

УДК 577.2.04

ТОПОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ЗАВИСИТ ОТ ДИНАМИЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАРЯДОВ ФОСФОЛИПИДОВ

С.С. Рябичко, Ф.К. Алимова

Аннотация

Мембранный белок пермеаза лактозы LacY бактерии *Escherichia coli* способен изменять положение трансмембранных доменов в зависимости от липидного микроокружения. Отсутствие фосфатидилэтаноламина в мембране приводит к инверсии первых шести доменов данного белка. Фосфатидилэтаноламин представляет собой цвителионный фосфолипид, и его содержание в мембране *E. coli* составляет до 65%, другие мажорные мембранные фосфолипиды – кардиолипин и фосфатидилглицерин – заряжены отрицательно. В мембране мутантных штаммов, не содержащих фосфатидилэтаноламин, происходит «разбавление» мембраны отрицательно заряженными кардиолипином и фосфатидилглицерином. Вероятно, инверсия доменов пермеазы связана с высвобождением положительно заряженных цитоплазматических междоменных петель в периплазматическое пространство, что является следствием преобладания отрицательных зарядов в составе фосфолипидов. Для подтверждения гипотезы влияния динамичного перераспределения зарядов в мембране на ориентацию трансмембранных доменов заменили фосфатидилэтаноламин другим положительно заряженным фосфолипидом – лизилфосфатидилглицерином, что привело к частичной инверсии доменов в нативное положение. Очевидно, что топология бактериальных мембранных белков зависит от баланса положительных и отрицательных зарядов гидрофильных «головок» фосфолипидов на поверхности мембран и их динамичного изменения.

Ключевые слова: топология, трансмембранные домены, фосфатидилэтаноламин, пермеаза лактозы, *Escherichia coli*.

Введение

Процесс встраивания мембранных белков опосредован функционированием транслоконовой системы и зависит от гидрофобности белка и физико-химических свойств липидного бислоя, которые, в свою очередь, определяются их составом. Считалось, что после встраивания в мембрану белок занимает статичное положение и способен изменять конформацию без существенного изменения топологии трансмембранных доменов. Однако было показано, что липидное микроокружение влияет не только на начальный этап встраивания, но и на последующее положение доменов, которое может меняться в зависимости от состава липидов [1].

Белки мембраны грамотрицательных бактерий имеют большую частоту встречаемости положительно заряженных аминокислот аргинина и лизина в цитоплазматических междоменных петлях, в отличие от периплазматических. Данная зависимость послужила основой гипотезы *positive inside rule*, которая описывает

расположение доменов мембранных белков строго в установленном порядке: положительно заряженными петлями внутрь [2].

Пермеаза лактозы LacY является одним из типичных белков внутренней мембраны грамотрицательных бактерий, содержащим 417 аминокислотных остатков, формирующих 12 трансмембранных доменов, N-конец и С-конец расположены в цитоплазме. Домены образуют α -спирали, содержащие гидрофильные радикалы аминокислот внутри этой полости [3].

Было показано, что конформация пермеазы лактозы детерминирована липидным составом мембраны. Отсутствие фосфатидилэтаноламина в мембране штаммов *E. coli*, мутантных по гену фосфатидилсеринсинтазы *pssA*, приводило к изменению топологии некоторых доменов данного белка [4]. В последовательностях аминокислот, кодирующих цитоплазматические и периплазматические петли, а также трансмембранные домены, делали замены на цистеин таким образом, чтобы вариант белка содержал единственный цистеин в определенном участке. С помощью мечения цистеина специфичным к нему N-малеимидпропилбиоцитином, не проникающим через мембрану, детектировали наличие данного цистеина по разные стороны от мембраны [5]. В результате анализа сигналов было обнаружено, что первые 6 доменов демонстрируют инверсию положения в мембране, 7-й домен, по всей видимости, высвобождается в периплазматическое пространство (рис. 1). При этом транспорт лактозы внутрь клетки нарушался [6].

