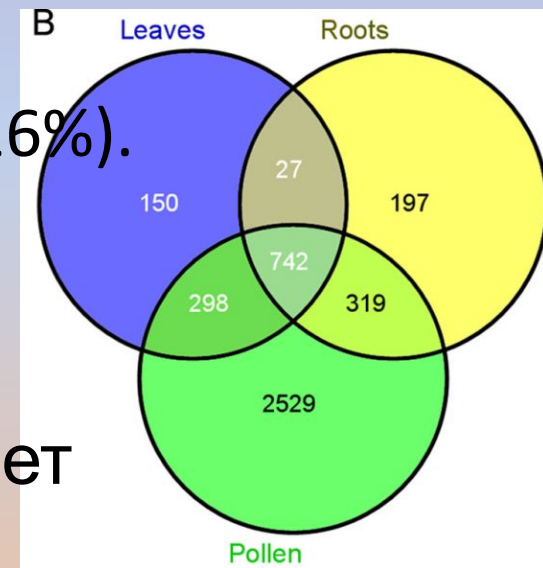
# Биосинтетическая активность



- Синтетическая активность вегетативной клетки существенно изменяется на протяжении развития мужского гаметофита.
- Скорость синтеза РНК в премитозной микроспоре табака составляет около 56 фг/ч. В растущем пыльцевом зерне она поднимается до 460 фг/ч – это максимум. Позже скорость снижается. Аналогичным образом проходят через максимум другие показатели биосинтетической активности: доля рибосом, собранных в полисомы, и размеры ядрышка.
- К концу созревания пыльцевого зерна уменьшается интенсивность его дыхания, а внутриклеточный рН сдвигается в кислую сторону.

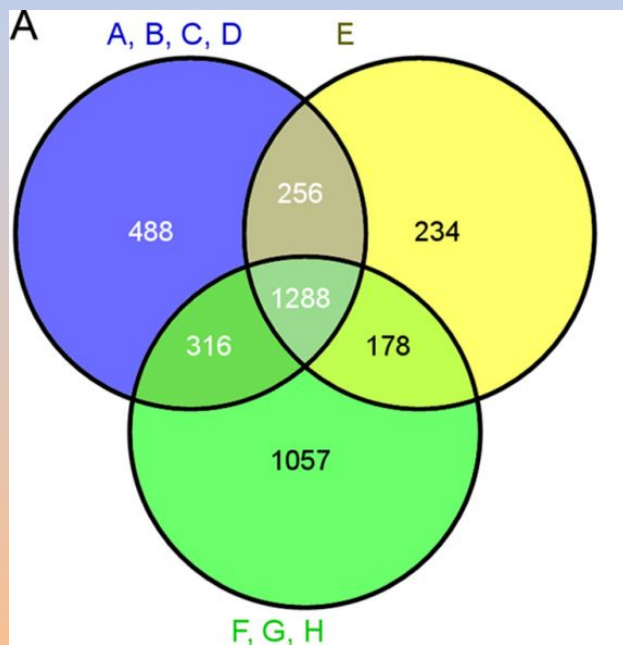
# Специфичные и обычные

1. Гены «домашнего хозяйства» (housekeeping genes), которые экспрессируются также в соматических клетках растений.
  2. Гены, которые встречаются в других клетках, но в ♂ гаметофите экспрессируются более активно (10-26%).
  3. Гены специфичные для микроспор/пыльцы (4 -11% ). Для сравнения, в соматических тканях совокупная доля групп 2 и 3 составляет около 3%.
- Относительно высокий уровень экспрессии специфичных и предпочтительных генов отражает



# Концепция 3-х стадий (протеом)

- 1 стадия – от микроспороцита до молодой микроспоры
- 2 стадия – поляризованная микроспора
- 3 стадия – пыльцевое зерно и трубка

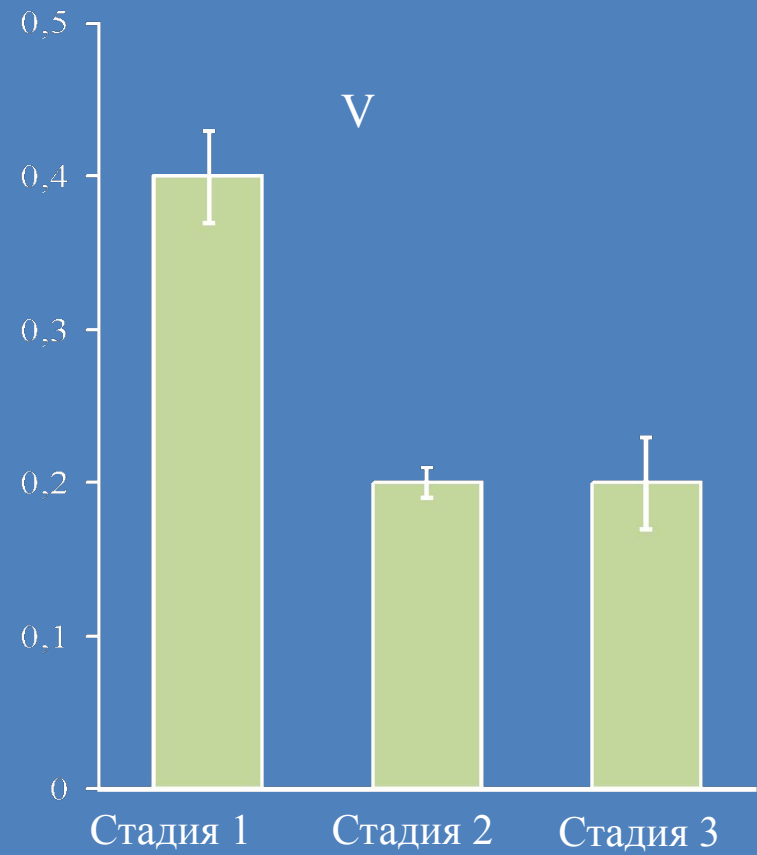
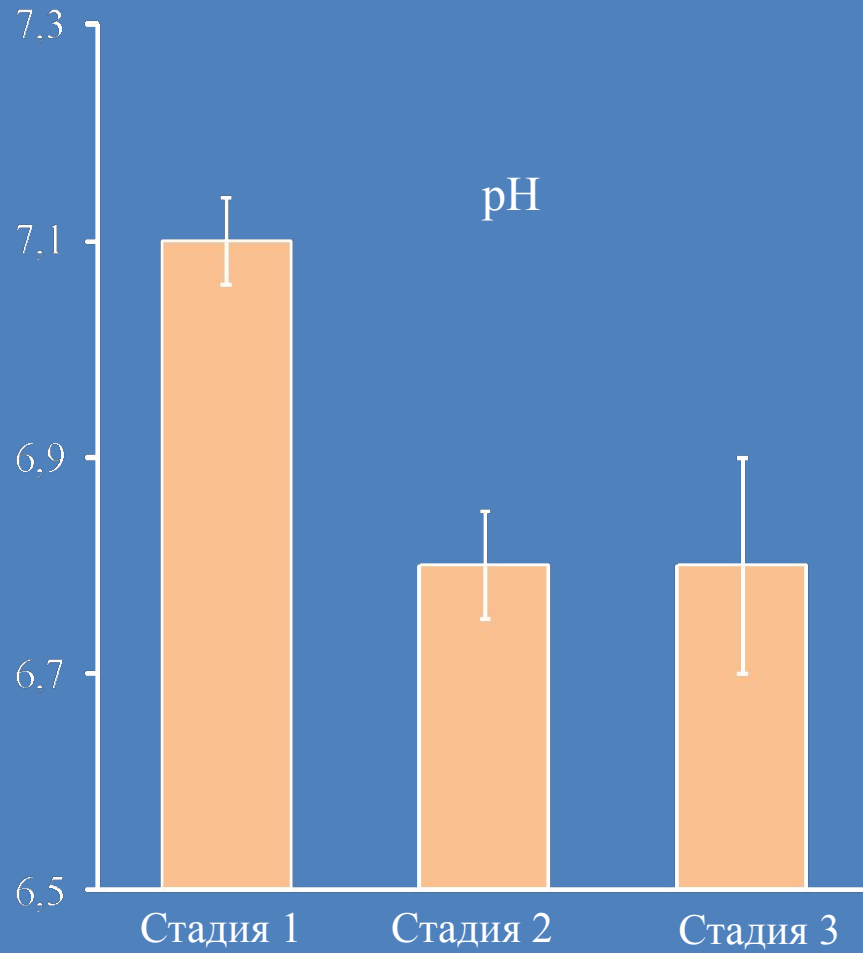


Stage	Label	<i>n</i> proteins
Microsporocyte	A	1775 (1741)
Meiosis	B	1596 (1573)
Tetrad	C	1748 (1719)
Microspore	D	1288 (1264)
Polarized microspore	E	2004 (1956)
Binuclear pollen	F	1770 (1740)
Dessicated pollen	G	1604 (1580)
Pollen tubes	H	2526 (2485)
Pollen total		3888 (3817)
Leaves		1217
Roots		1285

# Относительное содержание элементов на разных стадиях гаметофитогенеза

Элементы	Стадии развития		
	Ранние микроспоры	Вакуолизованные микроспоры	Молодые пыльцевые зерна
С	4,9 ± 1,3	2,9 ± 0,4	4,3 ± 0,6
N	2,0 ± 0,5	2,6 ± 0,5	2,6 ± 0,3
O	7,2 ± 1,9	7,5 ± 1,3	9,2 ± 1,6
К	<b>4,0 ± 1,1</b>	4,1 ± 1,4	<b>9,3 ± 0,8</b>
Cl	<b>0,4 ± 0,2</b>	0,3 ± 0,1	<b>1,2 ± 0,1</b>

# pH и поглощение кислорода в процессе гаметофитогенеза



- Поляризация и деления микроспоры, формирование оболочки
- Метаболизм, транскриптом и протеом мужского гаметофита

### → Дегидратация пыльцевых зерен

- Адгезия и регидратация пыльцевых зерен на рыльце пестика, выбор функциональной апертуры
- Активация пыльцевых зерен
- Цитомеханика стенки пыльцевого зерна и пыльцевой трубки
- Закономерности полярного роста пыльцевой трубки
- Особенности прогамной фазы у голосеменных
- растений

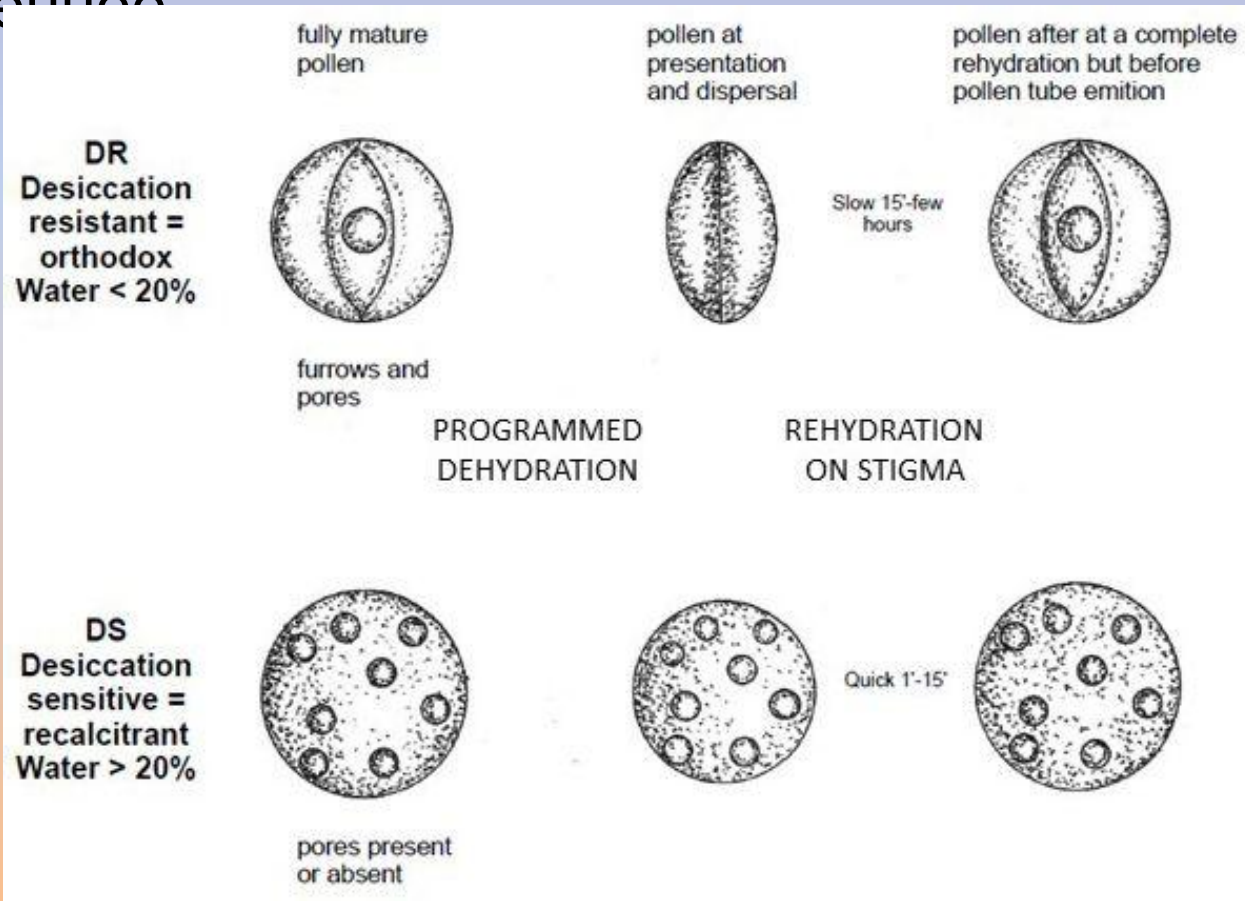


# Изменение оводнённости

- Степень гидратации мужского гаметофита изменяется в ходе его развития.
- 1) **Формирование** пыльцевого зерна, когда оно погружено в локулярную жидкость, через которую проходят вещества, поставляемые спорофитом.
- 2) Созревание и **дегидратация** пыльцевого зерна в пыльнике до его раскрытия. Локулярная жидкость в это время реабсорбируется и/или испаряется.
- 3) Фаза презентации, когда пыльца высыпается из раскрывшегося пыльника.
- 4) Распространение пыльцы посредством различных агентов – ветра, животных (насекомых, зверьков и птиц). Эта фаза может длиться, в зависимости от вида растения, от нескольких секунд до нескольких дней.
- 5) Взаимодействие пыльцы и рыльца. Попав на рыльце, при благоприятных условиях пыльцевые зерна **регидратируются** и начинают прорастать.

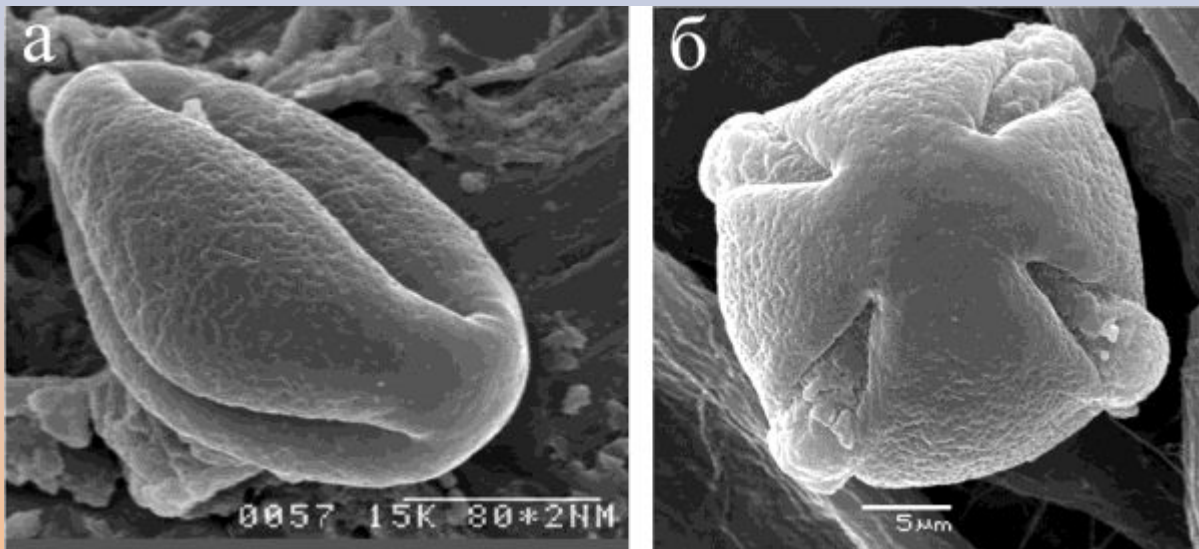
# Дегидратация

- Пыльцевые зёрна подразделяют на частично дегидратированные (<20-30%) и частично гидратированную (>20-30%). Первая сохраняется дольше, прорастает медленнее



# Дессиком

- Это набор генов, белков и метаболитов, обеспечивающих устойчивость клеток к дегидратации
- Включает регуляторные механизмы и сигнальные пути, контролирующие индукцию защитных механизмов



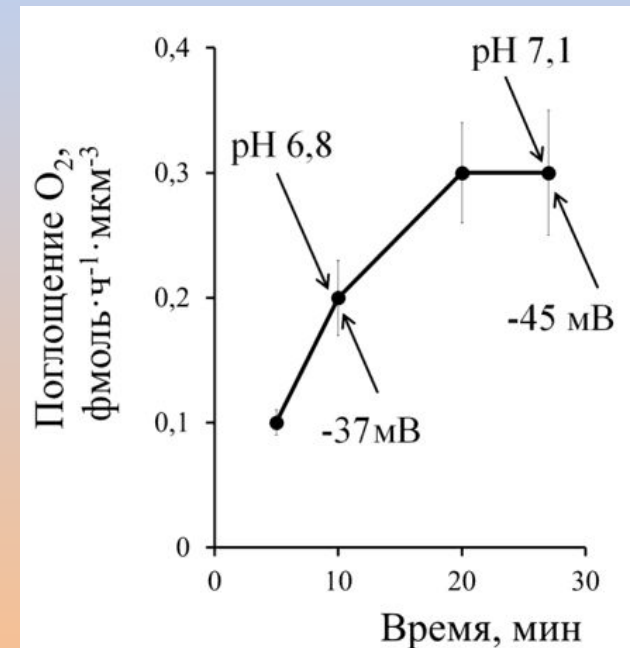
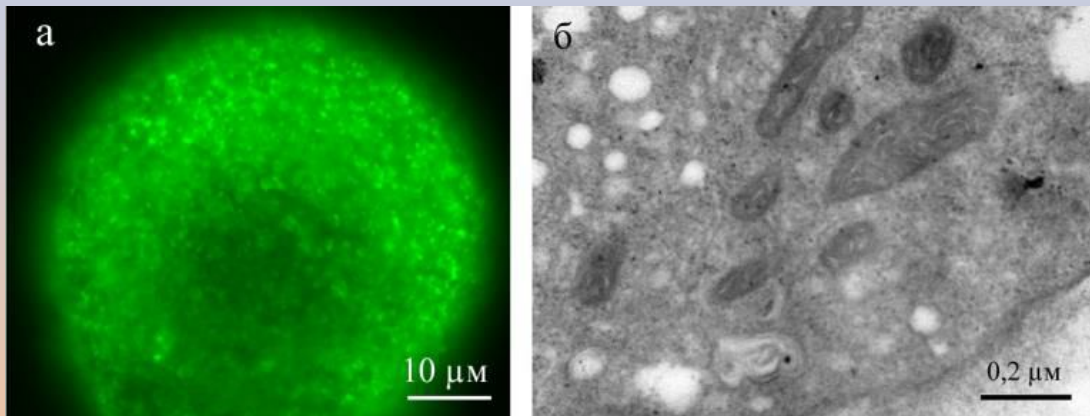
# Гены, входящие в десиком

- Стабилизация мембран и белков с помощью невосстанавливающих сахаров, белков теплового шока и LEA-белков, которые могут действовать как шапероны или «молекулярные щиты», препятствуя агрегации клеточных белков.
- Защита от окислительного стресса с помощью антиоксидантов.
- Защита клеточных структур: стенки, эндомембран, цитоскелета и др.

