

Mechanismy navozující změny genetické informace

1. Mutace

2. Rekombinace

3. Transpozice

Význam změn genetické informace:

- adaptace na prostředí, evoluce druhů**
- využití ve výzkumu (identifikace genů, regulace exprese aj)**

Mutace

= dědičná změna genotypu, jejíž molekulární podstatou je nukleotidová substituce, delece, inserce nebo inverze

Změna primární struktury nukleové kyseliny

Změny ve fenotypu organismů mohou mít i další příčiny

Standardní typ x mutanta

Standardní alela (alela divokého typu, wild-type allele) - standardní fenotyp

Mutantní alela - mutantní fenotyp (většinou recesivní)

Směr mutací

- původní (přímá) mutace**
- zpětná mutace - úplná nebo částečná obnova funkce (reverze fenotypu)**

Klasifikace mutací

1. Podle úrovně, na níž působí

- a) **Genové (bodové) mutace** – změna bází nebo sekvence bází na úrovni genu
- b) **Chromozomové mutace** – změna sekvence na úrovni chromozomu
- c) **Genomové mutace** – změna počtu chromozomů (plazmidů)

2. Podle typu zasažené buňky

- a) **Genetické (gametické) mutace** – vznikají v gametách, přenášejí se na potomstvo
- b) **Somatické mutace** – vznikají v somatických buňkách

3. Podle vlivu na životaschopnost organismu

- a) **Vitální mutace** – slučitelné s přežitím organismu
- b) **Letální mutace** – neslučitelné s přežitím organismu
- c) **Podmíněně (kondicionálně) letální mutace** – slučitelné s přežitím za určitých podmínek (ts, sus - supresorsenzitivní x supresorové mutace)

4. Podle stupně fenotypového projevu (u diploidních organismů)

- a) **Dominantní mutace** – projevují se plně i v heterozygotním stavu
- b) **Recesivní mutace** – projevuje se plně v homozygotním stavu, projev je maskován dominantní alelou (recesivní mutací obvykle vzniká nefunkční produkt)
 - neúplné (leaky) mutace: funkce genu se částečně zachovává
 - nulová (null) mutace: úplná ztráta funkce genu (často delece genu nebo jeho části)
 - posunová mutace: mění se čtecí rámeček (obvykle delece nebo inserce)
 - polární mutace: mutace ovlivňující expresi sousedních genů (např. v operonech)

5. Podle vzniku

- a) **Spontánní mutace** – vzniká bez zjevné vnější příčiny
- b) **Indukovaná mutace** – vzniká po vystavení organismu/buněk mutagenům

Molekulární základ mutací

Substituce - záměna původní báze (ssNA) nebo páru báze (dsNA)

* transice: pur → pur, pyr → pyr

* transverze: pur → pyr, pyr → pur

--- kodon s pozměněným smyslem (aa 1 → aa 2)

--- nesmyslný kodon (aa → stop)