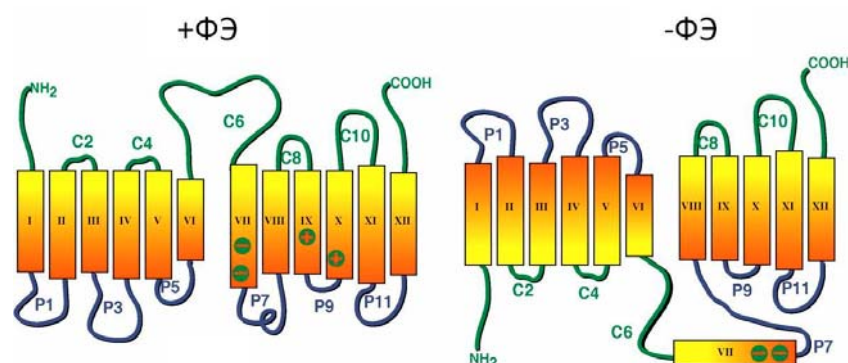


Рис. 1. Топология пермеазы лактозы LacY *E. coli*. Слева – в клетках, содержащих фосфатидилэтаноламин, справа – без фосфатидилэтаноламина. I – XII – номера доменов, C2, C4, C6, C8, C10 – цитоплазматические петли, P1, P3, P5, P7, P9, P11 – периплазматические петли (воспроизводится из [6])

Замены в цитоплазматических петлях C2, C4 и C6, содержащих положительно заряженные аминокислоты, на отрицательно заряженные, приводили к нивелированию влияния фосфатидилэтаноламина. Отсутствие данного фосфолипида в мембране не влекло инверсию положения доменов [5]. Содержание цвитерионных молекул фосфатидилэтаноламина в мембране составляет около 70% от фосфолипидов, а остальные два главных фосфолипида – кардиолипин и фосфатидилглицерин – в мутантных по фосфатидилэтаноламину штаммах «разбавляют» собой мембрану, замещая цвитерионные молекулы на отрицательно

заряженные. Таким образом, изменение топологии пермеазы лактозы может быть обусловлено перераспределением зарядов на поверхности мембраны. Вероятно, принцип ориентации положительно заряженных петель белка внутрь клетки в данном случае функционирует следующим образом: присутствие фосфатидилэтаноламина в мембране препятствует инверсии данных петель в периплазматическое пространство, выступая своеобразным защитным буфером, создающим электростатический барьер, предотвращающий топологические изменения. Изменение заряда самих петель приводит к их стабильному состоянию [7].

Однако было также показано, что фосфатидилэтаноламин может выступать в качестве липошаперона, принимающего непосредственное участие в фолдинге мембранных белков, в частности в процессе ренатурации [8, 9]. Наличие данного фосфолипида в среде способствует ренатурации белка с восстановлением конформации, идентичной нативной, в то время как отсутствие приводит к формированию белка, не распознаваемого конформационно-специфичными антителами. Таким образом, инверсия положения трансмембранных доменов пермеазы лактозы может быть вызвана отсутствием взаимодействия белка с фосфатидилэтаноламином, определяющим его топологию, и не иметь прямого отношения к распределению зарядов. В связи с этим необходимо заменить фосфатидилэтаноламин на другой положительно заряженный фосфолипид (лизилфосфатидилглицерин) с целью определения вклада динамики изменения зарядов фосфолипидов на ориентацию трансмембранных доменов пермеазы лактозы.

Задачами настоящей работы являются:

- 1) сконструировать мутантный штамм *E. coli*, продуцирующий повышенное содержание лизилфосфатидилглицерина и не имеющий фосфатидилэтаноламин;
- 2) провести анализ топологии пермеазы лактозы в условиях повышенного содержания лизилфосфатидилглицерина вместо фосфатидилэтаноламина;
- 3) оценить влияние присутствия положительно заряженных фосфолипидов в мембране на фолдинг пермеазы лактозы.

Объекты и методы исследования

В работе были использованы следующие штаммы *E. coli*:

- 1) AD931 *pssA::kan*;
- 2) AD931 *pssA::kan/pPACc mprF cam^R/*;
- 3) AD931 *pssA::kan/pPACc mprF cam^R/pT7-5 LacY C6 205C Amp^R*;
- 4) AD931 *pssA::kan/pPACc mprF cam^R/pT7-5 LacY NT 13C Amp^R*.

Ген *pssA* кодирует фосфатидилсеринсинтазу – фермент, синтезирующий фосфатидилсерин, который является предшественником фосфатидилэтаноламина у *E. coli*. Таким образом, инактивация гена *pssA* приводит к фенотипу, не содержащему фосфатидилэтаноламин. Данную инактивацию проводили по методике 1-стадийной трансдукции фагом P1 с использованием λ -Red-рекомбиназы [10]. Успешно трансдуцированный штамм имел устойчивость к канамицину.