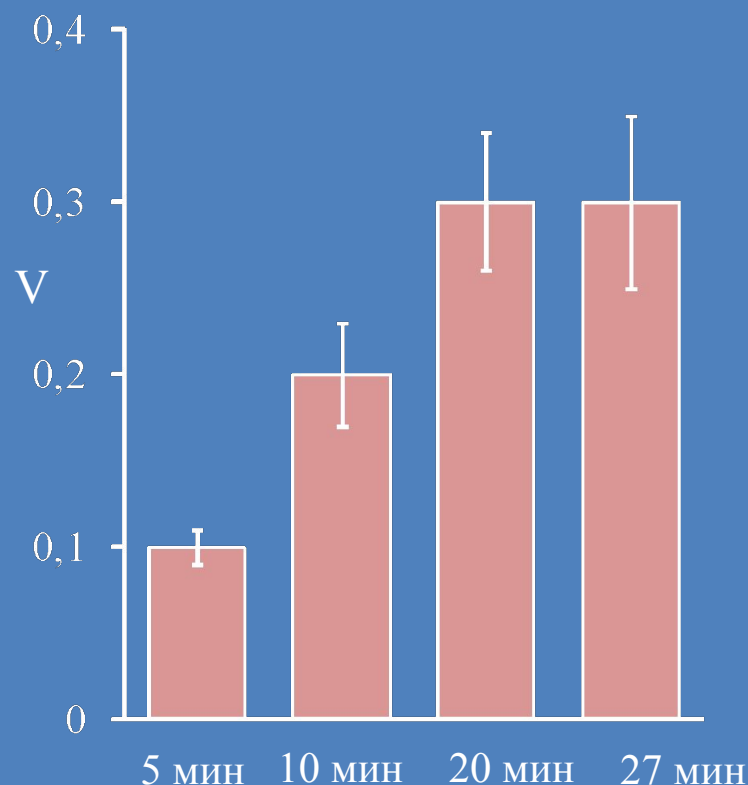
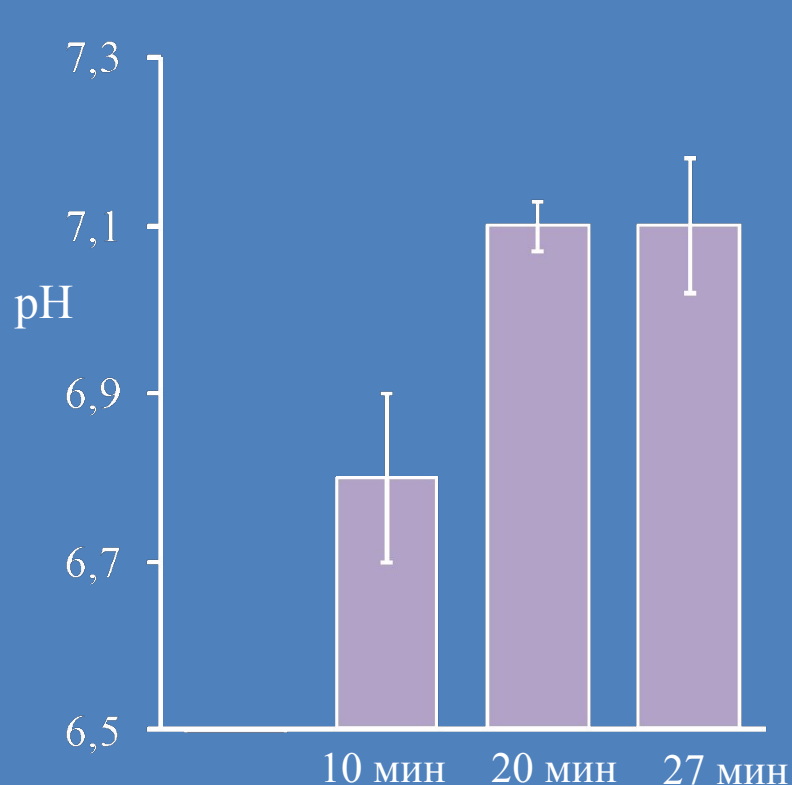
- Поляризация и деления микроспоры, формирование оболочки
- Метаболизм, транскриптом и протеом мужского гаметофита
- Дегидратация пыльцевых зерен
- Адгезия и регидратация пыльцевых зерен на рыльце пестика, выбор функциональной апертуры
- Активация пыльцевых зерен
- Цитомеханика стенки пыльцевого зерна и пыльцевой трубки
- Закономерности полярного роста пыльцевой трубки
- Особенности прогамной фазы у голосеменных
- растений

# Активация пыльцевого зерна

- Активация дыхания (скорость процесса зависит от состояния митохондрий)
- Сдвиг pH в щелочную сторону
- Гиперполяризация плазмалеммы вегетативной клетки



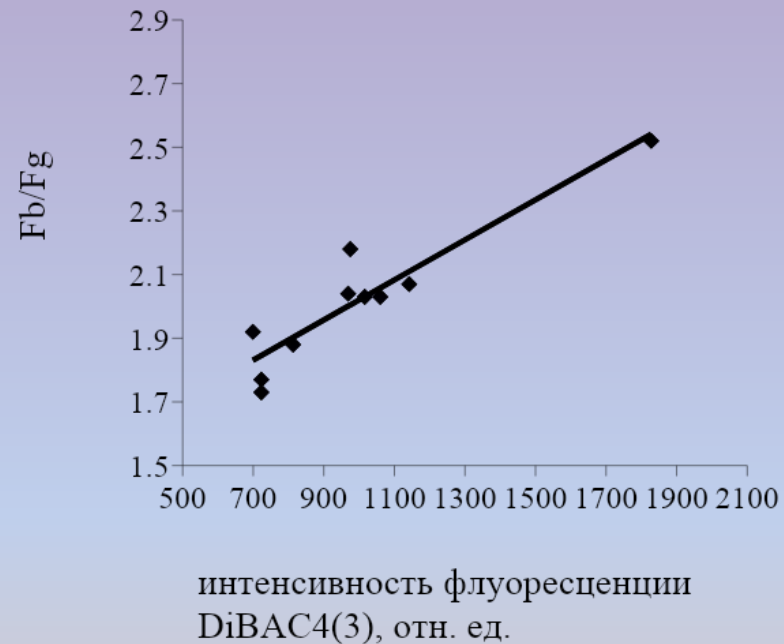
# Динамика рН и скорости поглощения кислорода в процессе активации зрелого ПЗ *in vitro*



# Два оптических метода оценки $E_m$

## Ратиометрический быстрый краситель Di-4-ANEPPS:

- ✓ Съёмка в двух каналах при возбуждении синим (Fb) и зелёным (Fg) светом – нет зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации красителя;
- ✓ Не выцветает и быстро реагирует на изменения – позволяет регистрировать динамику.



## Медленный краситель DiBAC<sub>4</sub>(3):

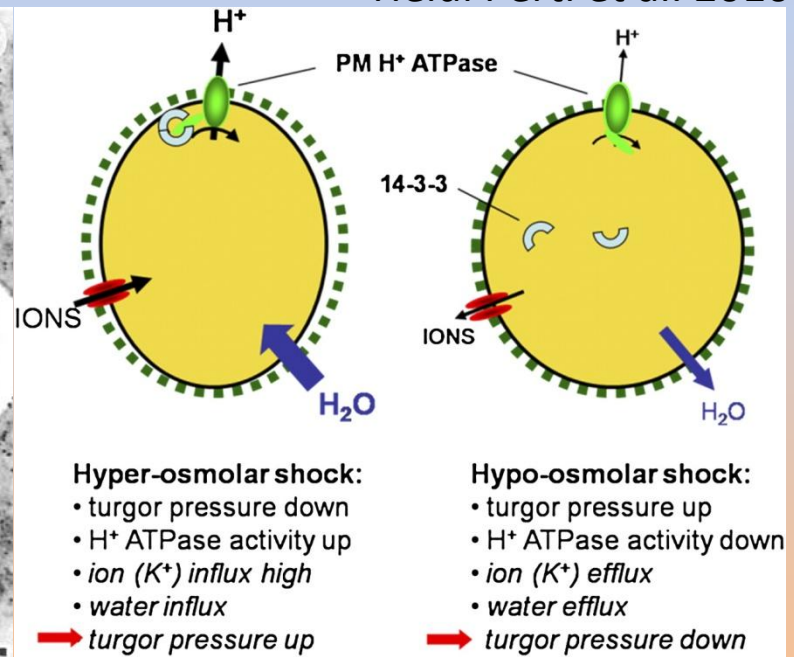
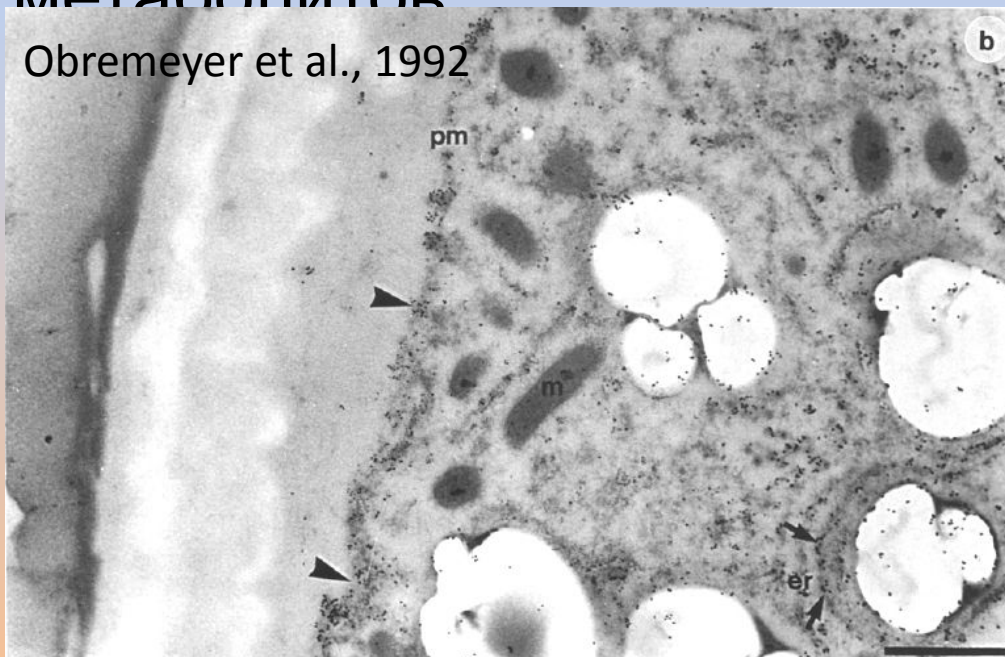
- ✓ позволяет определить абсолютные значения  $E_m$  (расчет ведется относительно полностью деполяризованных клеток)
- ✓ Прост в использовании: позволяет работать с большими популяциями клеток, набирая статистические данные.



# H<sup>+</sup>-АТФаза плазмалеммы

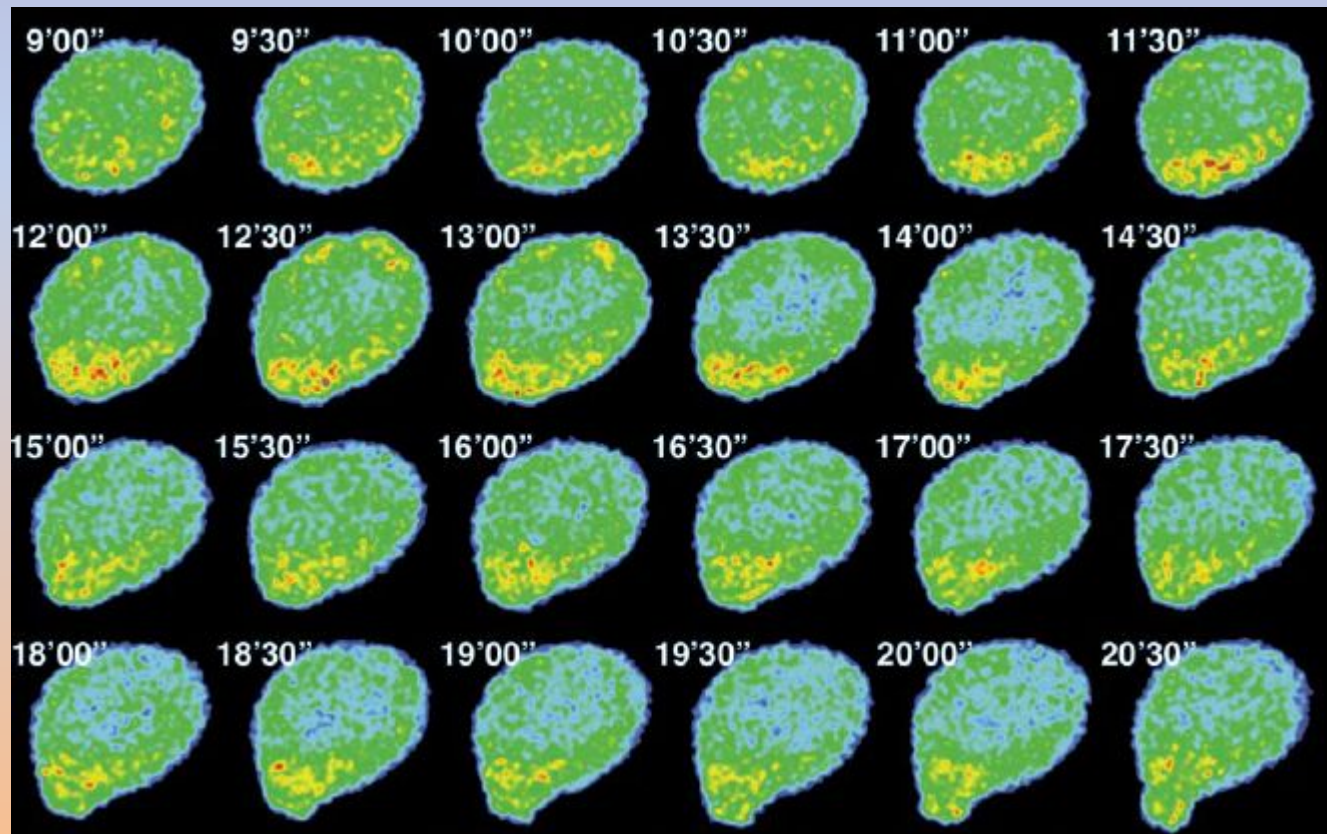
- Этот фермент – один из важнейших в растительной клетке. Выкачивая протоны, он влияет на величину внутриклеточного рН, генерирует протонный электрохимический градиент и формирует мембранный потенциал, обеспечивая тем самым трансмембранное перемещение ионов и метаболитов

Heidi Pertl et al. 2010



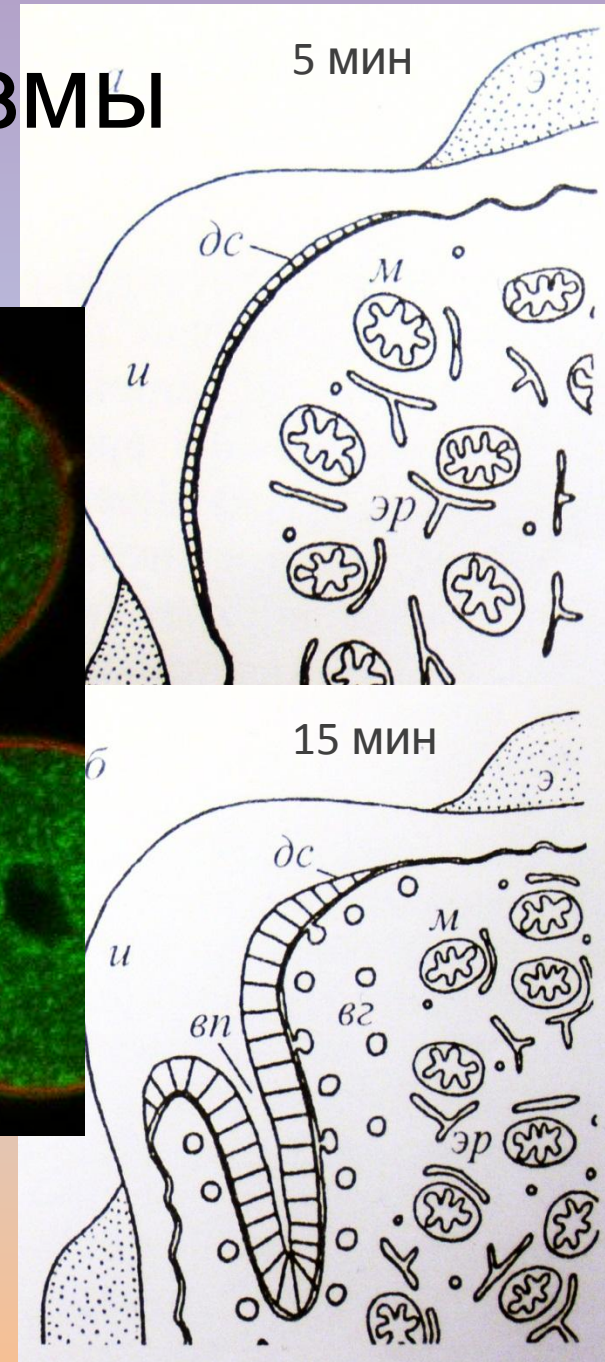
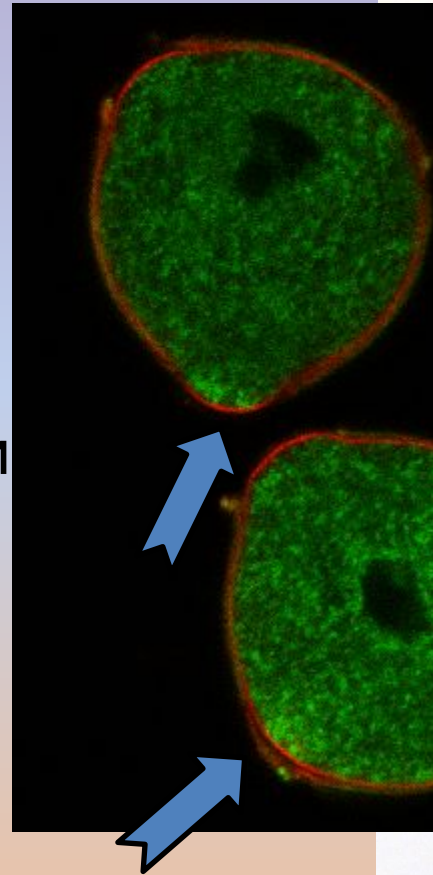
# Всему голова – $\text{Ca}^{2+}$

- Концентрация кальция возрастает в месте выхода пыльцевой трубки
- Ингибиторы подавляют прорастание.

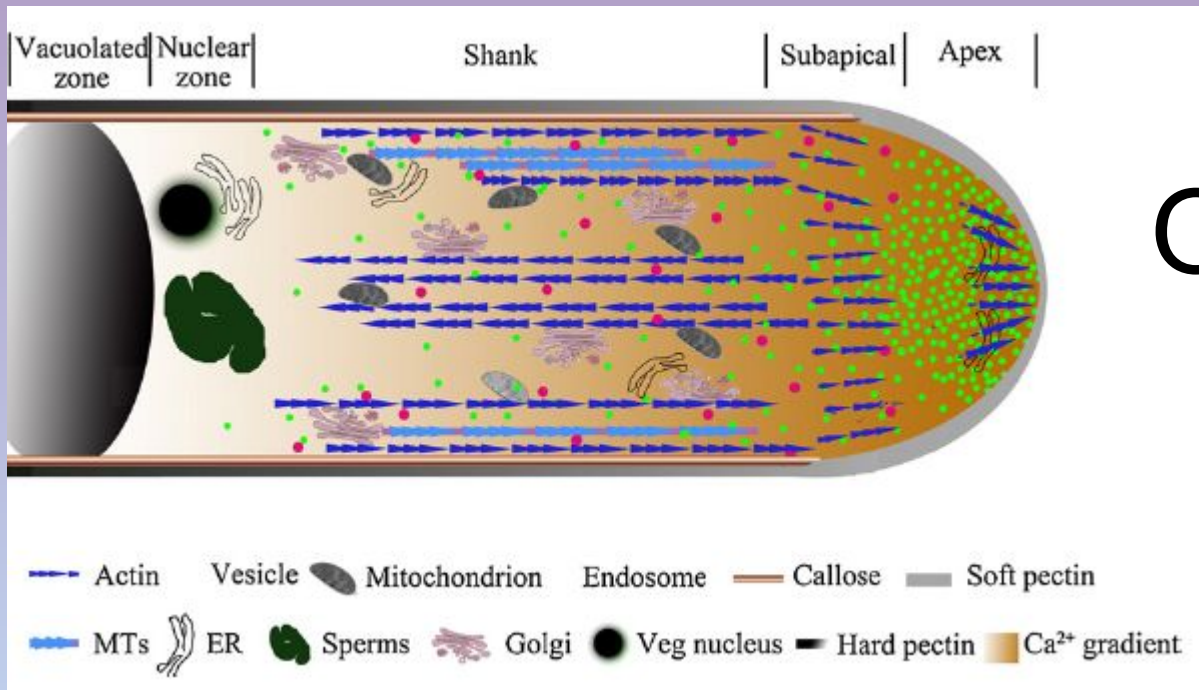


# Реорганизация цитоплазмы

- Вблизи апертуры, через которую выйдет пыльцевая трубка, собираются везикулы Гольджи, митохондрии и короткие цистерны ЭПР, подготавливая строительство новой стенки
- Рибосомы собираются в полисомы, стопки ЭПР распадаются на отдельные цистерны, увеличивается активность аппарата Гольджи.
- К моменту прорастания пыльцевое зерно имеет



- Поляризация и деления микроспоры, формирование оболочки
- Метаболизм, транскриптом и протеом мужского гаметофита
- Дегидратация пыльцевых зерен
- Адгезия и регидратация пыльцевых зерен на рыльце пестика, выбор функциональной апертуры
- Активация пыльцевых зерен
- Цитомеханика стенки пыльцевого зерна и пыльцевой трубки
- Закономерности полярного роста пыльцевой трубки
- Особенности прогамной фазы у голосеменных растений



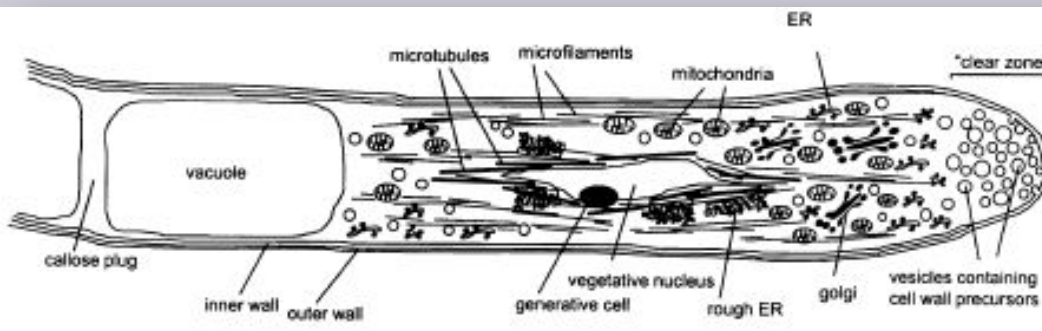
# Основные игроки

- Везикулярный транспорт и движение органелл по цитоскелету: доставка стройматериалов и энергообеспечение
- Клеточная стенка – механическая составляющая
- Ионные градиенты и мембранный потенциал
- ГТФазы и другие компоненты сигнальных каскадов
- АФК

# Полярность структуры

Апикальный рост пыльцевой трубки поддерживается за счет полярной организации цитоплазмы и циклоза.