nukleotidová synonymní substituce

(nemění se smysl kodonu) → tichá mutace

nukleotidová neutrální substituce

(mění se aa, ne však funkce proteinu) → tichá mutace

Delece - ztráta jednoho nebo více nukleotidů

Inzerce - vložení jednoho nebo více nukleotidů

Posunové mutace

Přestavby genomu

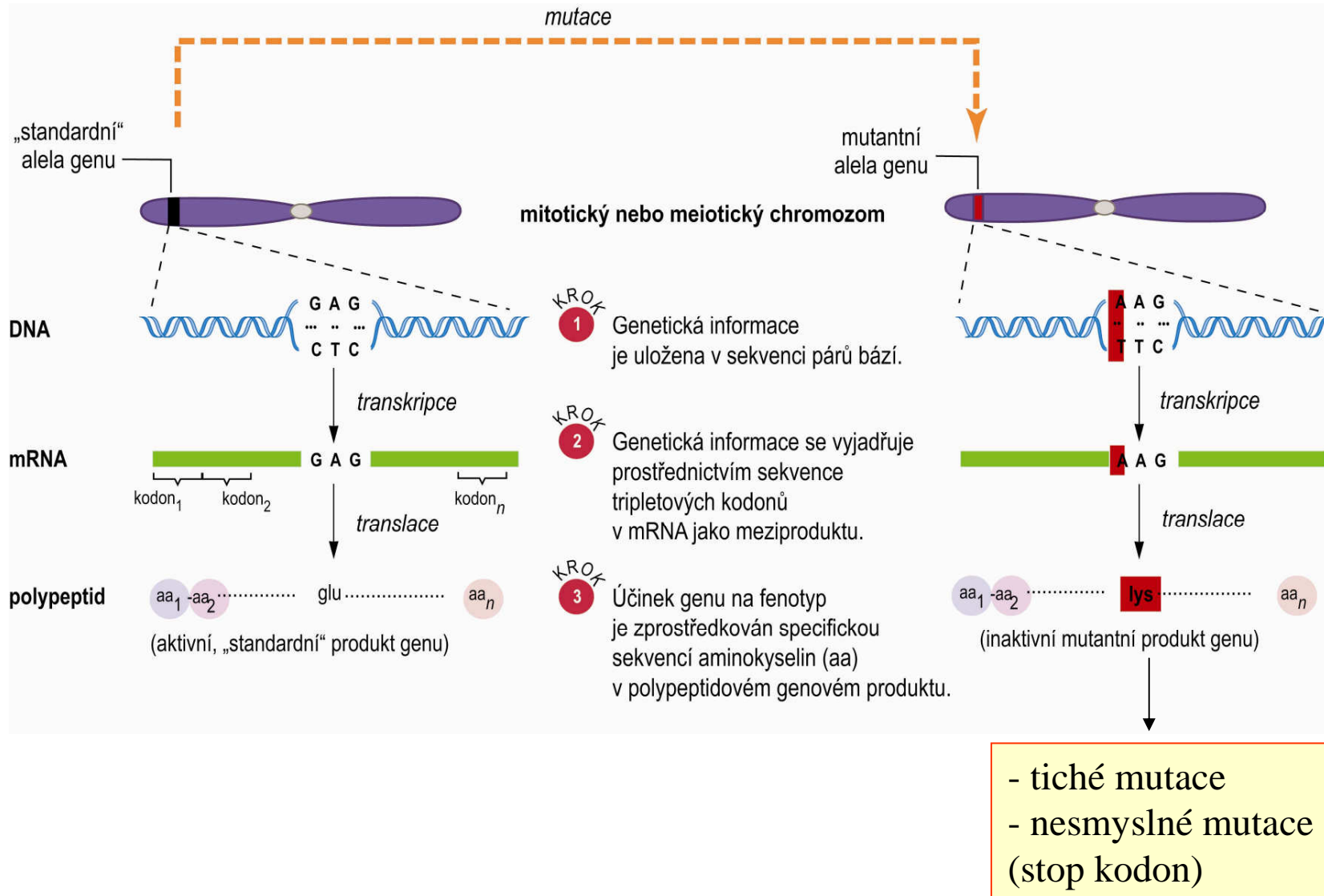
- duplikace (amplifikace)