Для повышенного содержания лизилфосфатидилглицерина штамм трансформировали плазмидой pPACc, содержащей ген *mprF* и имеющей устойчивость к хлорамфениколу. Было показано, что продукт данного гена, фактор устойчивости ко многим белкам, приводит к увеличенному содержанию лизилфосфатидилглицерина в клетке [11]. Плазмиды pT7-5 *LacY NT 13C amp^R* и pT7-5 *LacY C6 205C*

amp^R несли ген лактопермеазы *LacY* с заменами всех цистеинов на аланин, кроме цистеина в положении 13 либо 205 соответственно (в N-концевой петле и цитоплазматической С6-петле). Данные гены были под промотором T7 полимеразы и экспрессия инициировалась добавлением изопропи-β-D-1-тиогалактопиранозиды (IPTG). Все плазмиды pT7-5 несли ген устойчивости к антибиотику – ампициллину. Трансформацию осуществляли по стандартной методике [12].

Культуры растили на среде LB с добавлением антибиотиков для сохранения плазмид до середины логарифмической фазы роста ($OD_{600} = 0.6$) при 30 °C и 250 об/мин. Для экспериментов по определению фосфолипидного состава добавляли радиоактивный фосфат ³²P. Для вестерн-блоттинга пермеазы лактозы клетки разрушали с использованием гомогенизатора French press (США) при 1000 psi и внутренние мембраны выделяли центрифугированием при скорости 45000 g и температуре 4 °C в течение 45 мин. Полученный осадок затем солибилизовали в дигитонин-содержащем буфере.

Ориентацию пермеазы лактозы, содержащей единственный цистеин в положении 13 или 205, детектировали с помощью мечения цистеина специфичным N-малеимидпропилбиоцитином, не проникающим через мембрану [13].

Фосфолипиды экстрагировали смесью хлороформ – метанол (1 : 2) в течение 30 мин. Фосфолипидный анализ проводили двумерной тонкослойной хроматографией. Разделение в первом направлении осуществляли в смеси хлороформ – метанол – аммоний (65 : 30 : 4), во втором направлении – в смеси хлороформ – метанол – уксусная кислота – вода (85 : 12.5 : 12.5 : 3).

Для анализа результатов использовали программное обеспечение Bio-Rad Quantity One.

Результаты и их обсуждение

В результате трансдукции фагом P1 штамма AD931 *E. coli* с целью инактивации гена *pssA* был получен штамм, не способный продуцировать фосфатидилэтаноламин (рис. 2). Мутантный штамм содержал увеличенное количество кардиолипина и фосфатидилглицерина, которые заменили фосфатидилэтаноламин в мембране.

Трансформация мутантного по гену *pssA* штамма AD931 *E. coli* плазмидами, содержащими ген *mprF*, привела к увеличенному содержанию лизилфосфатидилглицерина (рис. 3). Количество данного фосфолипида достигало 13–16% от общего содержания фосфолипидов, что приблизительно в 80 раз превышает количество лизилфосфатидилглицерина в норме (около 0.2%).

Для анализа топологии пермеазы лактозы во внутренней мембране *E. coli* был применен метод доступности единичных цистеинов, или SCAM. Так как N-малеимидпропилбиоцитин (MPB) не проникает сквозь мембрану, наличие реакции, которая образовывалась благодаря взаимодействию цистеина с MPB и MPB, затем с флуоресцентно-меченым стрептавидином, означало доступность цистеина, то есть положение в периплазматическом пространстве. Отсутствие сигнала возможно при ориентации петли, содержащей цистеин, внутрь цитоплазмы.

Для 100%-ного мечения цистеинов клетки разрушали ультразвуком, в то время как другую партию образцов разрушали после мечения. Обнаружили, что

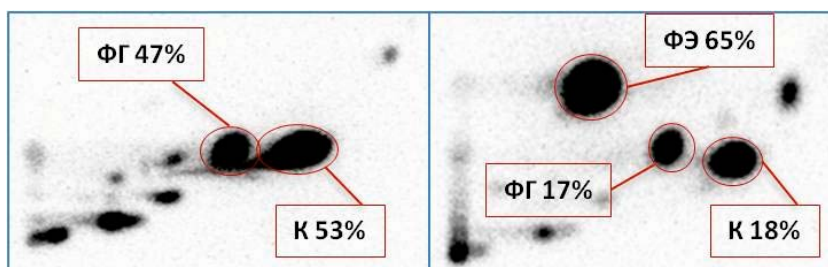


Рис. 2. ТСХ фосфолипидов штамма AD931 (справа) и AD931/pssA::kan (слева), меченых радиоактивным ^{32}P . ФГ – фосфатидилглицерин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, К – кардиолипин. За 100% принято содержание данных трех фосфолипидов