Пыльцевая трубка разделена на функциональные



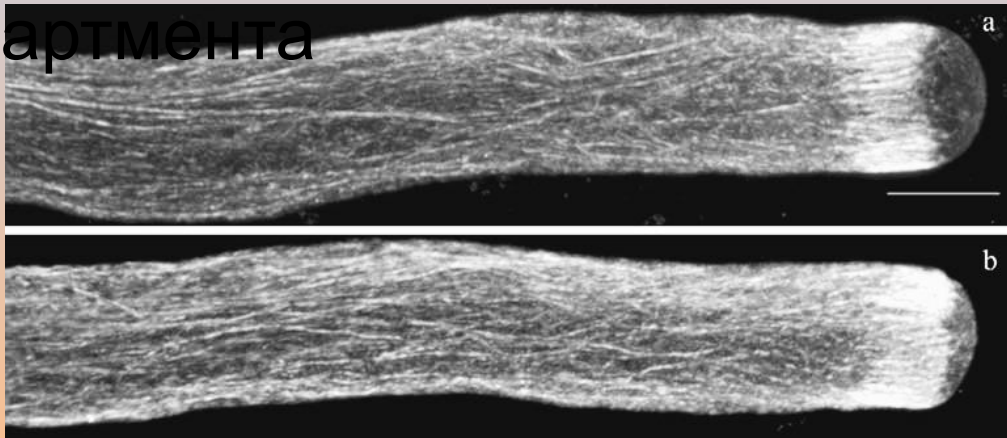
# Функции циклоза

1. Транспорт мужского гаметного модуля (MGU).
2. Транспорт в апекс сигнальных молекул и ферментов для взаимодействия с пестиком.
3. Строительные материалы, включая фосфолипиды, полисахариды, стеночные ферменты.
4. В апексе везикулы доставляются в определенные зоны поверхности, где происходит их экзоцитоз.
5. Эндоцитоз обеспечивает приток в трубку из пестика питательных веществ и сигнальных молекул, поддерживает «уникальность апекса» и правильное соотношение между материалами для строительства стенки и плазмалеммы.



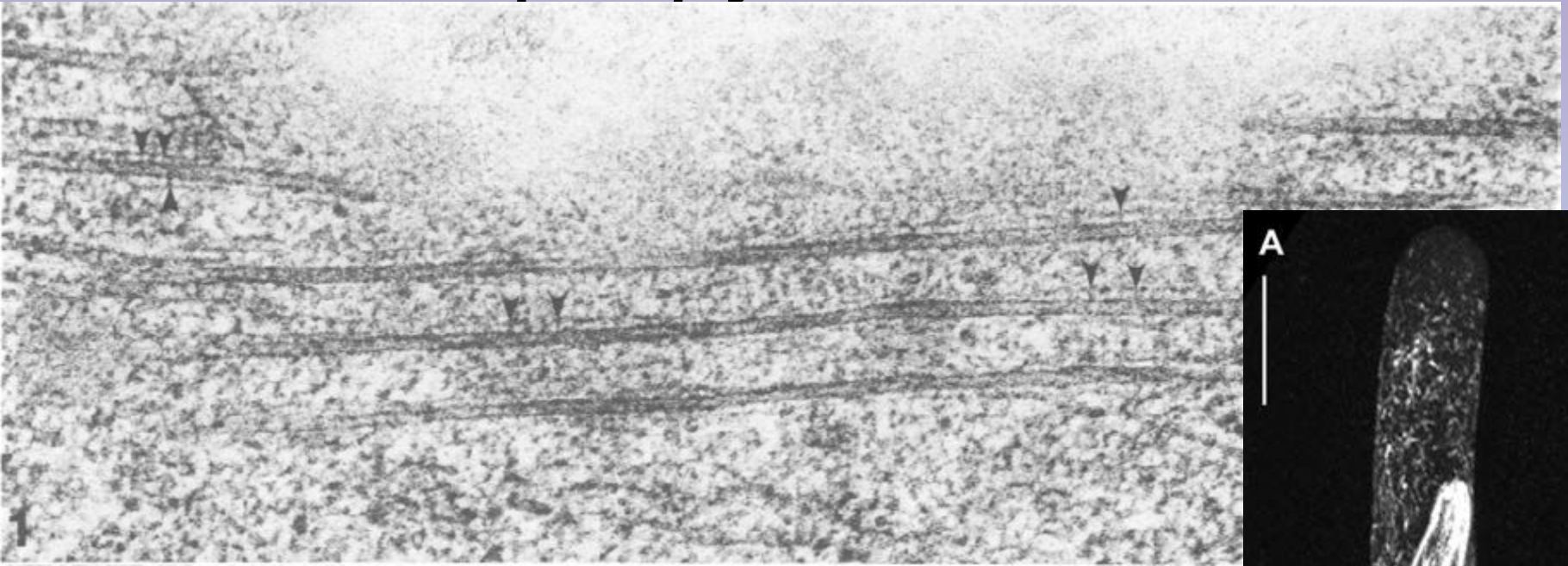
# Микрофиламенты

- Актиновый цитоскелет играет ключевую роль в поддержании полярного роста
- Продольные актиновые тяжи обеспечивают ток цитоплазмы и органелл (циклоз)
- Микрофиламенты взаимодействуют с микротрубочками в процессе доставки мужского гаметного модуля
- Кольцевая структура в субапикальной зоне обеспечивает обособление растущего компартмента

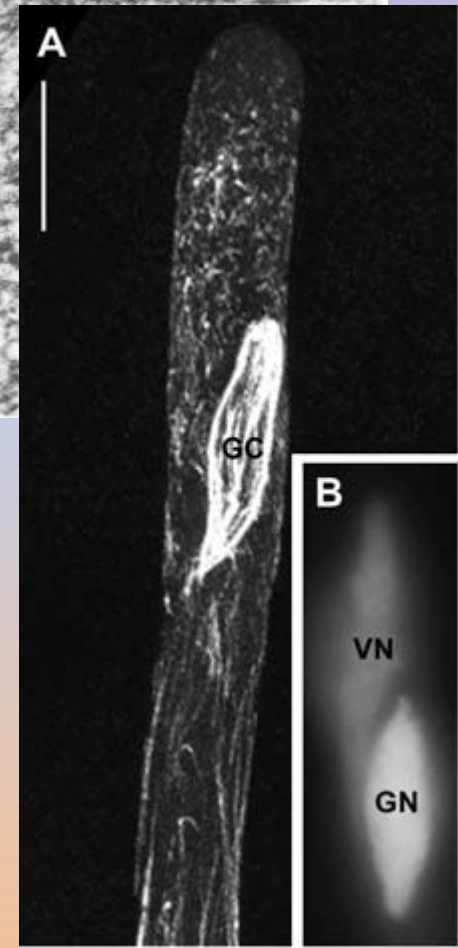




# Микротрубочки

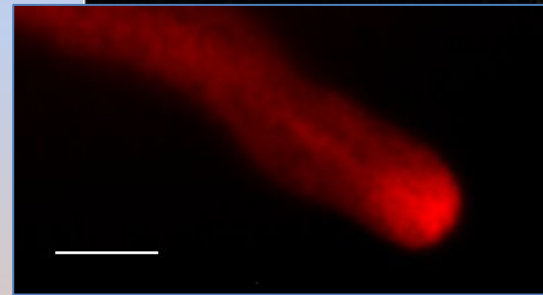
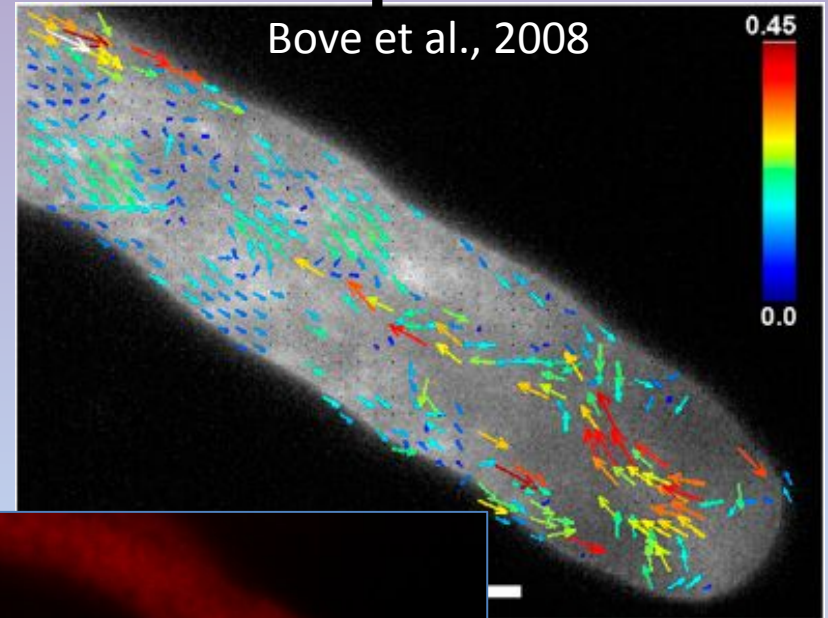


- Играют ключевую роль в доставке мужского гаметного модуля
- У цветковых не участвуют в циклозе
- У голосеменных участвуют в циклозе
- Часто располагается вместе с микрофиламентами, а также образует комплексы с ПМ и ЭПР



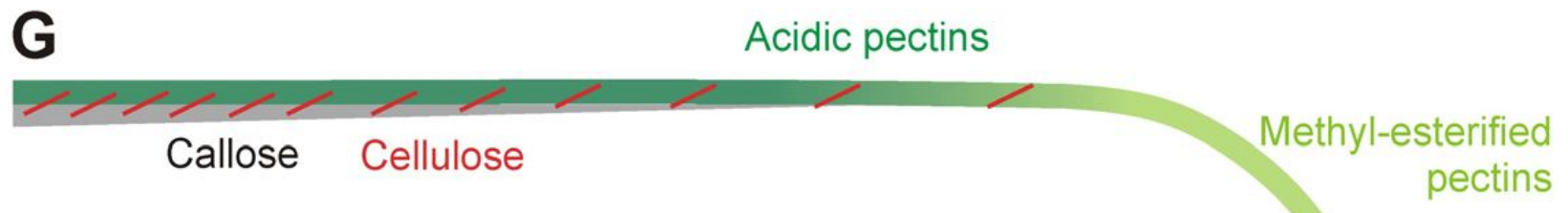
# Везикулярный транспорт

- Везикулы аппарата Гольджи, содержащие материал для строительства апикальной мембраны и стенки, путешествуют в апекс по актиновым филаментам.
- В субапикальной зоне происходит рециклирование мембран (необходимо для поддержания полярности – «уникальность апекса»).
- В кончике трубки



# Клеточная стенка: градиент жёсткости

- Движущей силой для роста является тургорное давление. Однако, оно не является направленной силой, а одинаково в каждой точке. За счет чего же рост становится направленным?
- Механический градиент жесткости обеспечивают компоненты клеточной стенки, в первую очередь, пектины (разной степени сшитости), целлюлоза и каллоза.





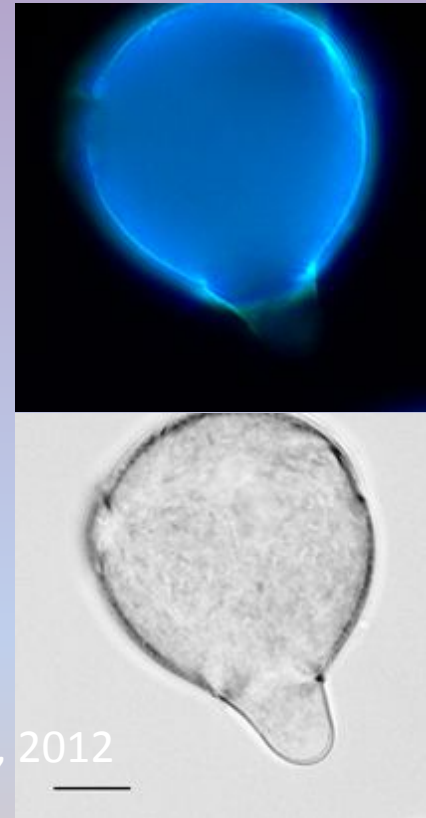
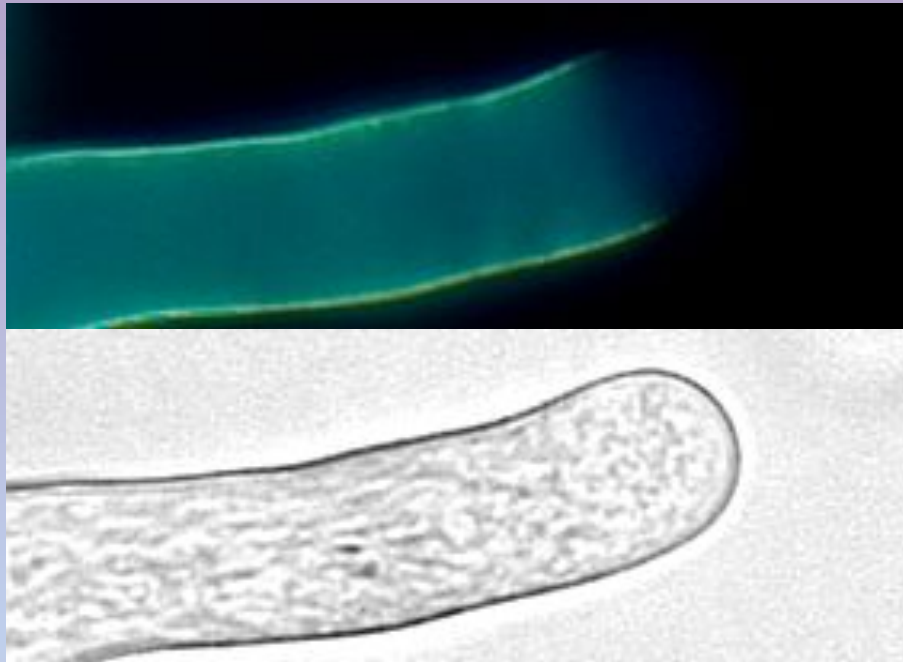
Parre,  
Geitmann, 2005

- Этерифицированные пектины откладываются в кончике трубки в процессе экзоцитоза
- По мере удаления от кончика они деэтерифицируются при участии фермента пектинметилэстеразы (ПМЕ)
- Кальций участвует в образовании сшивок между молекулами пектинов, увеличивая прочность полимерной сети
- Это обеспечивает градиент жесткости от кончика к ПЗ

# Пектины



c Li et al., 1994

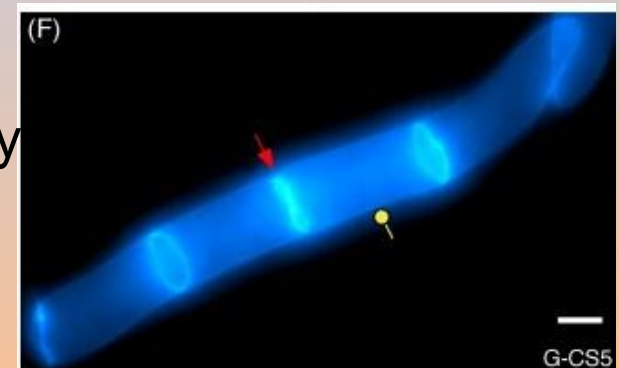


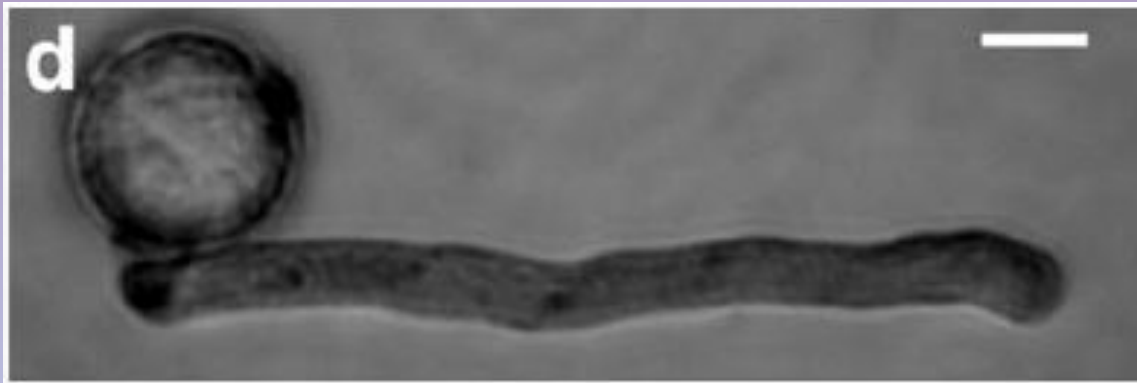
# Каллоза

Breygina et al., 2012

Xie et al., 2012

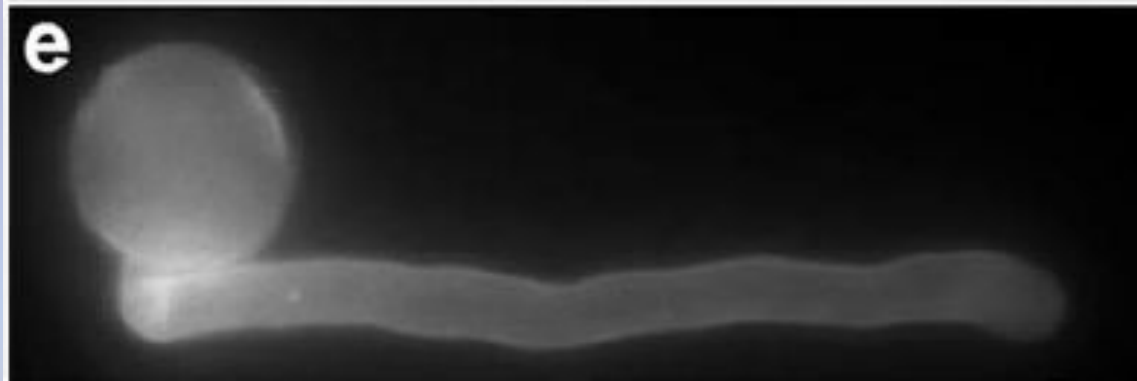
- Отсутствует в кончике
- Появляется на расстоянии 10-30 мкм
- Образует каллозные пробки в длинных тру
- Откладывается в кончике в ответ на стрессовое воздействие





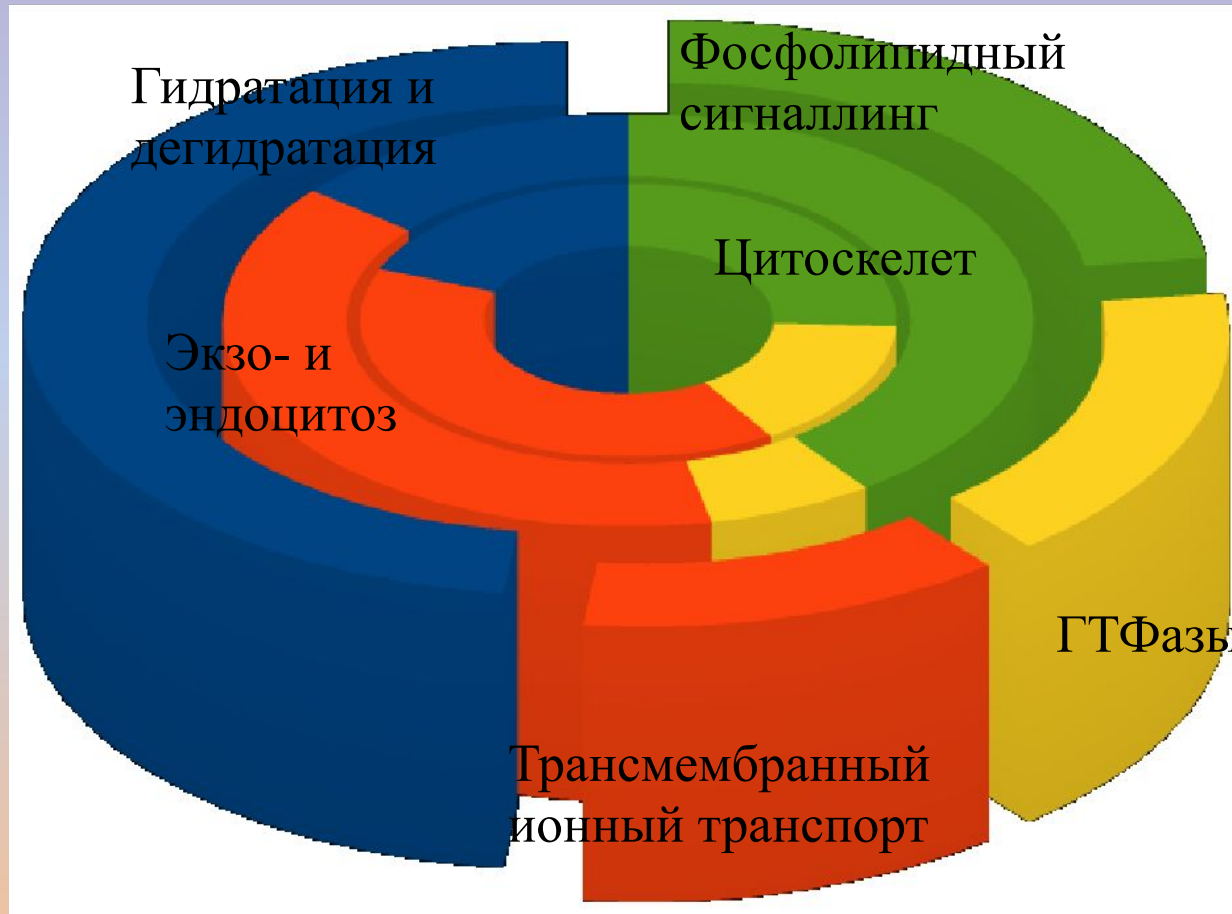
Parre,  
Geitmann, 2005

## Целлюлоза

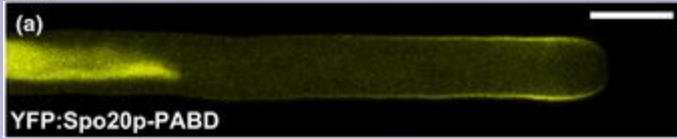


- Жесткий компонент, но его не очень много
- Отложение также неравномерное: в кончике отсутствует, далее постепенно накапливается по направлению к ПЗ.