- inverze

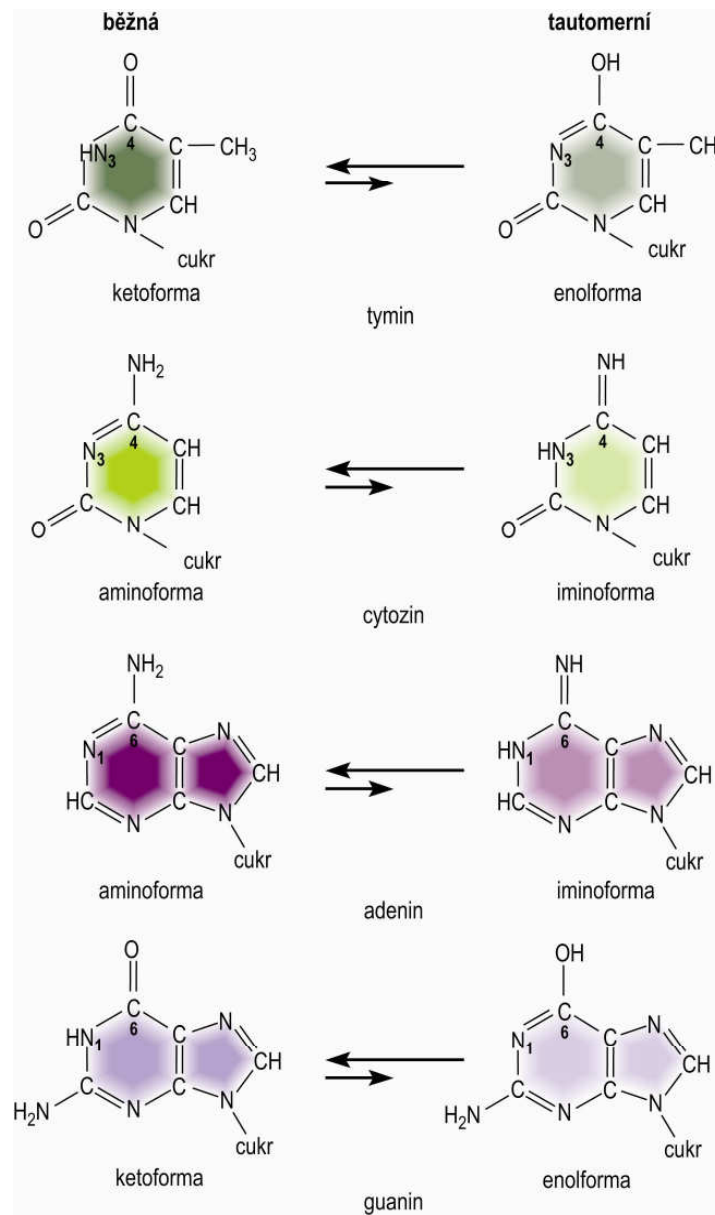
- rozsáhlejší delece

Transpozice

Vznik mutace ve strukturním genu

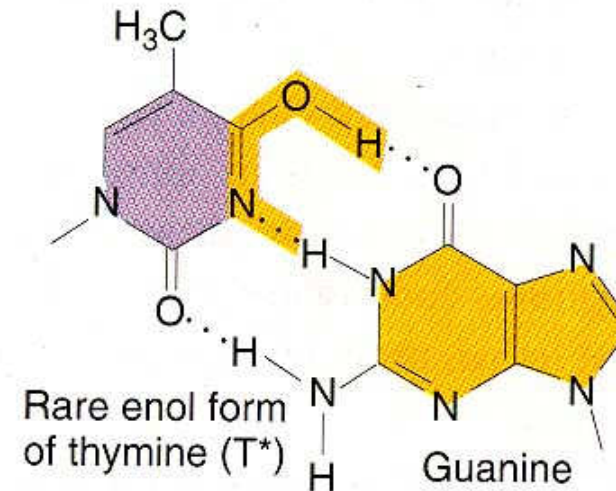
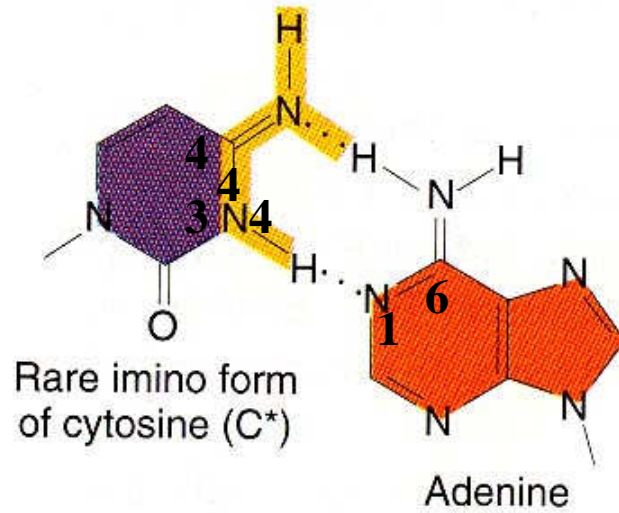