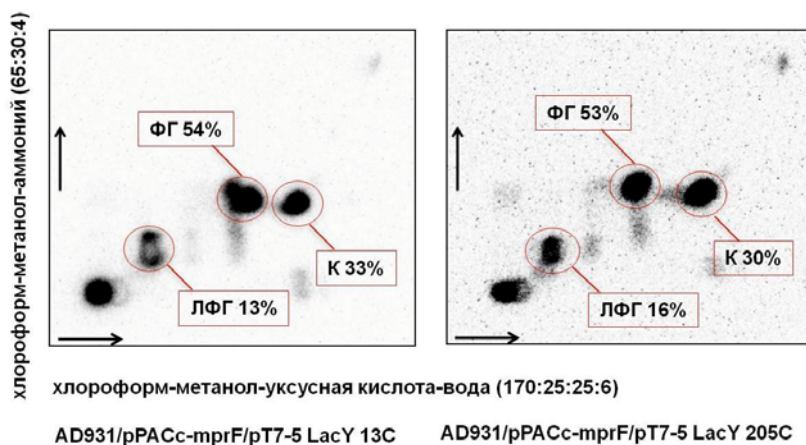


Рис. 3. Двумерная ТСХ фосфолипидов, меченых ^{32}P . ФГ – фосфатидилглицерин, ЛФГ – лизилфосфатидилглицерин, К – кардиолипин

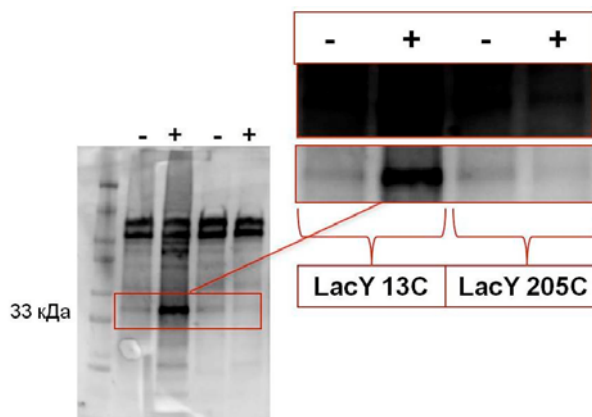


Рис. 4. SCAM-анализ ориентации цитоплазматических N-концевой и С6-петель пермеазы лактозы в мембране штаммов AD931, содержащих повышенное количество лизилфосфатидилглицерина и не содержащих фосфатидилэтаноламин. Минус и плюс означает отсутствие или наличие ультразвуковой обработки клеток, предшествующей мечению

полоса, соответствующая мечению до ультразвуковой обработки, имеет значительно меньшую интенсивность по сравнению с полосой, характерной для 100%-ного мечения всех цистеинов (рис. 4). Данный факт подразумевает недоступность цистеина для мечения, то есть расположение петли, несущей цистеин, внутри цитоплазмы. Однако наличие даже слабого сигнала может свидетельствовать о расположении некоторого количества белка пермеазы лактозы в инвертированной ориентации, то есть присутствует смешанное содержание пермеазы лактозы в правильной нативной и инвертированной ориентациях одновременно.

Очевидно, что присутствие повышенного количества положительно заряженного фосфолипида – лизилфосфатидилглицерина – в мембране приводит к частичному возврату инвертированной ориентации пермеазы лактозы в нормальную. Количество фосфатидилэтаноламина в мембране *E. coli* составляет 65% от содержания фосфолипидов, однако достигнутой концентрации лизилфосфатидилглицерина в мутантных штаммах, несмотря на почти 80-кратное увеличение, недостаточно для полного восстановления ориентации пермеазы лактозы, что может быть связано либо с недостаточностью восстановления баланса зарядов на поверхности мембраны вследствие неполной замены фосфатидилэтаноламина лизилфосфатидилглицерином (16% положительно заряженных фосфолипидов вместо 65%), либо прямым влиянием фосфатидилэтаноламина на топологию пермеазы лактозы. Так как ориентация белка находится частично в правильном состоянии, влияние лизилфосфатидилглицерина на изменение положения пермеазы лактозы в мембране не вызывает сомнений.