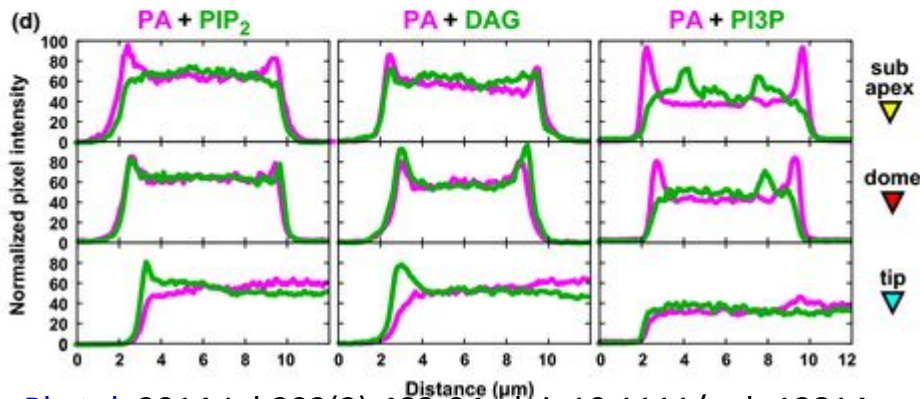
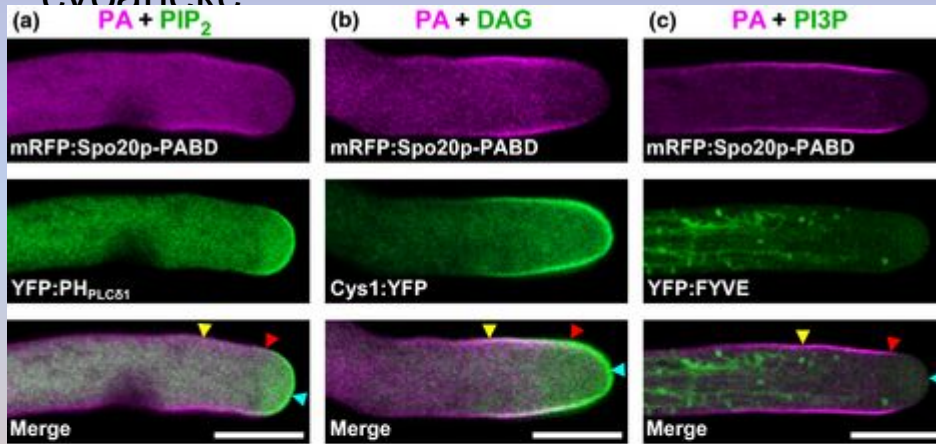
# Универсальные регуляторные механизмы



# Регуляторные механизмы: фосфолипиды

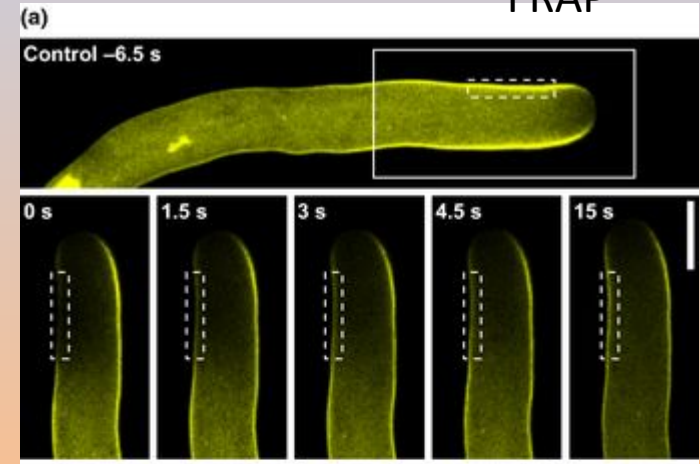


Фосфатидная к-та -  
субапекс



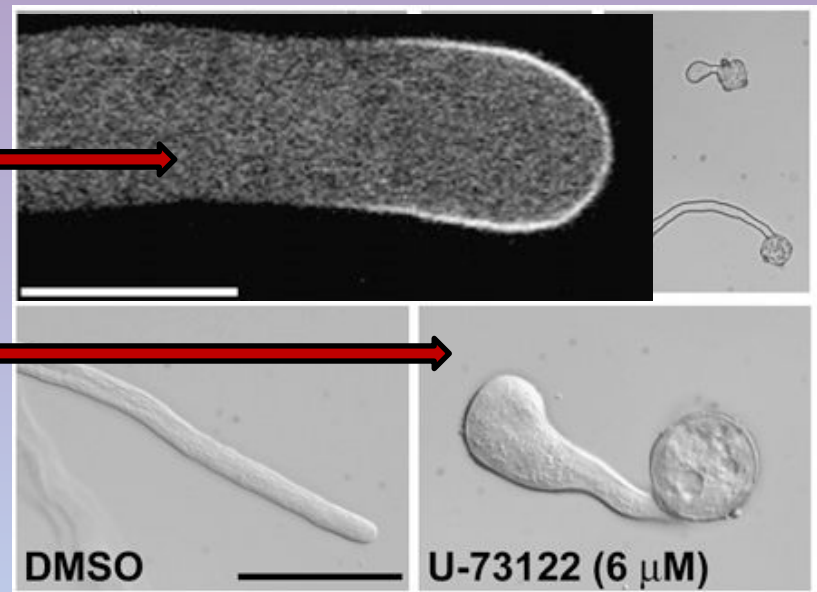
- Фосфатидная кислота сосредоточена в субапикальной плазмалемме, т.е. в зоне расположения актинового кольца.
- Фосфатидилинозитолди фосфат ( $PIP_2$ ) локализован в плазмалемме апекса трубки.

FRAP

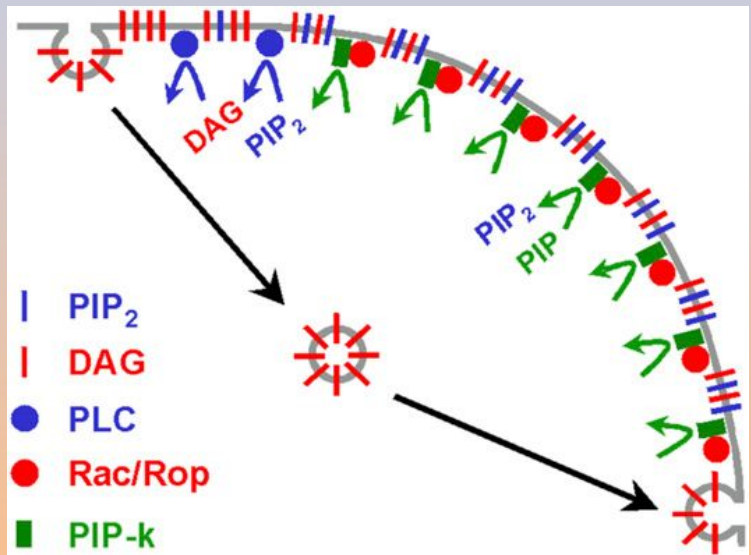




- Его узкая локализация обеспечивается белком phosphatidylinositol transfer protein (PITP) и фосфолипазой C (PLC), которая режет PIP<sub>2</sub> с образованием инозитол-3-фосфата (IP<sub>3</sub>) и диацилглицерола (DAG)
- Этот процесс необходим для поддержания ионных градиентов и полярной структуры актиновых тяжей (через регуляцию актин-связывающих белков).



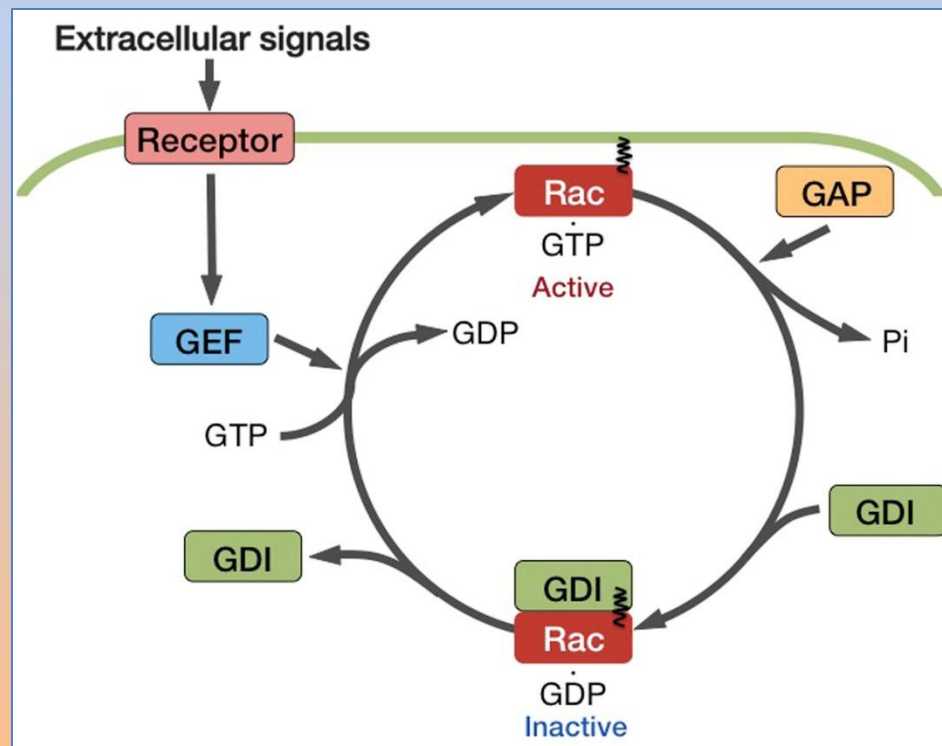
Helling et al., 2006



Регуляторные механизмы: фосфолипиды

# ROP ГТФазы и рецепторные киназы

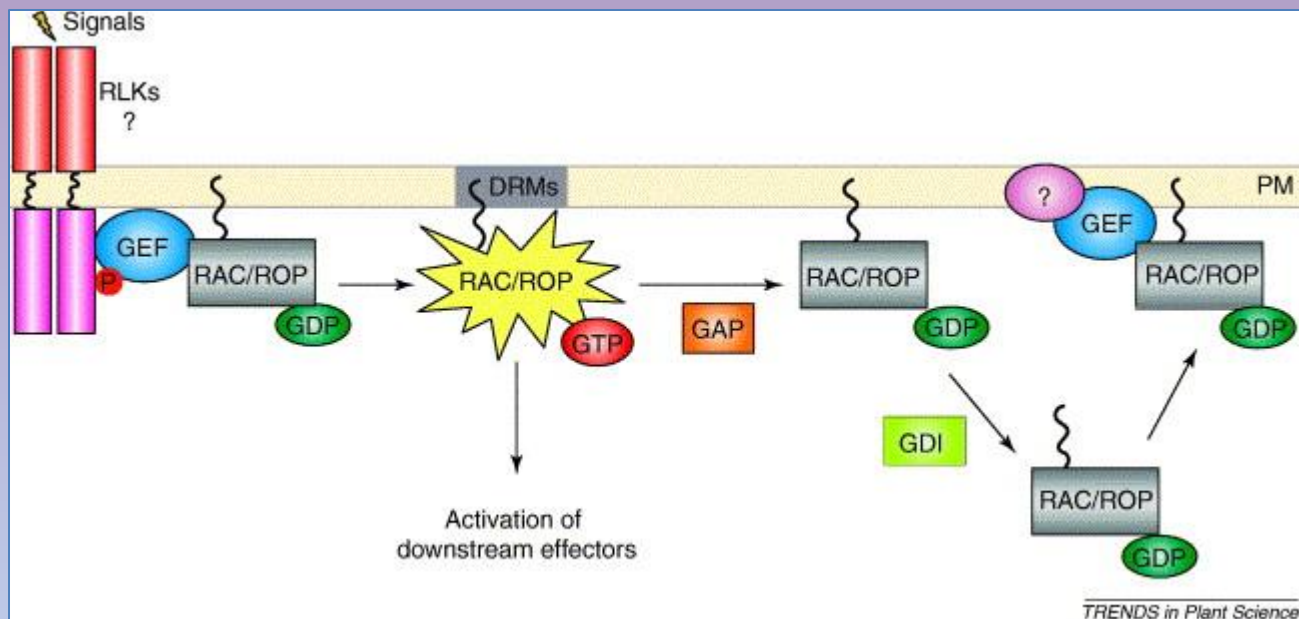
- В клетках растений основную роль играют мономерные (малые) G белки (20-30 кДа).
- Эти ГТФазы циклически переходят из неактивной цитозольной формы (G-ГДФ) в активную форму (G-ГТФ), связанную с мембраной



Guanine nucleotide exchange factor

GTPase-activating protein

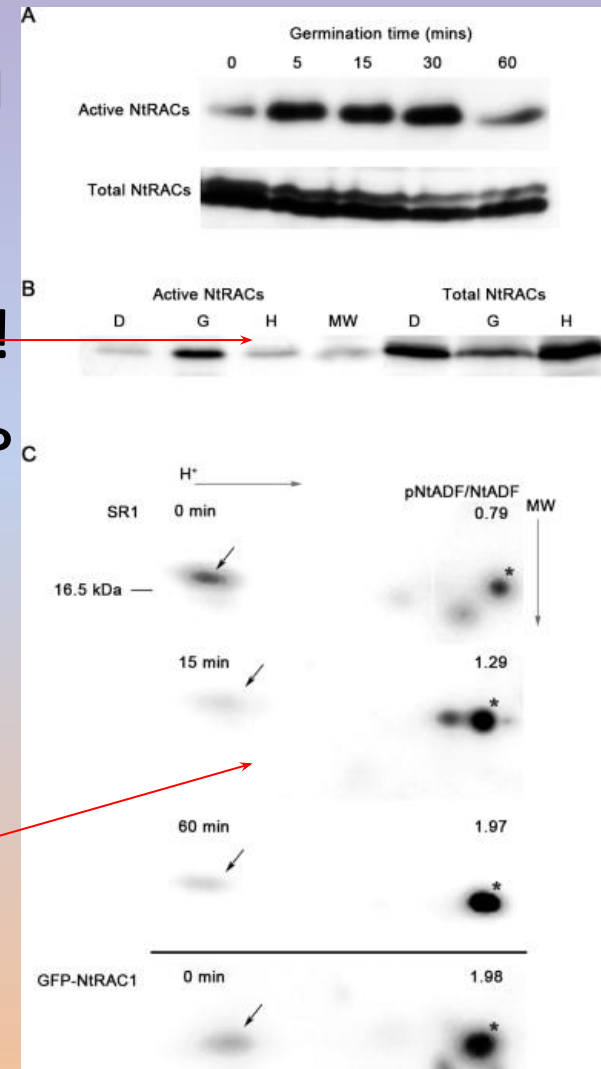
Guanine nucleotide dissociation inhibitor



- Малые ГТФазы, обозначаемые как **Rac/Rop** или **ROP** (Rho of plants) выполняют функции клеточных хабов – центральных переключателей и интеграторов сигналов.
- В качестве мишеней для активированных ГТФаз могут, в частности, служить белки, связанные с функционированием **цитоскелета** и **везикулярным транспортом**.

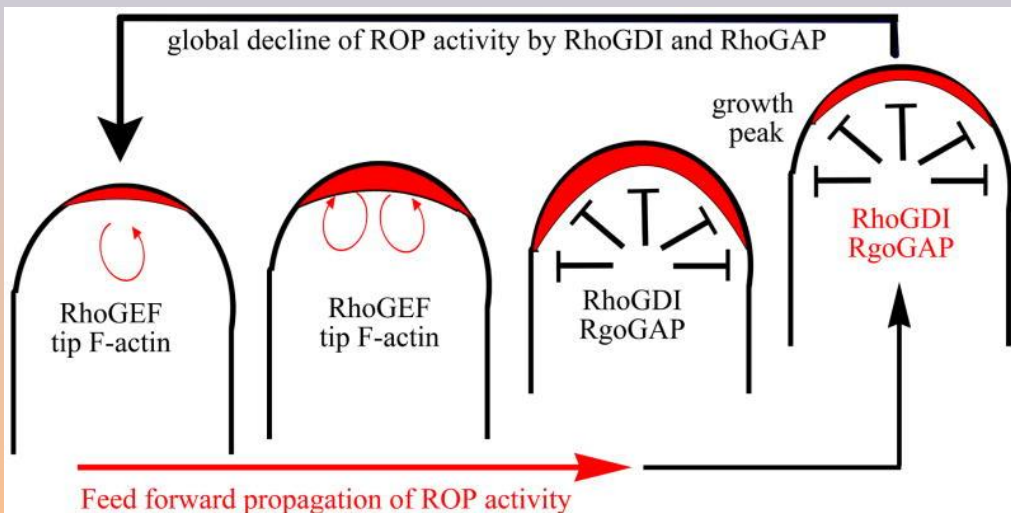
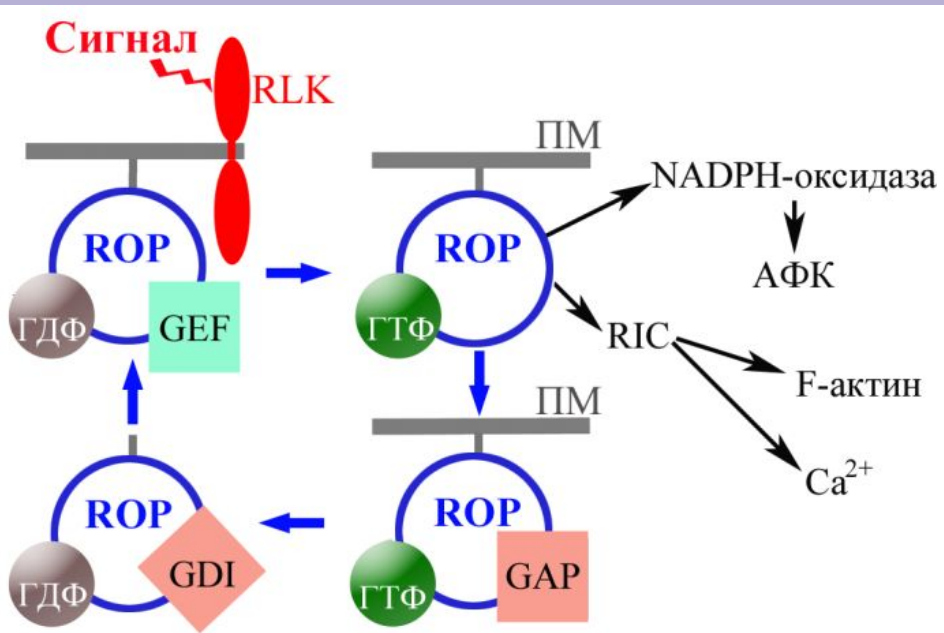
# RAC/ROPs и начальные стадии прорастания

- Активация пыльцы как *in vitro*, так и *in vivo* сопровождается активацией ROP ГТФаз (NtRAC).
- В чистой воде этого не происходит!
- В условиях *in vitro* высокий уровень активированных ГТФаз поддерживается на протяжении 30 мин, после чего снижается примерно к 60 мин.
- Одной из мишеней этих белков в данном случае является актиндеполимеризующий фактор ADF.



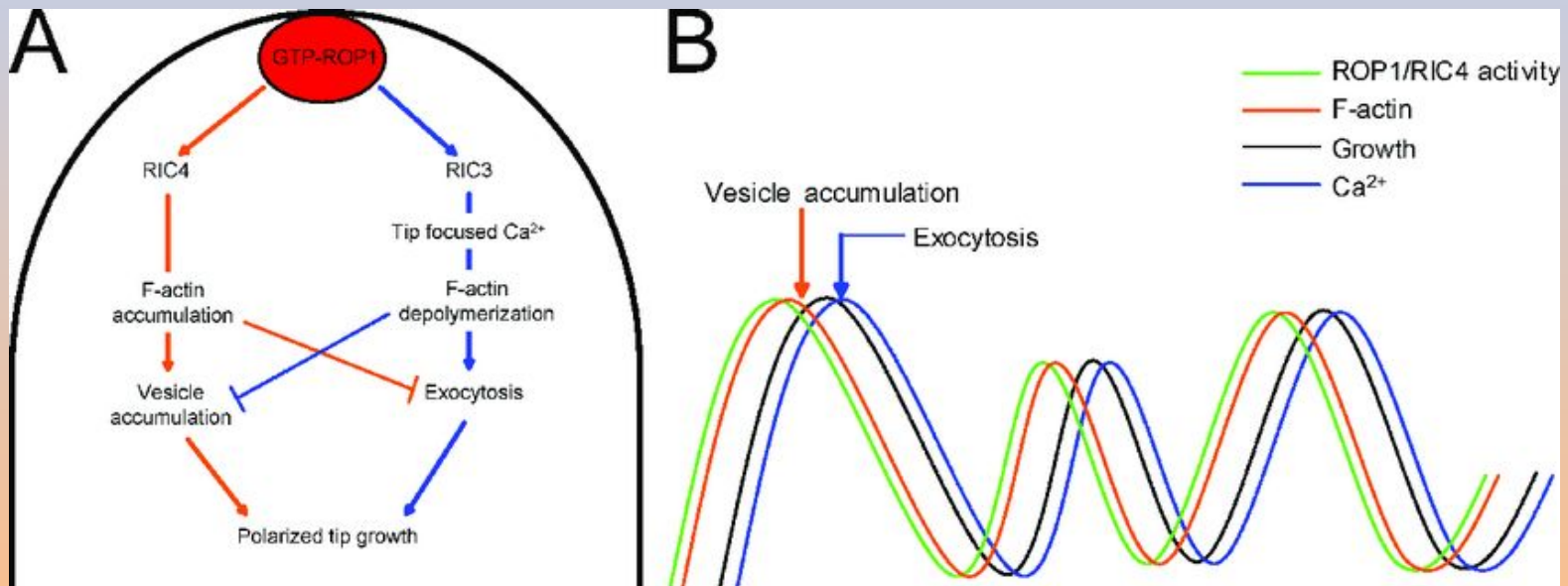
# Регуляция по принципу обратной СВЯЗИ

- Рецепторная киназа RLK активирует фактор обмена нуклеотидов GEF, ROP переводится в активное состояние.
- Отрицательную обратную связь осуществляют две группы белков:
- GAP (GTPase-Activating Protein) – белки, стимулирующие ГТФазную активность, – переводят ROP в неактивное состояние.
- GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) удерживают неактивный белок ROP1 в цитозоле