Tautomerní formy bází v DNA

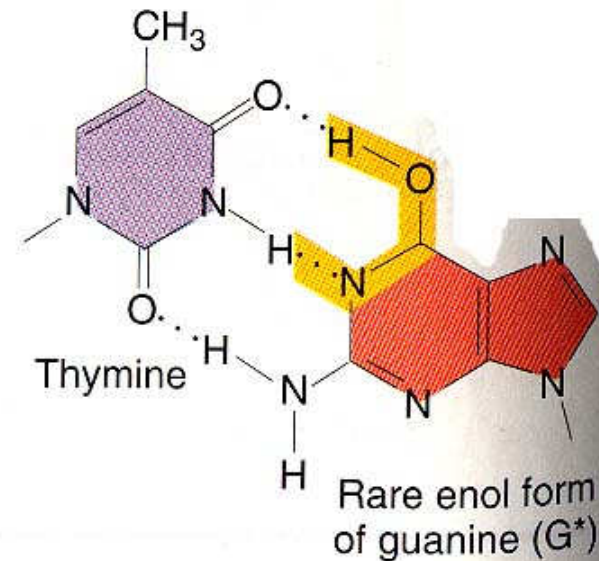
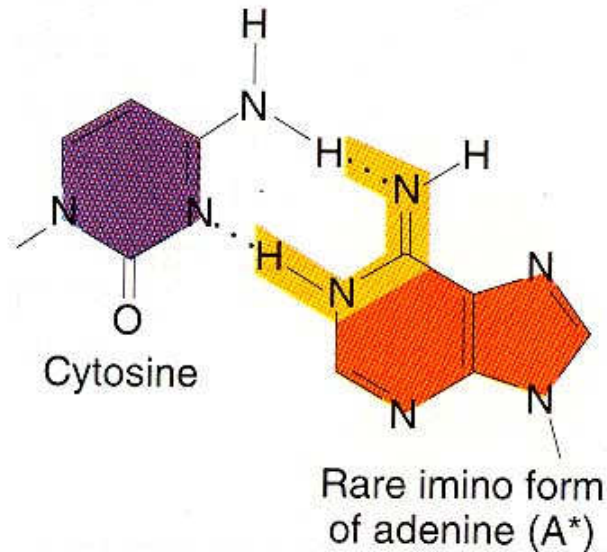