Таким образом, внесение положительно заряженного фосфолипида в отрицательно заряженную мембрану способствует перераспределению зарядов, в результате которого инвертированная ориентация пермеазы лактозы возвращается в нормальное состояние.

Заключение

Сконструированный штамм AD931, мутантный по гену фосфатидилсеринсинтазы *pssA*, не имел фосфатидилэтаноламина в составе мембран. Включение гена *mprF* с плазмидой рРАСс в клетки данного штамма способствовало накоплению положительно заряженного фосфолипида – лизилфосфатидилглицерина – до 16%, что почти в 80 раз превышает нормальное содержание. Кроме того, штамм AD931 трансформировали второй плазмидой рТ7-5, несшей ген пермеазы лактозы *LacY* с заменами цистеинов на аланин, за исключением цистеина в положении 13 в N-концевой петле, ориентированной в фосфатидилэтаноламин-содержащих клетках в цитоплазму, или в положении 205 в С6-петле, также ориентированной в цитоплазму. Данные междоменные петли способны к инверсии в периплазматическое пространство.

Анализ ориентации пермеазы лактозы в мембране мутантных штаммов показал, что присутствие лизилфосфатидилглицерина приводит к частичному восстановлению правильного положения белка, что указывает на влияние распределения зарядов и динамики их изменения, баланса зарядов на поверхности мембраны на топологию мембранных белков. Частичная инверсия белка может быть связана с недостаточностью замещения фосфатидилэтаноламина лизилфосфати-

дилглицерином, в результате которого баланс положительных и отрицательных зарядов не был близок к штамму с «диким типом».

Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что фосфатидилэтаноламин выполняет буферную функцию в динамике зарядов на поверхности мембраны *E. coli*, оказывая сильное электростатическое влияние на фолдинг и топологию мембранных белков. Данное взаимодействие находится в подвижном состоянии и происходит за счет изменения потенциала гидрофильных «головок» фосфолипидов. Изучение влияния различных факторов на фосфолипидный состав и изменение конформации мембранных белков позволит в будущем более эффективно управлять метаболизмом бактериальной клетки и найдет большое практическое применение.

Литература

1. White S.H., Wimley W.C. Membrane protein folding and stability: physical principles // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. – 1999. – V. 28. – P. 319–365.
2. von Heijne G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule // J. Mol. Biol. – 1992. – V. 225, No 2. – P. 487–494.
3. Abramson J., Smirnova I., Kasho V., Verner G., Kaback H.R., Iwata S. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli* // Science. – 2003. – V. 301. – P. 610–615.
4. Kaback H.R. Structure and mechanism of the lactose permease // C. R. Biol. – 2005. – V. 328, No 6. – P. 557–567.
5. Bogdanov M., Xie J., Heacock P., Dowhan W. To flip or not to flip: lipid-protein charge interactions are a determinant of final membrane protein topology // J. Cell. Biol. – 2008. – V. 182, No 5. – P. 925–935. – doi: 10.1083/jcb.200803097.
6. Bogdanov M., Heacock P.N., Dowhan W. A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition // EMBO J. – 2002. – V. 21, No 9. – P. 2107–2116. – doi: 10.1093/emboj/21.9.2107.
7. Bogdanov M., Xie J., Dowhan W. Lipid-protein interactions drive membrane protein topogenesis in accordance with the positive inside rule // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284, No 15. – P. 9637–9641. – doi: 10.1074/jbc.R800081200.
8. Picas L., Montero M.T., Morros A., Vázquez-Ibar J.L., Hernández-Borrell J., Picas L. Evidence of phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol presence at the annular region of lactose permease of *Escherichia coli* // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – V. 1798, No 2. – P. 291–296. – doi: 10.1016/j.bbamem.2009.06.024.
9. Contreras F.-X., Ernst A.M., Wieland F., Brügger B. Specificity of intramembrane protein-lipid interactions // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2011. – V. 3, No 6. – P. a004705-1–a004705-18. – doi: 10.1101/cshperspect.a004705.
10. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – V. 97, No 12. – P. 6640–6645.
11. Staubitz P., Neumann H., Schneider T., Wiedemann I., Peschel A. MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – V. 231, No 1. – P. 67–71.
12. Sambrook J., Russel D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 2344 p.

13. Zhang J., Tackaberry T., Ritzel M.W., Raborn T., Barron G., Baldwin S.A., Young J.D., Cass C.E. Cysteine-accessibility analysis of transmembrane domains 11–13 of human concentrative nucleoside transporter 3 // *Biochem. J.* – 2006. – V. 394, Pt. 2. – P. 389–398.