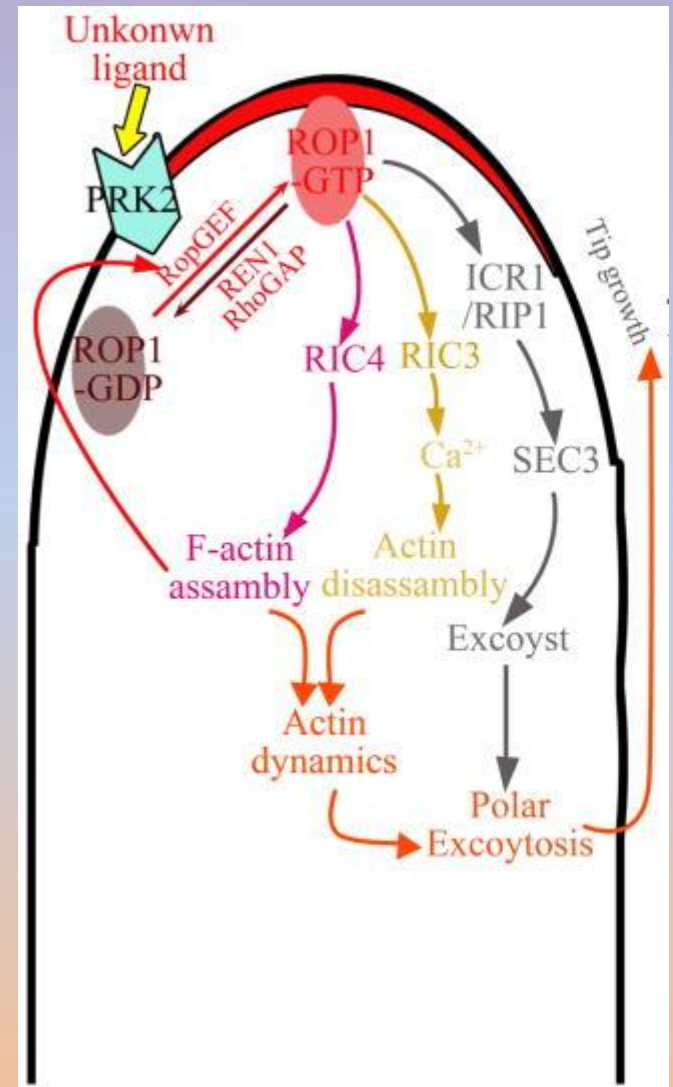
# ROP1 в трубке

- В растущей пыльцевой трубке специфичная для пыльцы ГТФаза ROP1 локализована преимущественно в апикальной плазмалемме.
- Экспериментальный сдвиг баланса активации ROP1 в ту или другую сторону приводит к полной остановке роста (снижение) или вызывает расширение кончика (повышение)



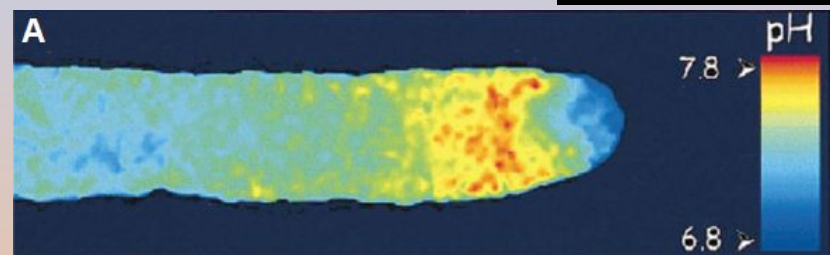
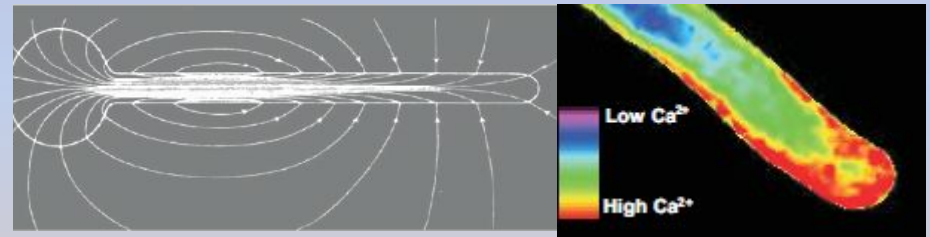
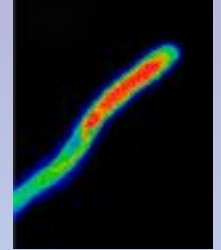
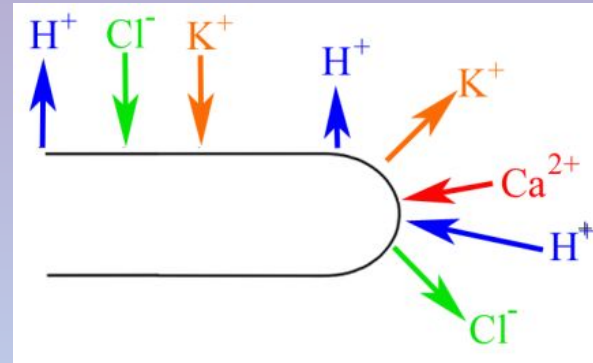
# Эффекторные белки

- Путь, идущий через RIC4, приводит к сборке актиновых микрофибрилл и контролирует накопление везикул, несущих материалы для апикального роста.
- Путь RIC3 активирует накопление кальция в кончике пыльцевой трубки, стимулирует деполимеризацию актина и слияние везикул с плазмалеммой.
- Эти два пути согласованно работают, регулируя динамику F-актина и экзоцитоз.



# Ионная регуляция

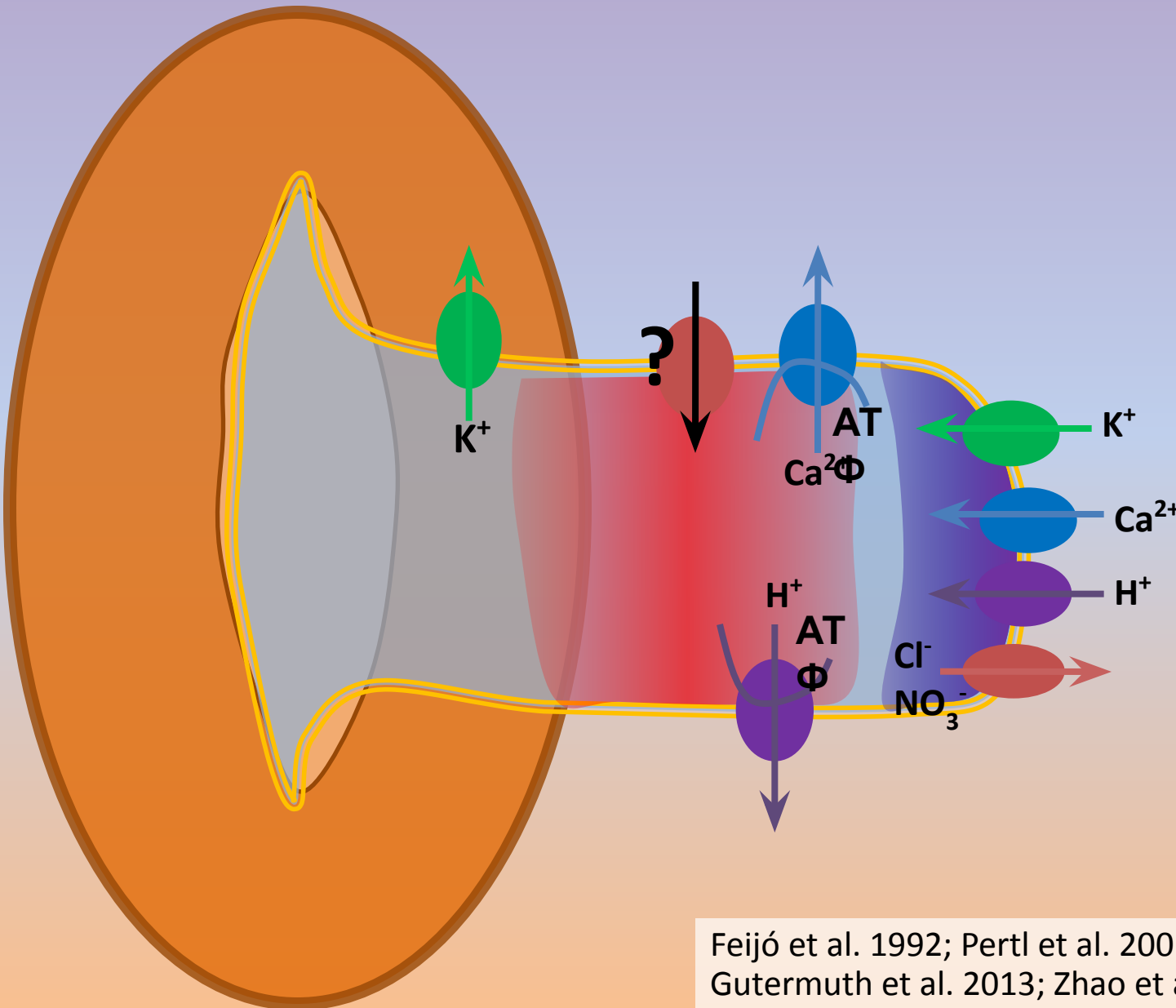
- Таким образом, пыльцевая трубка – прекрасная модель для изучения ИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РОСТА, которая включает в себя
- Работу ионных каналов и помп
- Их дифференциальную регуляцию
- Градиенты концентрации ионов в цитоплазме
- Электрическое поле и мембранный потенциал



Michard E. et al. 2009. *Int. J. Dev. Biol.* 53: 1609-1622; Gutermuth T. et al., 2013. *Plant Cell.* 25: 4525.



# Основные закономерности прорастания и роста пыльцевого зерна: ионный статус



Ряд известных белков, обеспечивающих транспорт ионов:

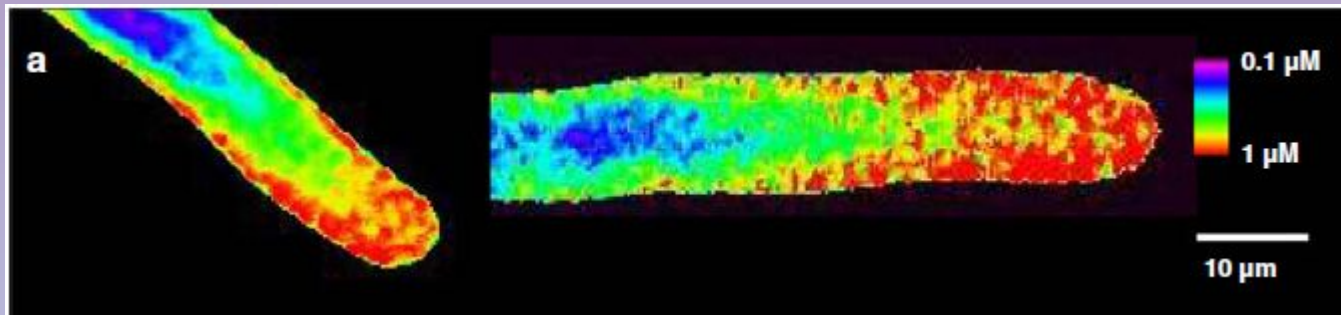
ACA9

SPIK, TPC1

CNGC7, CNGC8, CNGC9, CNGC10, CNGC16, CNGC18, GLR1.2, GLR1.3, GLR2.1, GLR3.3, GLR3.7, GLR1

SLAH3, SLAC1, ALMT12, CLCC, CLCD

Feijó et al. 1992; Pertl et al. 2001; Hepler et al. 2006; Gutermuth et al. 2013; Zhao et al. 2013

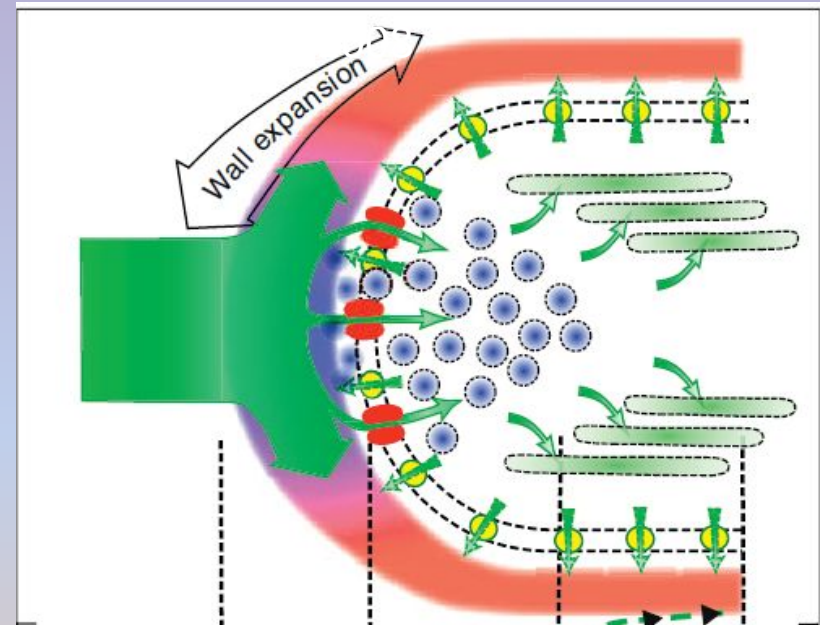


Hepler, 2012

# Регуляторные механизмы: кальций

- Кальций входит в кончике трубки через каналы , а в субапикальной области входит в органеллы и выкачивается через ПМ с помощью помпы.
- Таким образом, поддерживается крутой градиент его концентрации в апикальной зоне
- Кальций – центральный регулятор роста, с нарушением градиента рост прекращается

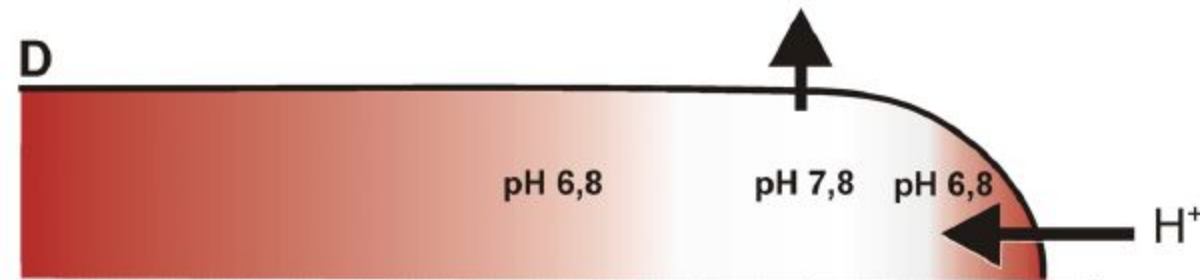
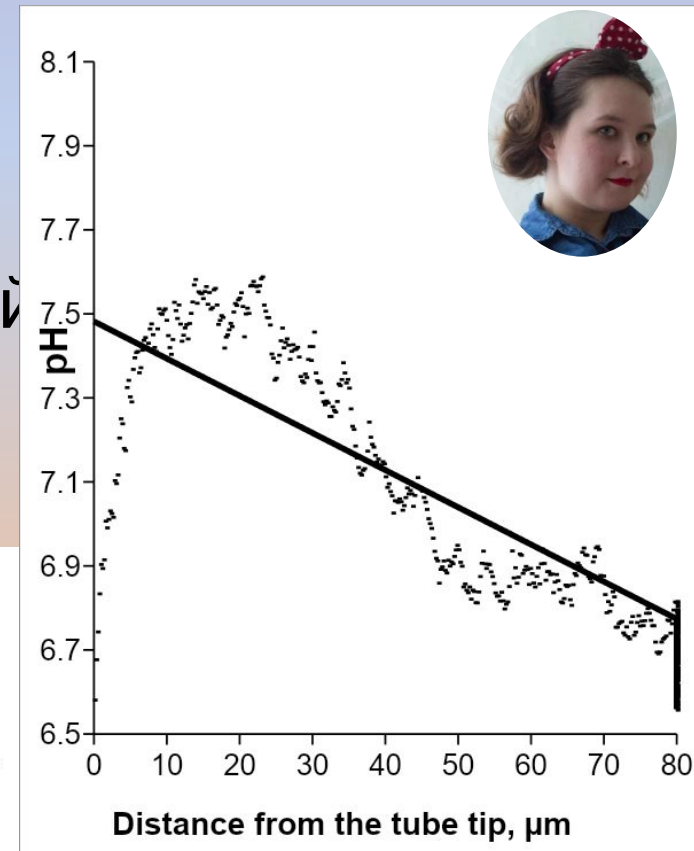
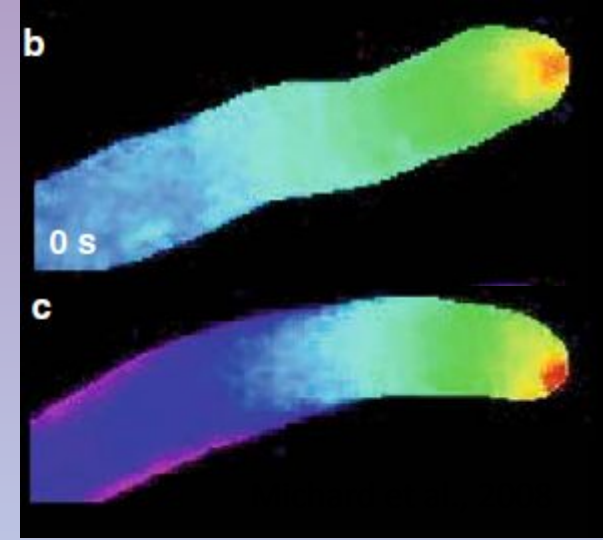
- Кальциевый градиент определяет место слияния везикул с ПМ и, таким образом, задает направление роста
- Кальций регулирует динамику актиновых филаментов через Ca-чувствительные актин-связывающие белки (ABPs),
- Кальций модулирует активность Ca-зависимых протеин-киназ (CDPKs)



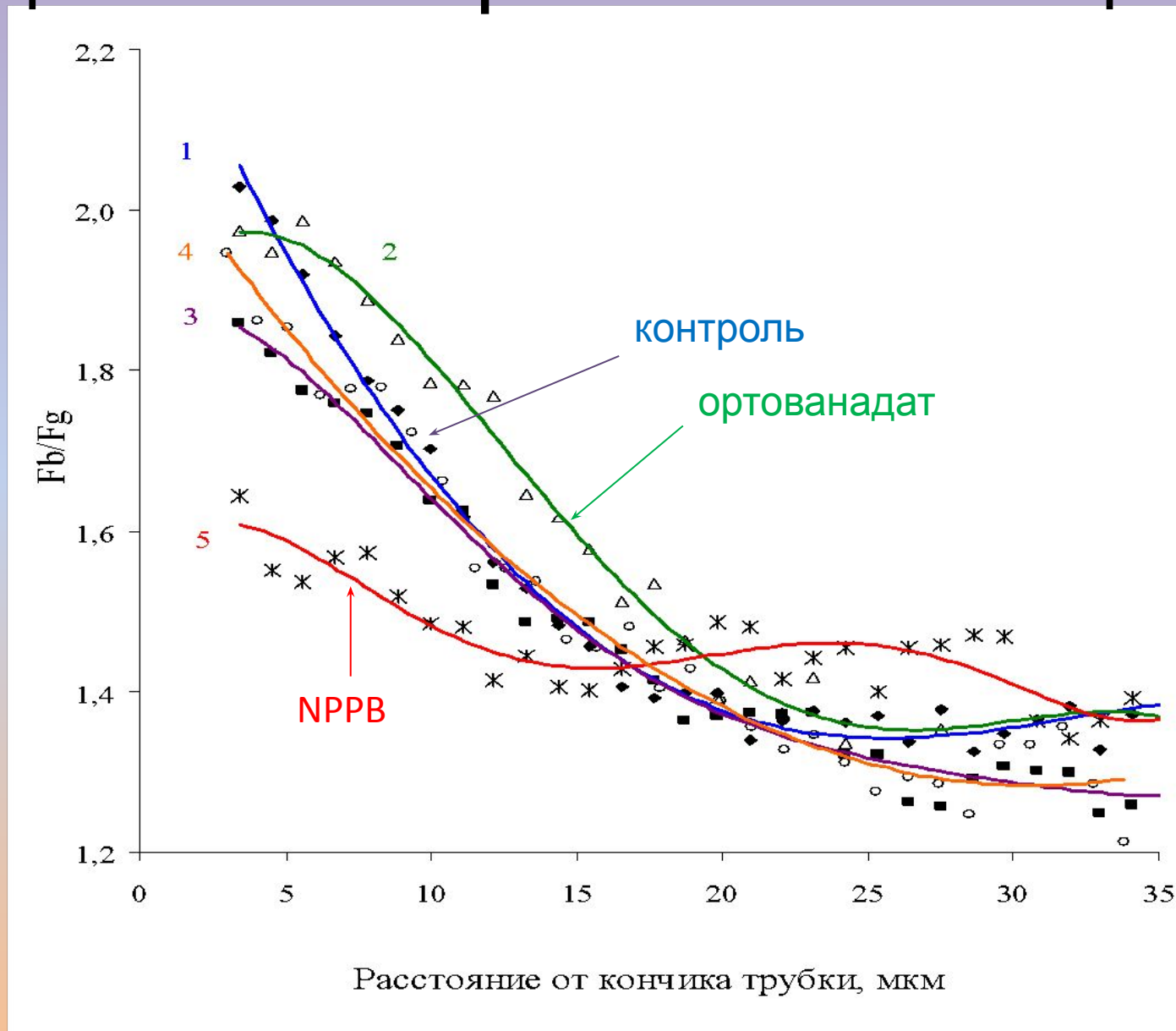
Регуляторные  
механизмы:  
кальций

# Протонный градиент

- В кончике pH кислый, протоны входят в цитоплазму, предположительно, через неспецифичные катионные каналы. Кислый кончик присутствует только в растущих трубках.
- В субапикальной зоне обнаружен «щелочной пояс», именно в этой зоне работают  $H^+$ -АТФазы, выкачивающие протоны. Присутствует даже в нерастущих



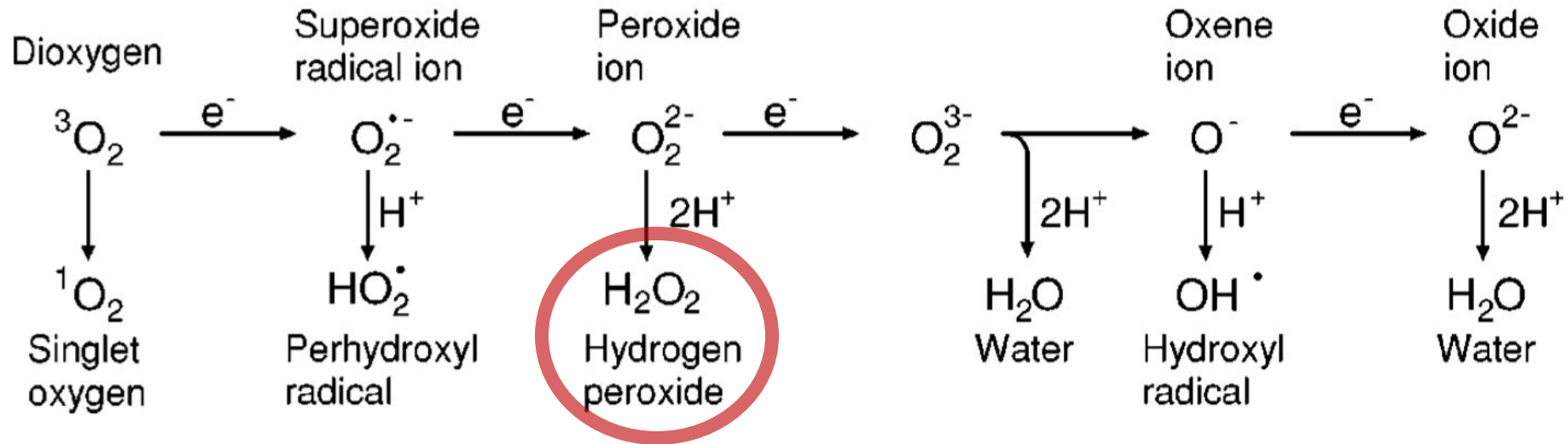
# Градиент мембранного потенциала



ДФК  ионный транспорт ?