Vznik spontánních mutací - substitute

párování bází v nestabilních tautomerních formách



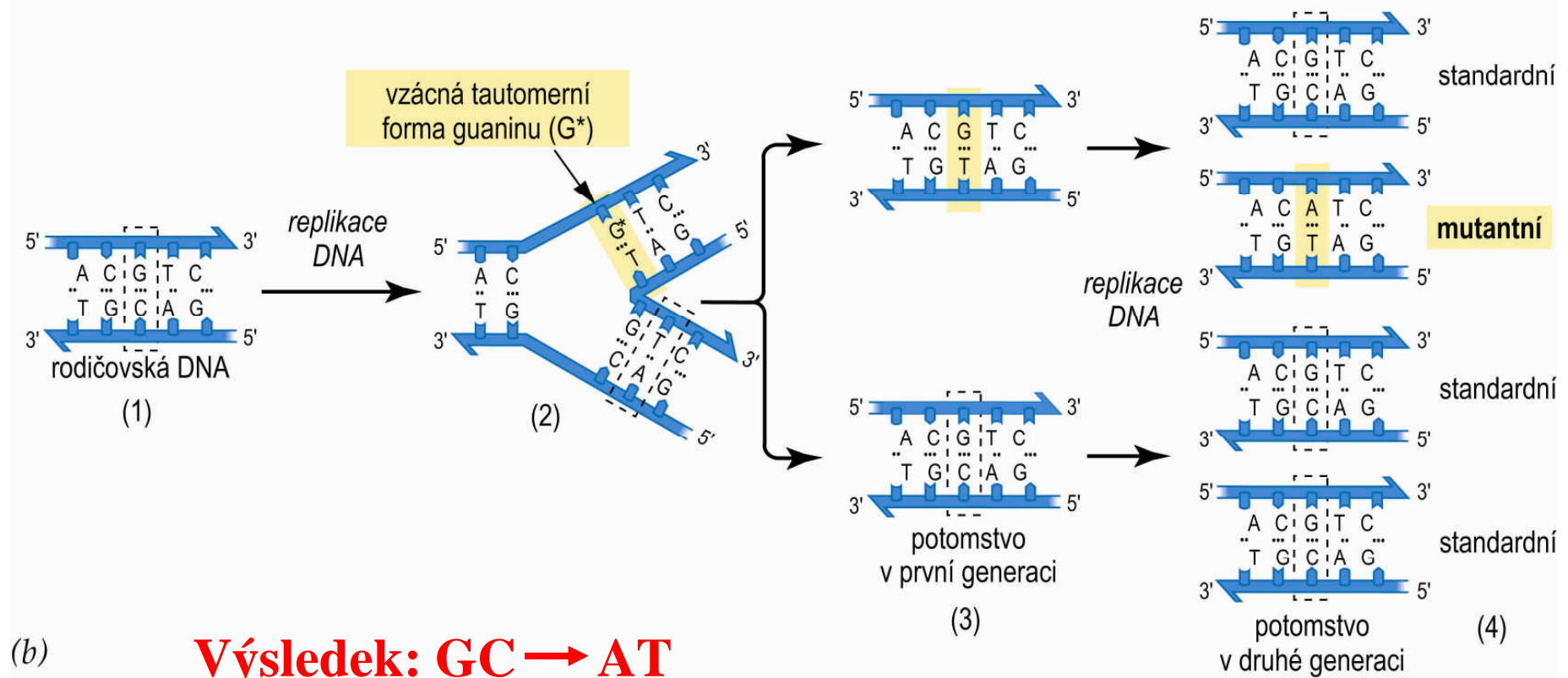
(a)