Поступила в редакцию
29.04.13

Рябичко Сергей Сергеевич – аспирант кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: anomalhead@mail.ru

Алимова Фарида Кашифовна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: farida_alimova@hotmail.com

* * *

THE TOPOLOGY OF BACTERIAL MEMBRANE PROTEINS DEPENDS ON THE DYNAMIC ALLOCATION OF PHOSPHOLIPID CHARGES

S.S. Ryabichko, F.K. Alimova

Abstract

The membrane protein lactose permease LacY of bacteria *Escherichia coli* is able to transform the position of transmembrane domains according to lipid microenvironment. The absence of phosphatidylethanolamine in the membrane leads to an inversion of the first six domains of the protein. Phosphatidylethanolamine is a zwitterionic phospholipid, and its content in the membrane of *E. coli* is almost 65%, whereas the residual two major phospholipids cardiolipin and phosphatidylglycerol are negatively charged. In the membrane of mutant strains containing no phosphatidylethanolamine, the “dilution” of the membrane by negatively charged cardiolipin and phosphatidylglycerol takes place. Apparently, the inversion of the domains of the lactose permease is associated with the release of positively charged cytoplasmic bundles in the periplasmic space, which is the result of the predominance of negative charges in the phospholipid compounds. To prove the hypothesis about the influence of dynamic redistribution of charges in a membrane on the orientation of the transmembrane domains, we replaced phosphatidylethanolamine with another positively charged phospholipid lysylphosphatidylglycerol. This led to a partial inversion of the domains to the native position. It is obvious that the topology of bacterial membrane proteins depends on the balance between the positive and the negative charges of hydrophilic heads on the membrane surface and their dynamic changes.

Keywords: topology, transmembrane domains, phosphatidylethanolamine, lactose permease, *Escherichia coli*.

References

1. White S.H., Wimley W.C. Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1999, vol. 28, pp. 319–365.
2. von Heijne G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 225, no. 2, pp. 487–494.
3. Abramson J., Smirnova I., Kasho V., Verner G., Kaback H.R., Iwata S. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*, 2003, vol. 301, pp. 610–615.
4. Kaback H.R. Structure and mechanism of the lactose permease. *C. R. Biol.*, 2005, vol. 328, no. 6, pp. 557–567.
5. Bogdanov M., Xie J., Heacock P., Dowhan W. To flip or not to flip: lipid-protein charge interactions are a determinant of final membrane protein topology. *J. Cell. Biol.*, 2008, vol. 182, no. 5, pp. 925–935. doi: 10.1083/jcb.200803097.

6. Bogdanov M., Heacock P.N., Dowhan W. A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *EMBO J.*, 2002, vol. 21, no. 9, pp. 2107–2116. doi: 10.1093/emboj/21.9.2107.
7. Bogdanov M., Xie J., Dowhan W. Lipid-protein interactions drive membrane protein topogenesis in accordance with the positive inside rule. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, no. 15, pp. 9637–9641. doi: 10.1074/jbc.R800081200.
8. Picas L., Montero M.T., Morros A., Vázquez-Ibar J.L., Hernández-Borrell J., Picas L. Evidence of phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol presence at the annular region of lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, vol. 1798, no. 2, pp. 291–296. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.06.024.
9. Contreras F.-X., Ernst A.M., Wieland F., Brügger B. Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011, vol. 3, no. 6, pp. a004705-1–a004705-18. doi: 10.1101/cshperspect.a004705.
10. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 12, pp. 6640–6645.
11. Staubitz P., Neumann H., Schneider T., Wiedemann I., Peschel A. MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, vol. 231, no. 1, pp. 67–71.
12. Sambrook J., Russel D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.
13. Zhang J., Tackaberry T., Ritzel M.W., Raborn T., Barron G., Baldwin S.A., Young J.D., Cass C.E. Cysteine-accessibility analysis of transmembrane domains 11–13 of human concentrative nucleoside transporter 3. *Biochem. J.*, 2006, vol. 394, Pt. 2, pp. 389–398.

Received
April 29, 2013

Ryabichko Sergei Sergeevich – PhD Student, Department of Biochemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: anomalhead@mail.ru

Alimova Farida Kashifovna – Doctor of Biology, Professor, Head of the Department of Biochemistry, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: farida_alimova@hotmail.com