- ДФК в прогамной фазе оплодотворения, по-видимому, могут передавать сигнал и регулировать рост. Но как?
- В соматических клетках ключевыми мишенями для ДФК являются ионные каналы:  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{K}^+$ .

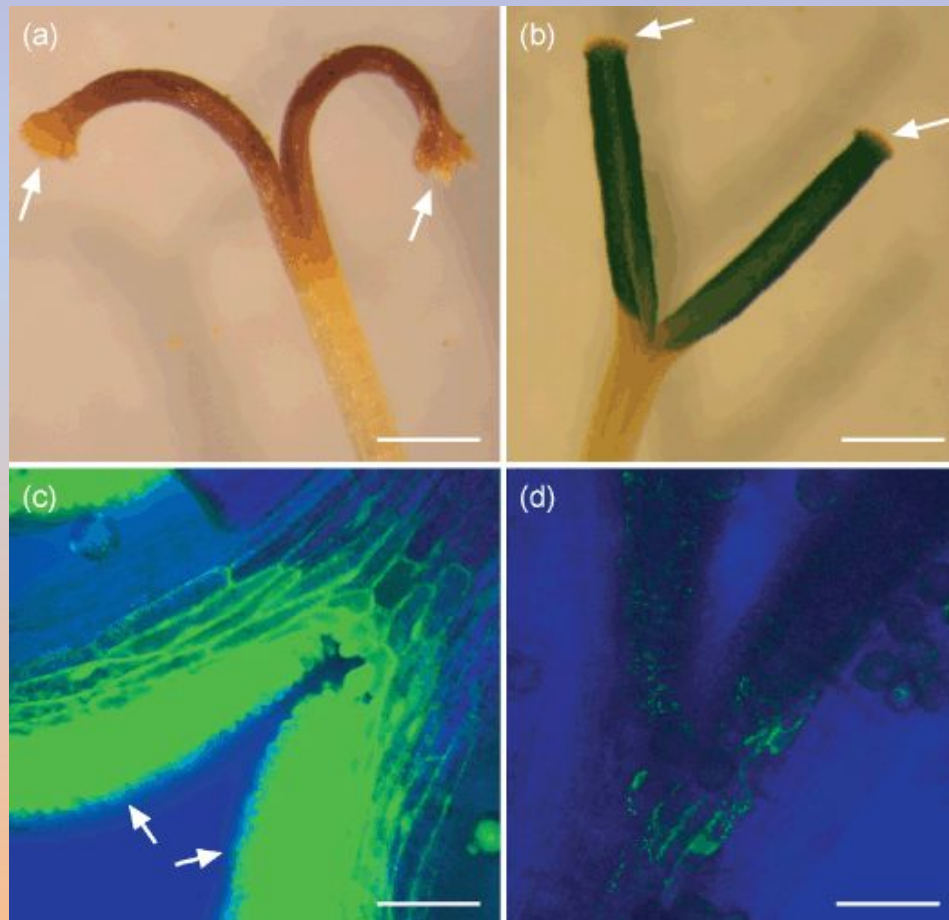
# Активные формы кислорода (АФК)



**Активные формы кислорода (АФК)** - высокореакционные, метастабильными агенты (молекулы, ионы, радикалы), обладающие избыточной энергией по отношению к молекулярному триплетному кислороду ( $^3\text{O}_2$ ).

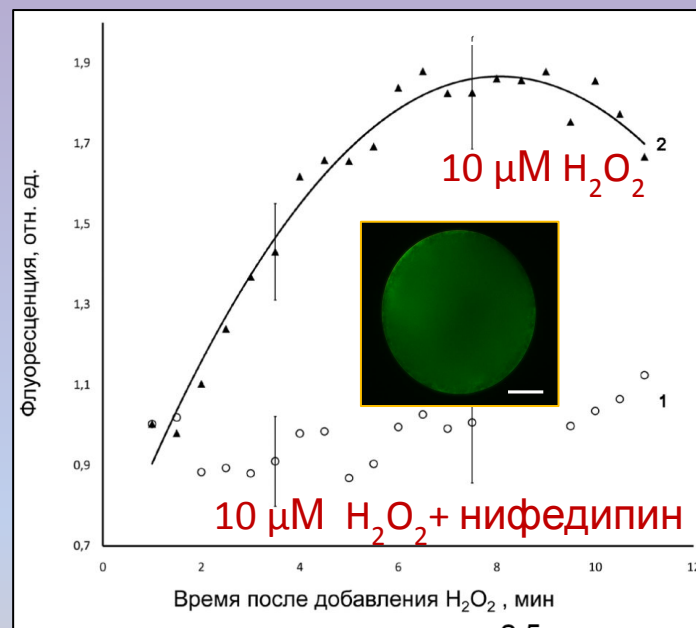
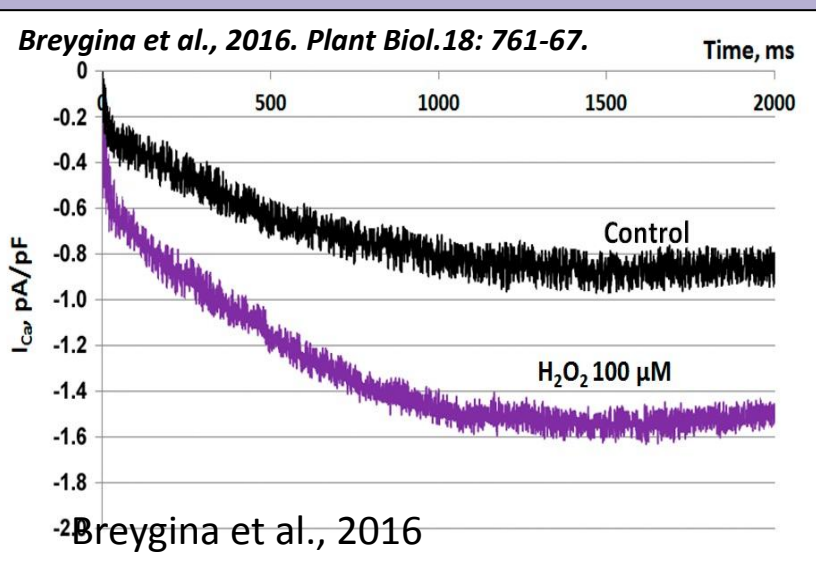
# АФК и пероксидазы на рыльце

Пероксидазы и АФК накапливаются при подготовке к опылению.

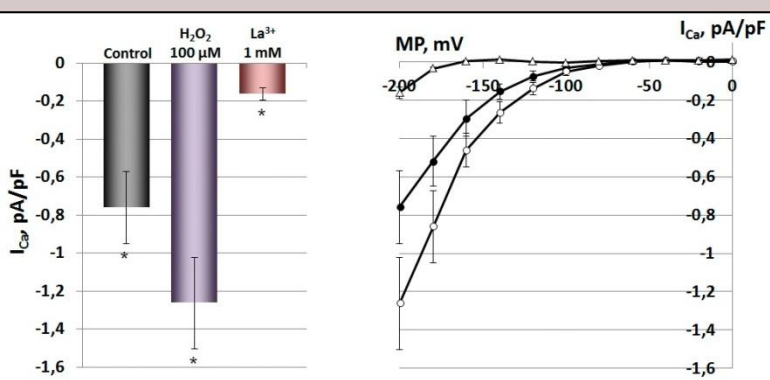




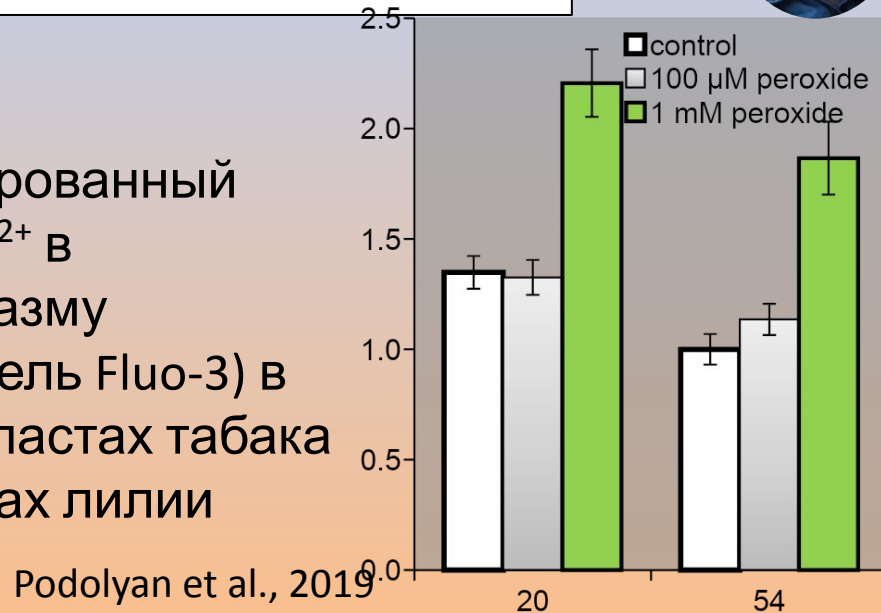
# ДФК как сигнал: $H_2O_2$ активирует $Ca^{2+}$ ток и вход $Ca^{2+}$ в цитоплазму



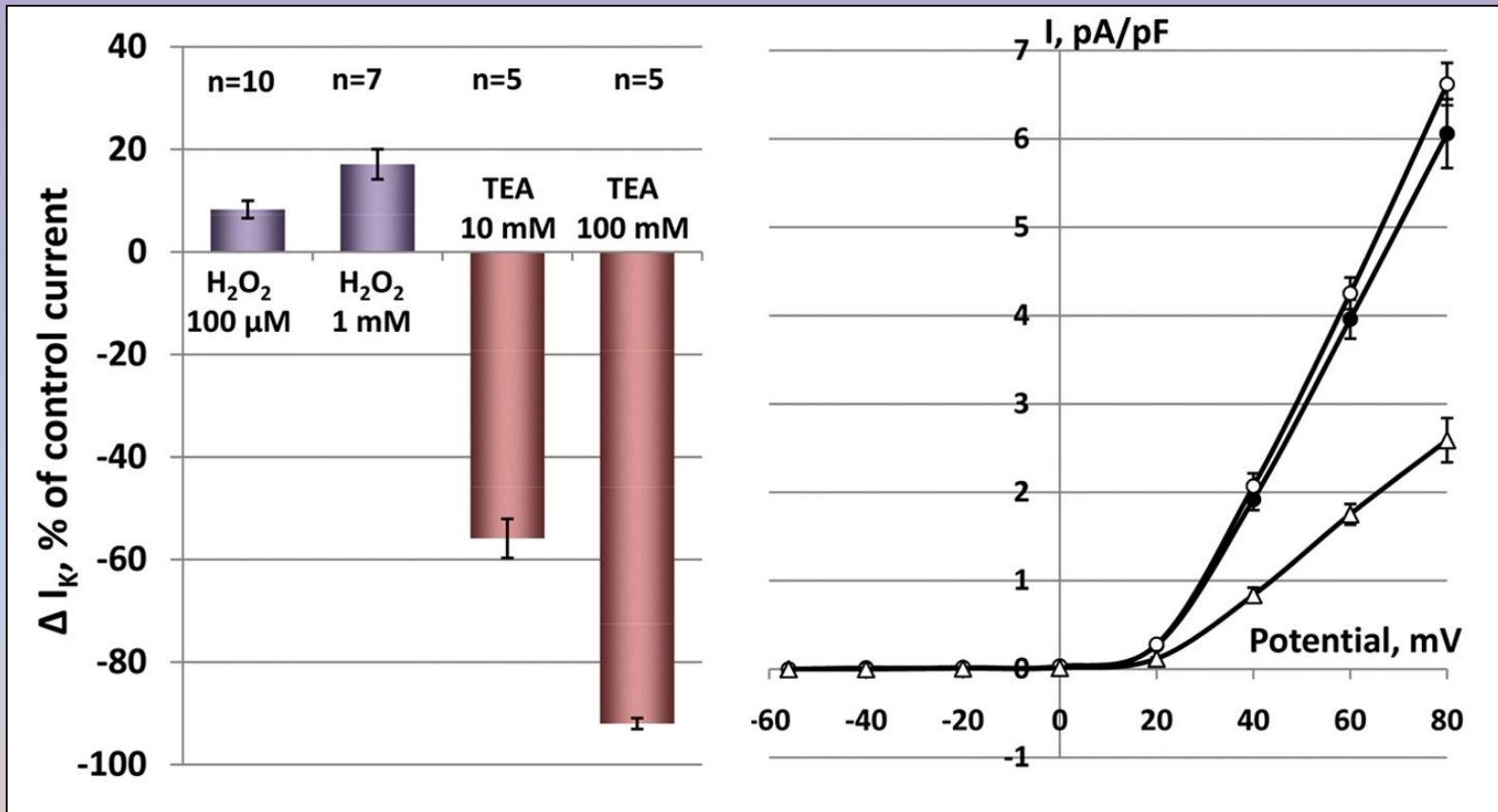
## $H_2O_2$ -активируемый входящий $Ca^{2+}$ ток в протопластах лилии



$H_2O_2$ -индуцированный вход  $Ca^{2+}$  в цитоплазму (краситель Fluo-3) в протопластах табака и трубках лилии



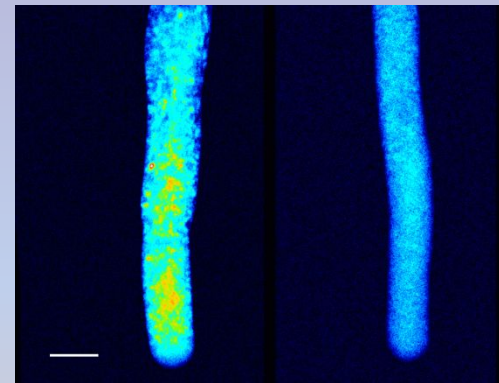
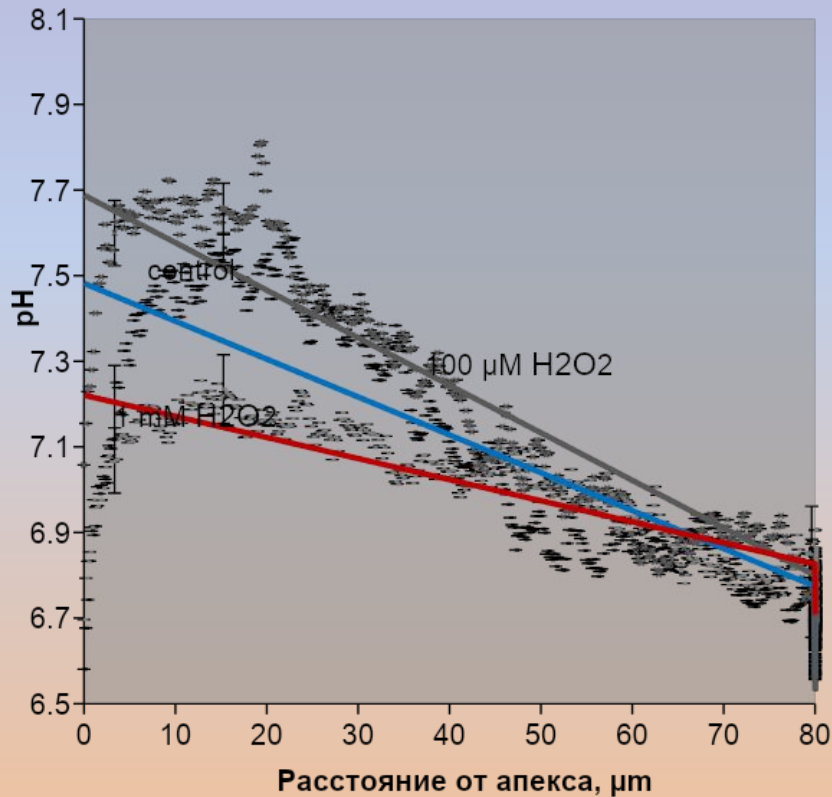
# АФК как сигнал: $H_2O_2$ активирует ток $K^+$



Сравнение средней плотности тока при (в % от контроля).  $H_2O_2$  – активирует  $K^+$  ток; TEA – ингибитор  $K^+$  каналов, блокирует ток. Все отличия достоверны ( $p < 0.05$  критерий Уилкоксона).

Средние вольт-амперные характеристики выходного  $K^+$  тока.

# АФК как сигнал: $H_2O_2$ убирает в трубках «щелочной поясок»



контроль

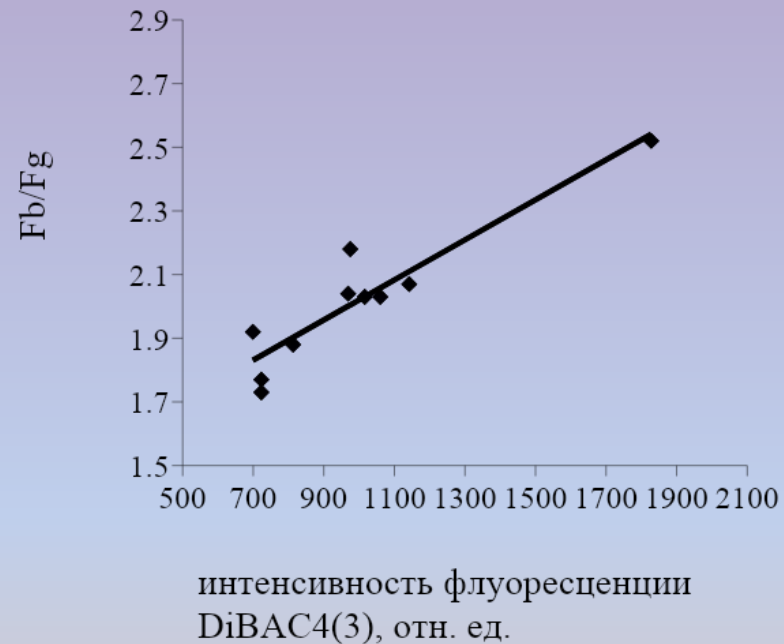
$H_2O_2$

- В растущих трубках лилии вслед за массивным входом кальция происходит сглаживание градиента pH, что указывает на ингибирование  $H^+$ -АТФазы

# Два оптических метода оценки $E_m$

## Ратиометрический быстрый краситель Di-4-ANEPPS:

- ✓ Съёмка в двух каналах при возбуждении синим (Fb) и зелёным (Fg) светом – нет зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации красителя;
- ✓ Не выцветает и быстро реагирует на изменения – позволяет регистрировать динамику.

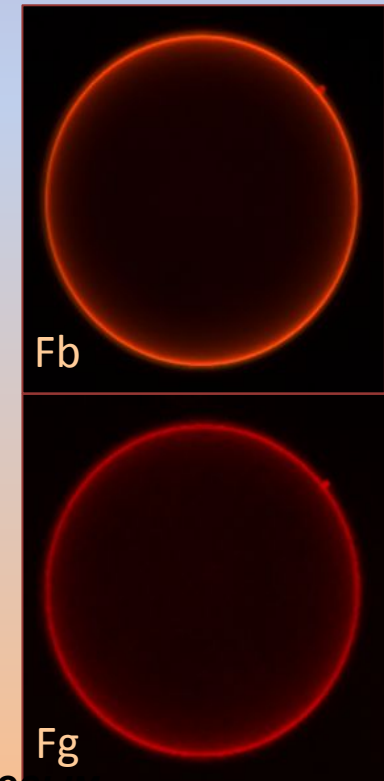
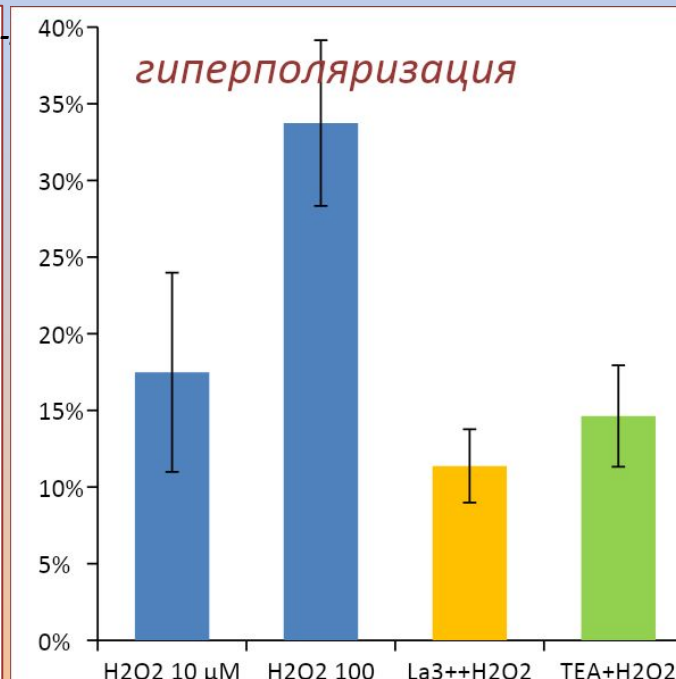
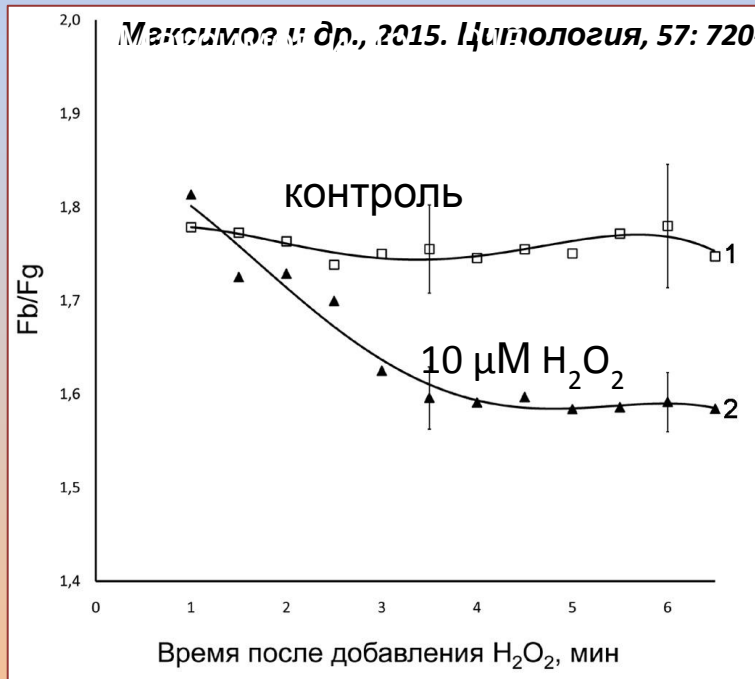
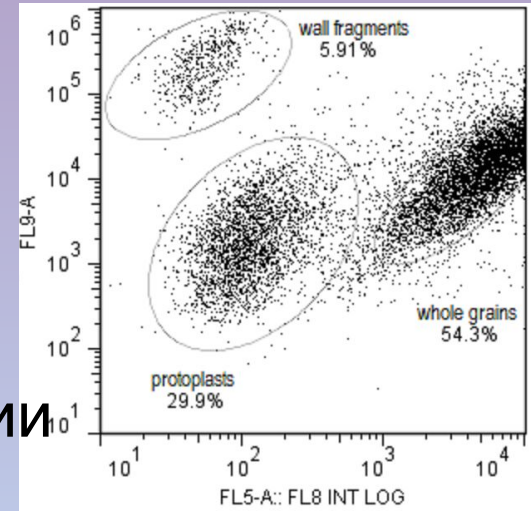


## Медленный краситель DiBAC<sub>4</sub>(3):

- ✓ позволяет определить абсолютные значения  $E_m$  (расчет ведется относительно полностью деполяризованных клеток)
- ✓ Прост в использовании: позволяет работать с большими популяциями клеток, набирая статистические данные.

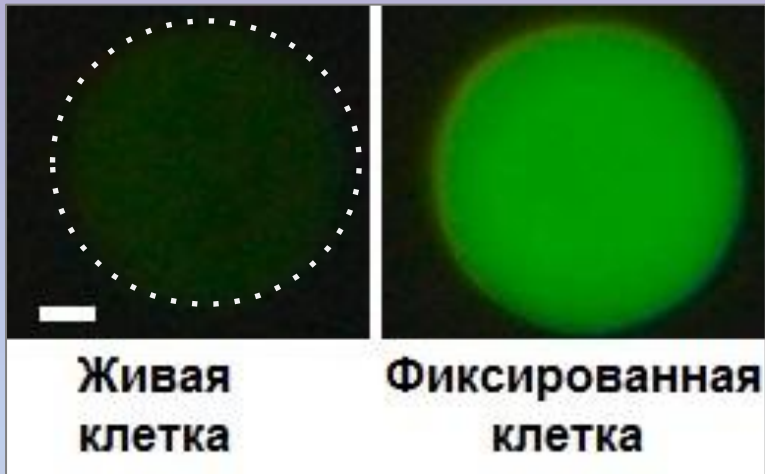
# ДФК как сигнал: $H_2O_2$ вызывает гиперполяризацию

- Количественная флуоресцентная микроскопия: динамика эффекта
- Проточная цитометрия с красителем DiVAS<sub>4</sub>(3): исследование большой популяции протопластов

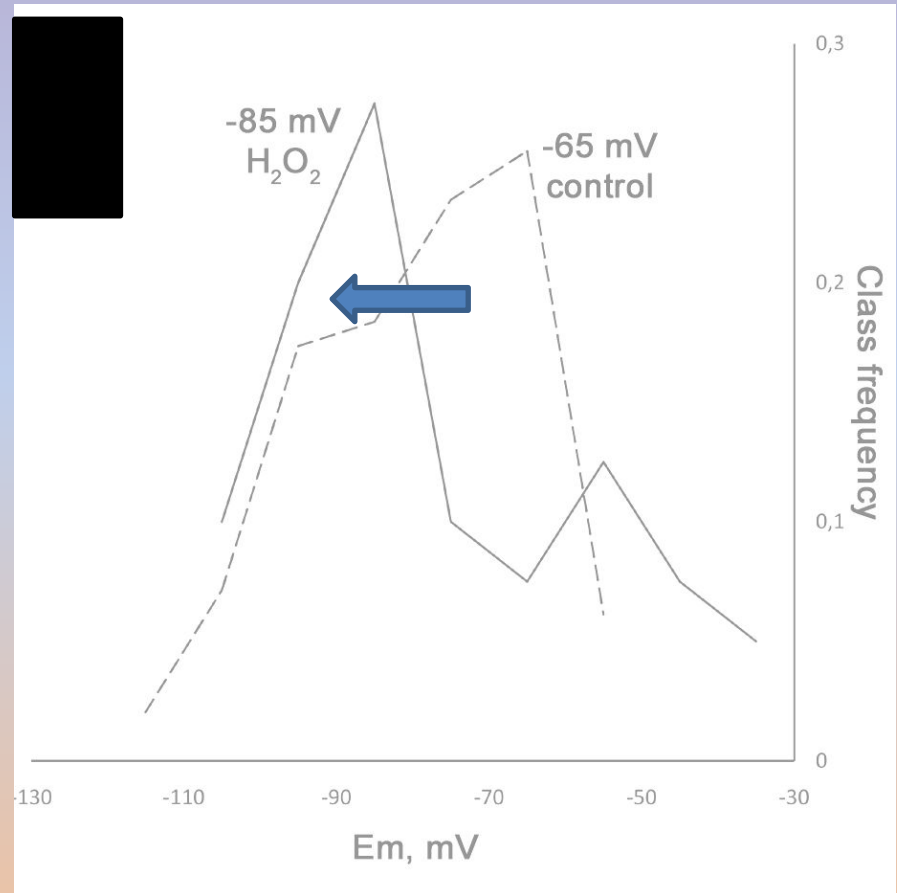


Данные получены в сотрудничестве с Е.Шиловым

# АФК как сигнал: $\text{H}_2\text{O}_2$ вызывает гиперполяризацию

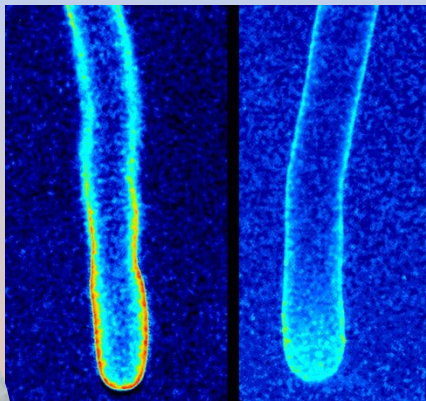


После 10 минут инкубации происходит достоверное смещение популяции в область более отрицательного потенциала.



# АФК как сигнал: $H_2O_2$ вызывает гиперполяризацию

- Количественная флуоресцентная микроскопия с красителем di-4-ANEPPS: интактные растущие трубки лилии

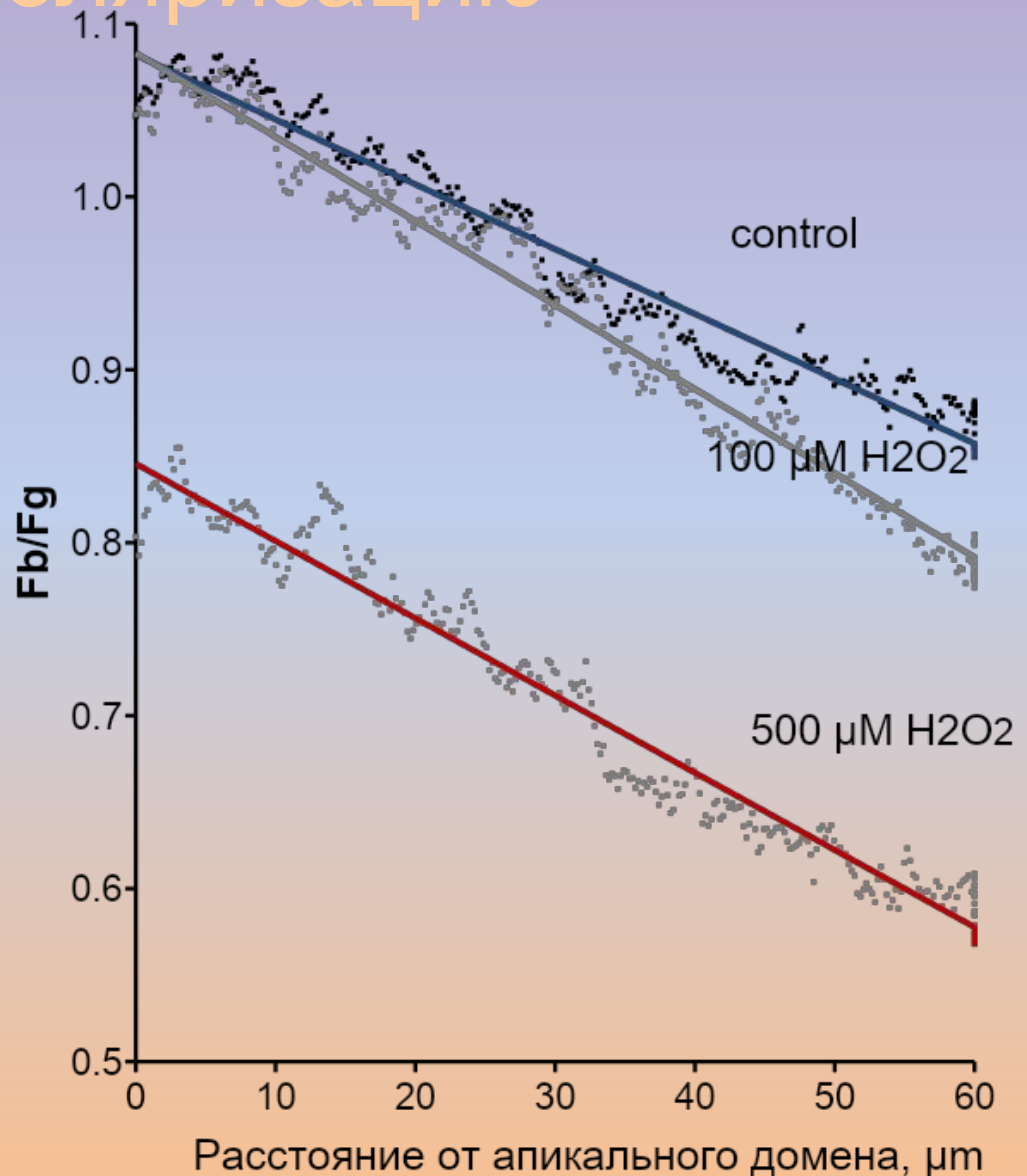


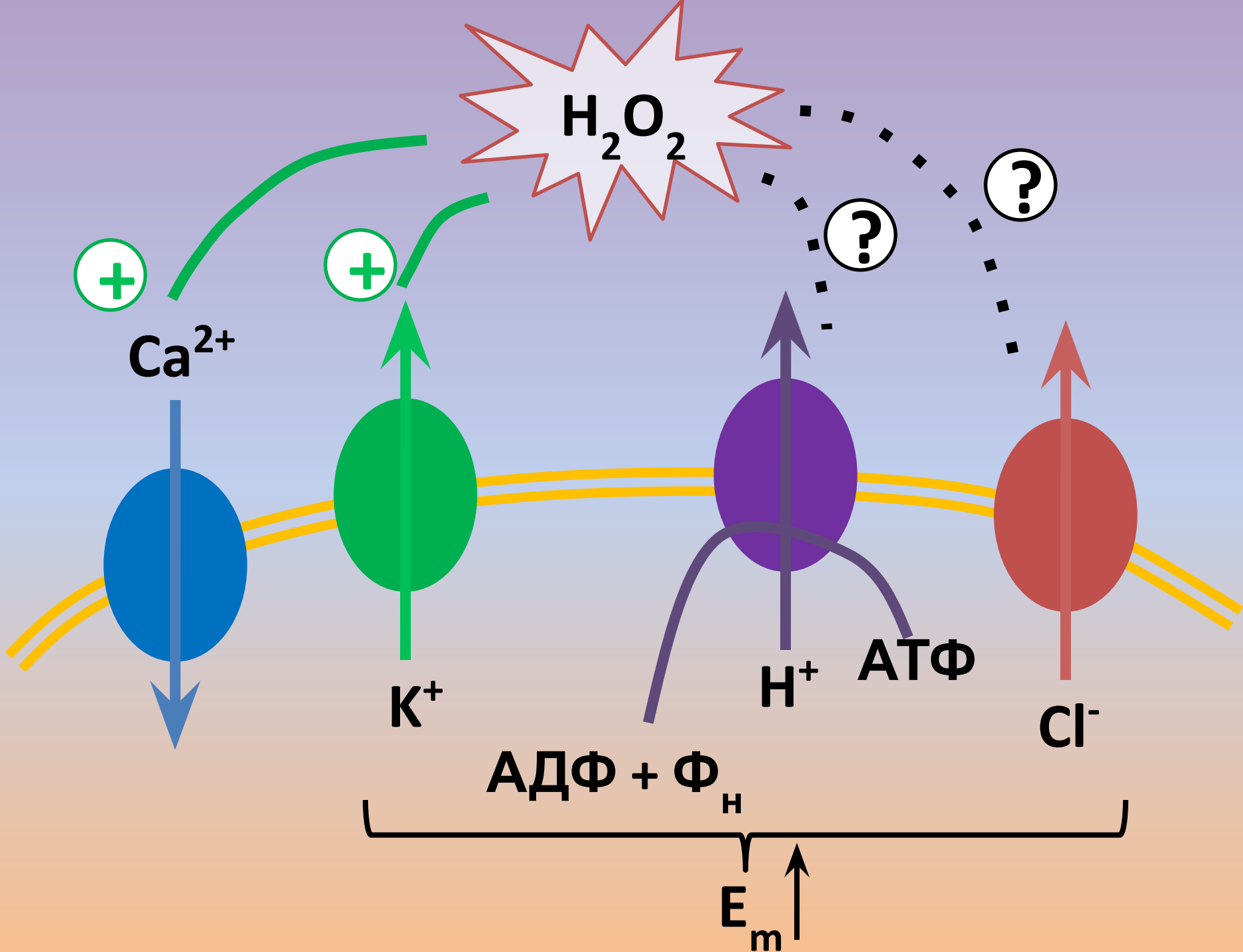
контроль

500  $\mu M$   
 $H_2O_2$



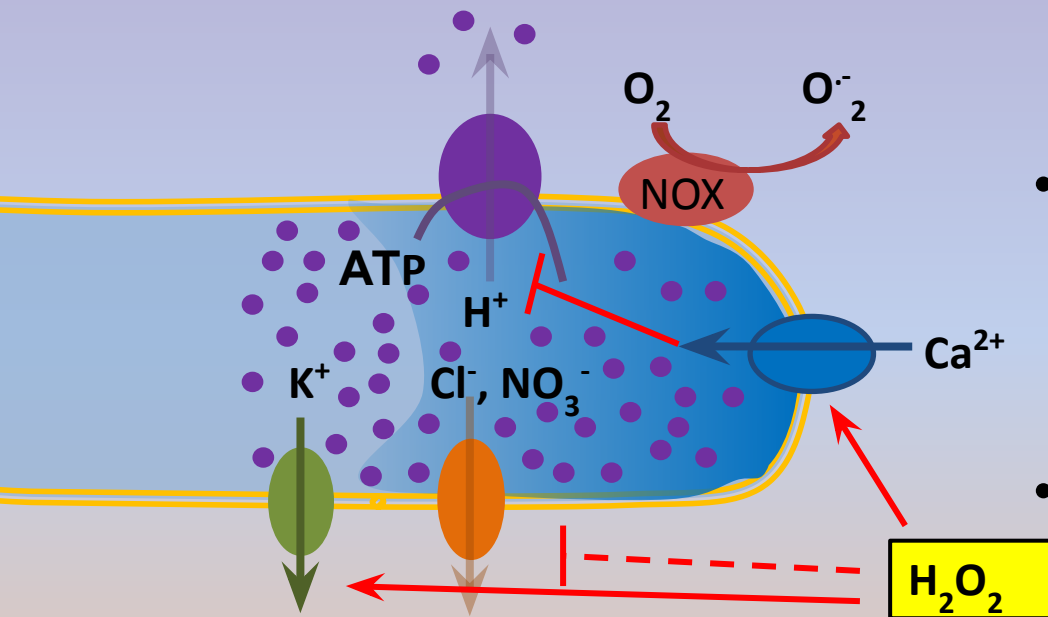
Podolyan et al., 2019



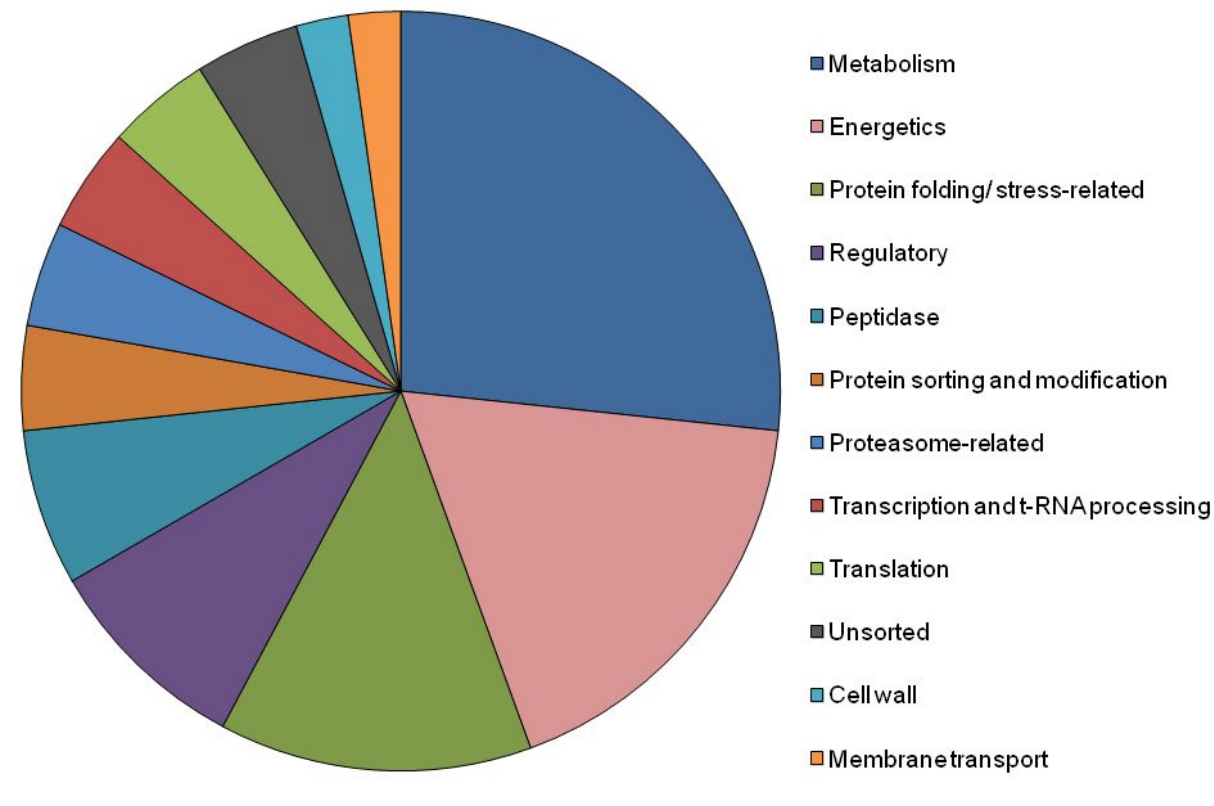




# АФК как сигнал: $\text{H}_2\text{O}_2$ вызывают перестройку всех градиентов



- В трубке ион-транспортные системы расположены полярно
- Они формируют в цитоплазме динамичные градиенты концентраций, а на мембране – градиент МП
- АФК-сигнал, приходя в трубку, меняет прямо или косвенно работу практически всех ион-транспортных систем
- Тем самым АФК вызывают перестройку внутренних градиентов



- Пероксид водорода вызывает изменения протеома пыльцы. Появляются более 50 белков, которых не было в контроле.
- Основные направления: энергетика, метаболизм, синтез белка
- Всё для активного роста!
- Ни одного антиоксиданта!

# АФК как сигнал: протеомика

*Данные получены в лаборатории протеомики  
ИБХ РАН*

# Цветковые VS Хвойные



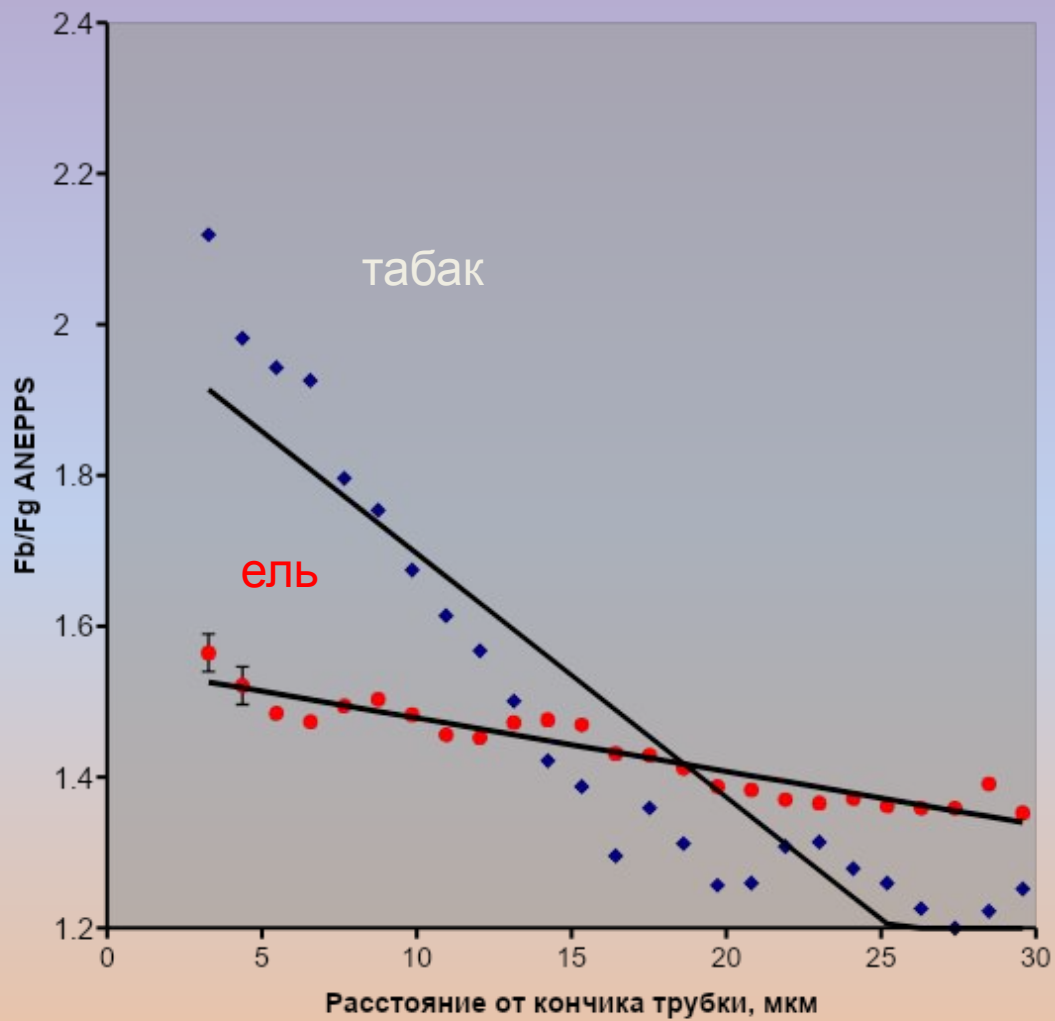
**Цветковые**

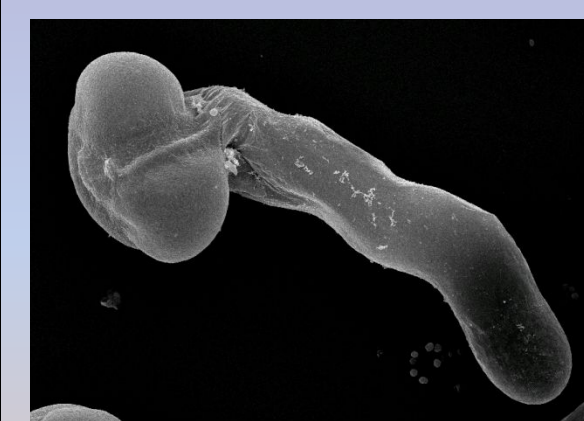
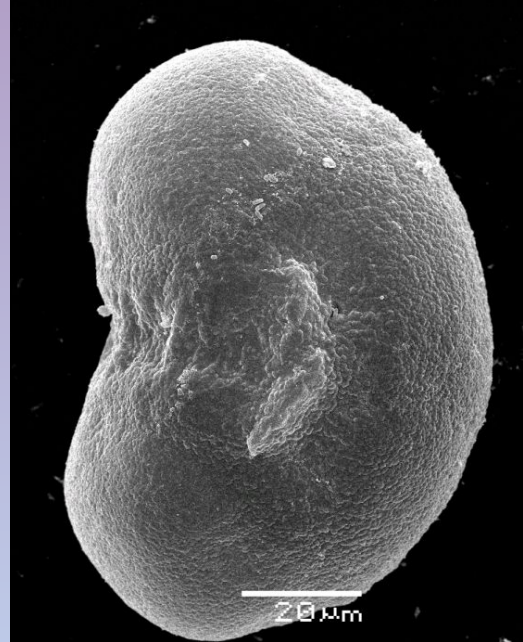
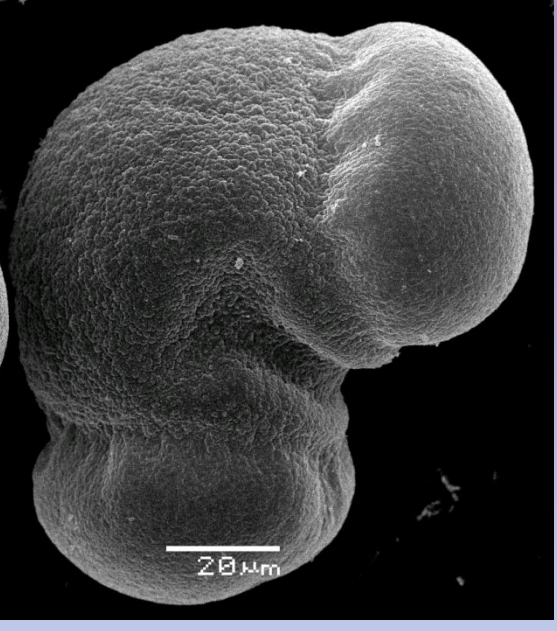


**Хвойные**

- Изученный модельный объект
  - Быстрый рост
  - Униполярный рост
  - Обращенный фонтан
  - Крутой градиент  $Ca^{2+}$
  - Крутой градиент МП
  - *Зависимость от межклеточного взаимодействия*
- Относительно новый объект
  - Медленный рост
  - Возможность биполярного роста
  - Прямой фонтан
  - Плавный градиент  $Ca^{2+}$
  - Плавный градиент МП
  - *Больше «автономности»*

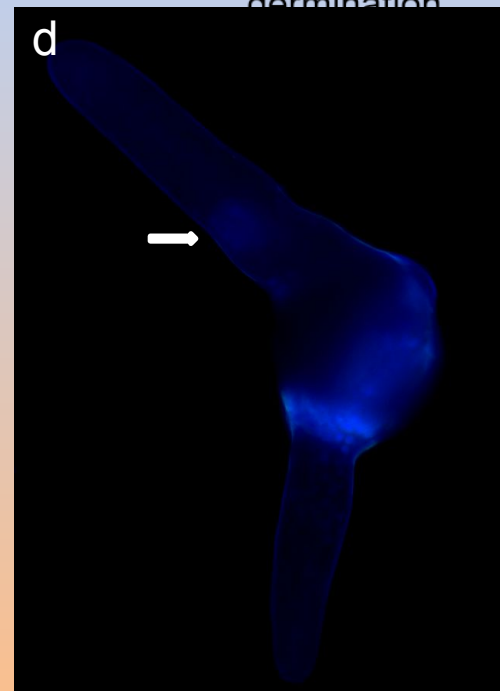
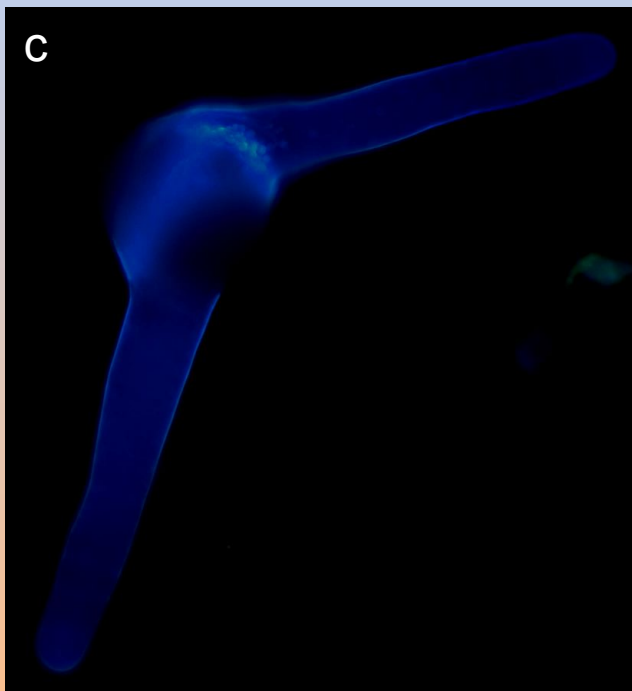
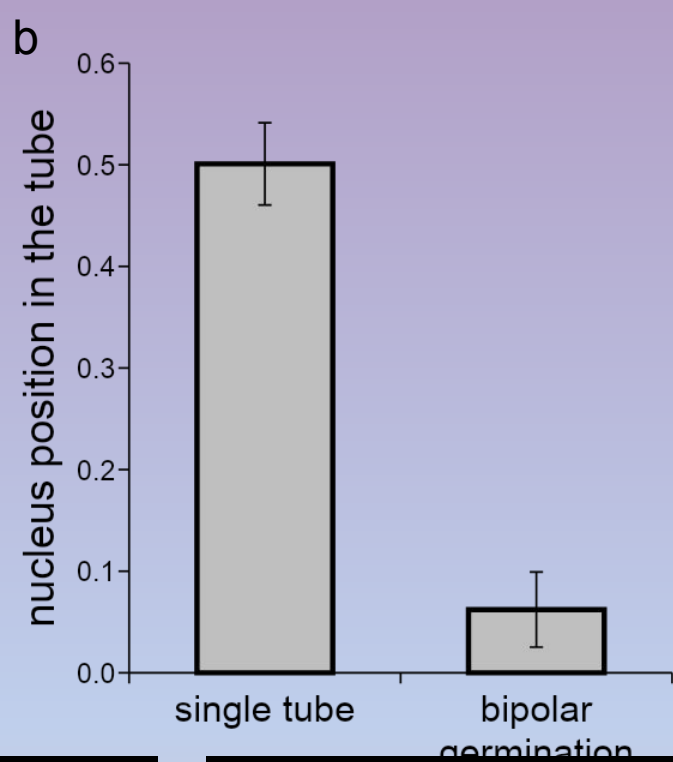
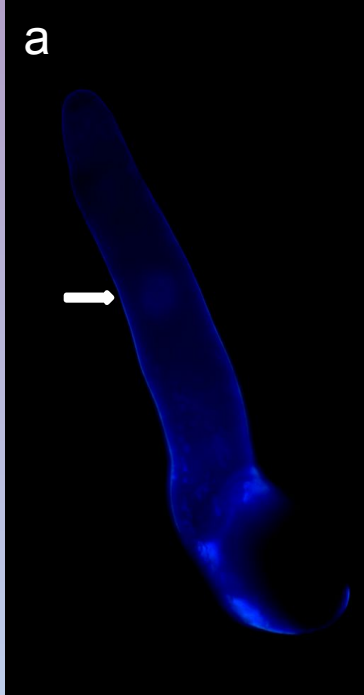
# Градиент мембранного потенциала





Breygina et al., 2019  
(в соавторстве с Полевой С.В.)

# Биполярное прорастание у ели

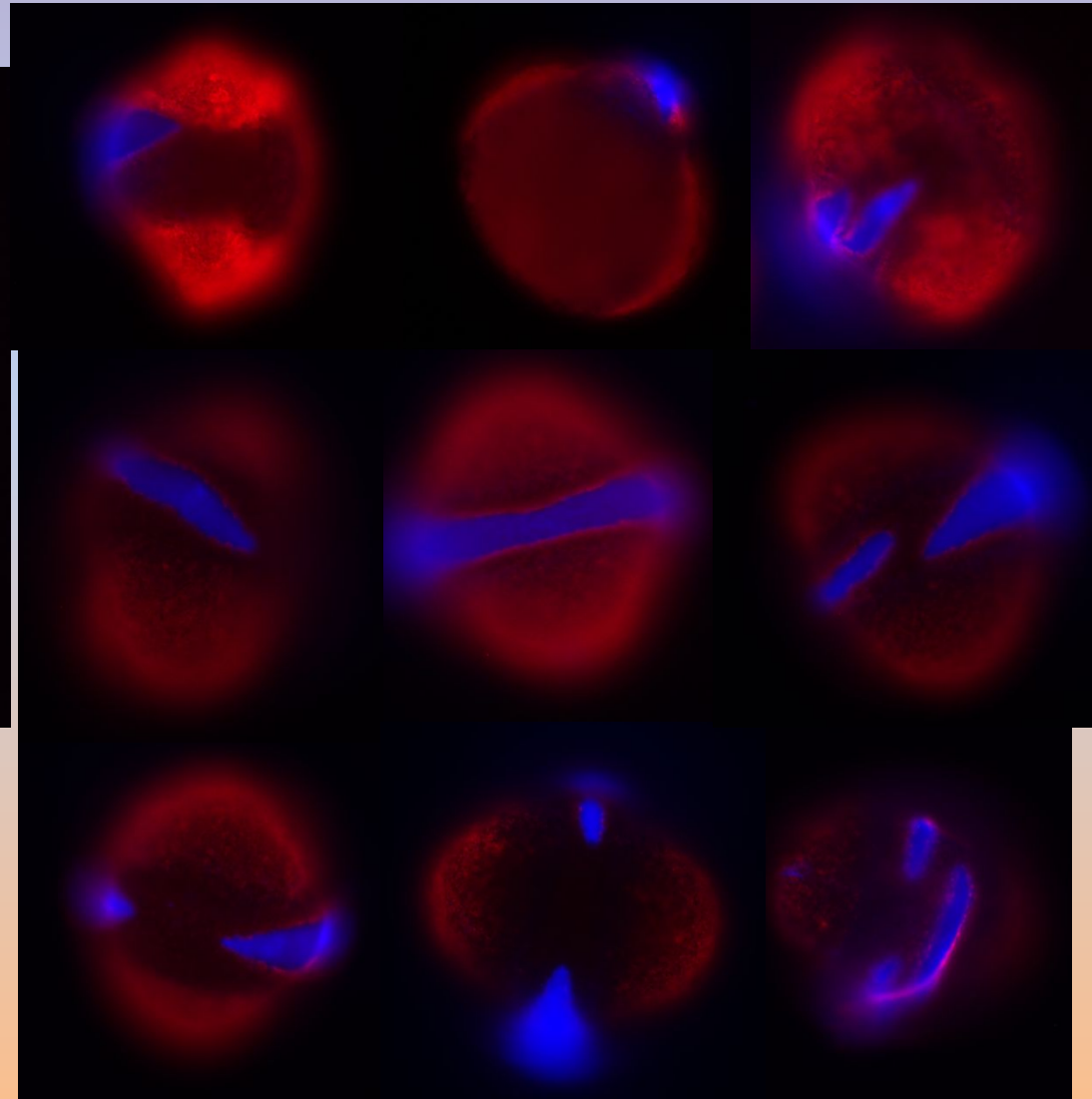
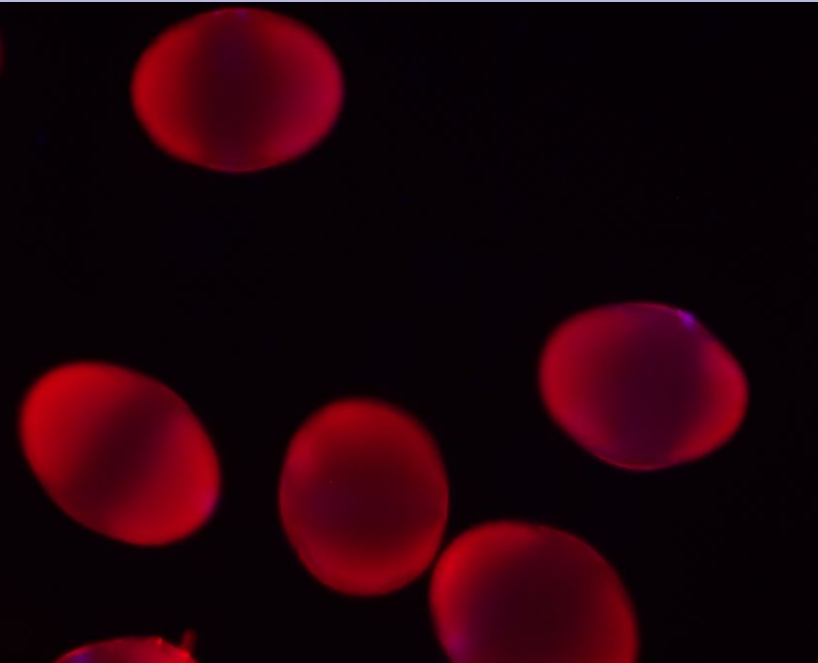


# Биполярное прорастание : ядро

- Две трубки, а МГМ один. Куда же он пойдет?
- Он тоже сомневается
- ...

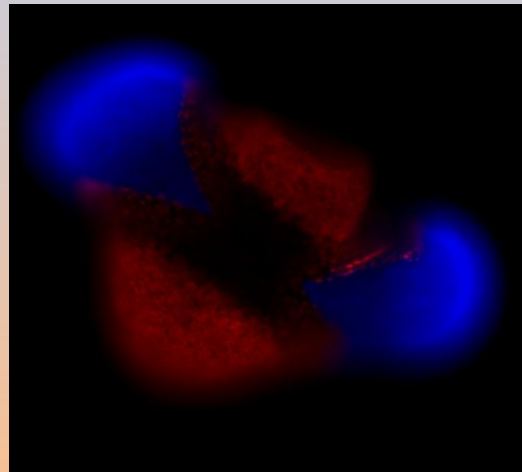
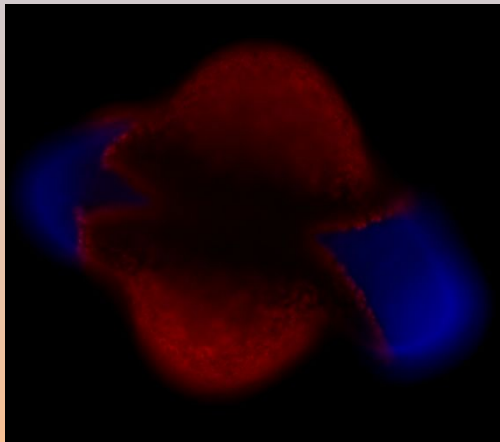
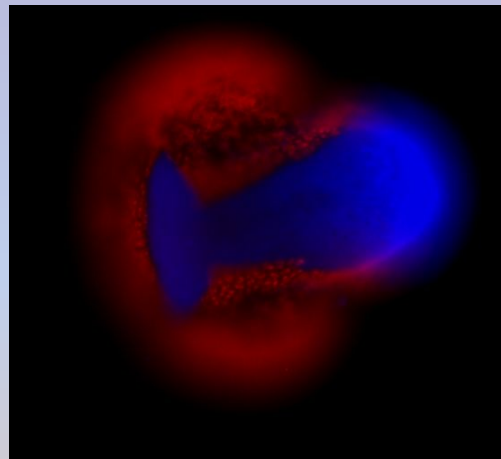
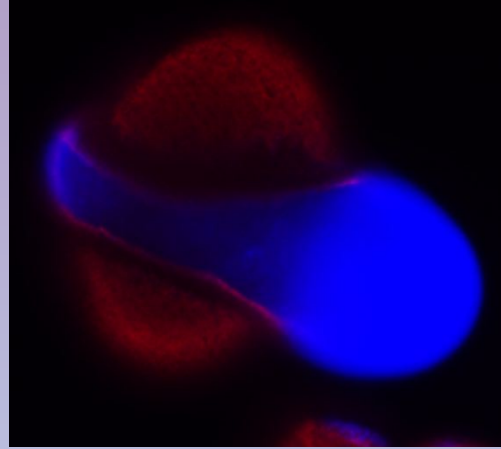
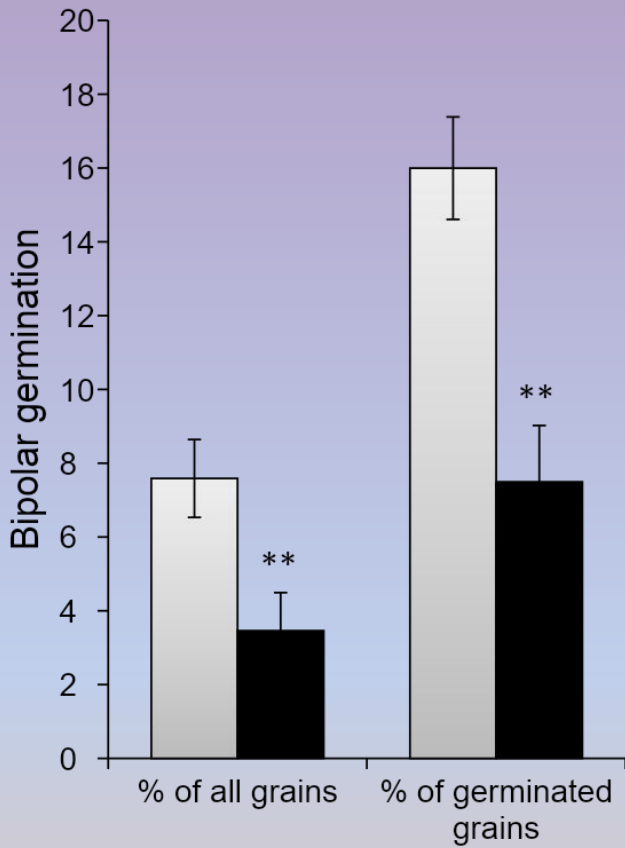
# Биполярное прорастание: динамика

Breygina et al., 2019



- 2 часа
- 6 часов
- 9 часов

Сколько разрывов – столько  
и трубок



# Биполярное прорастание : почему?

- Биполярное прорастание характерно для мешковой пыльцы
- Мы описали феномен и посмотрели, можно ли на него повлиять
- Снова АФК!