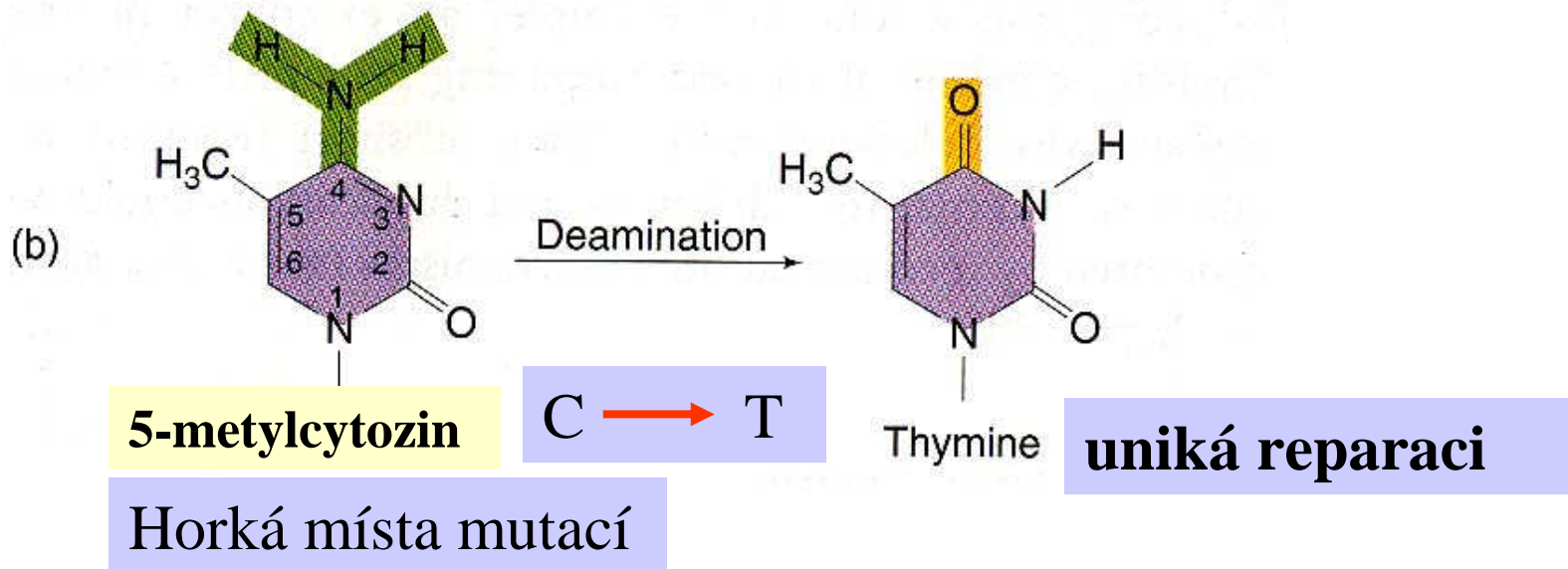
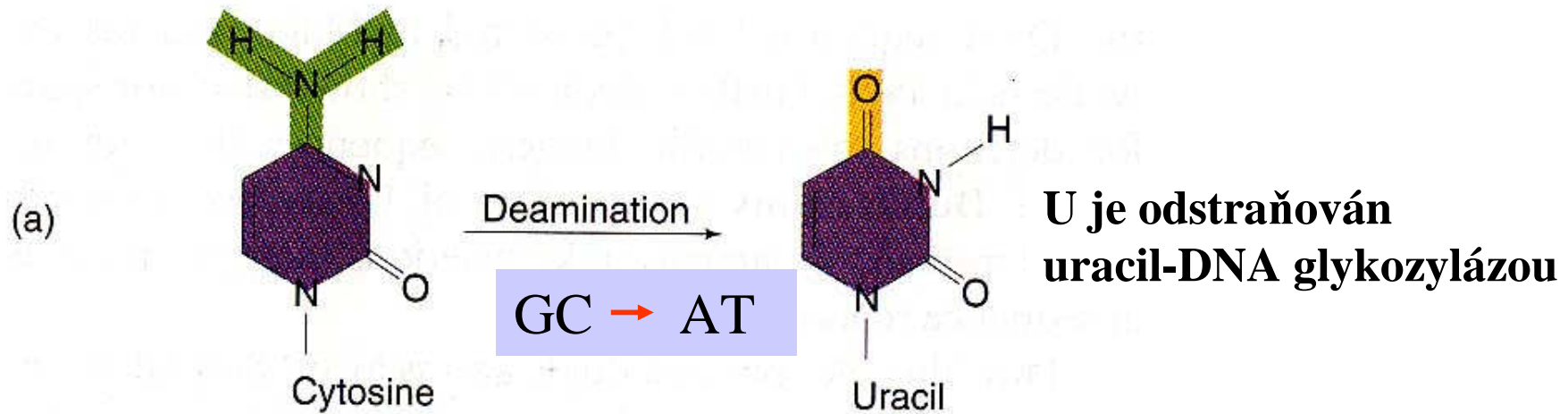
(b)

Vznik spontánní mutace po začlenění tautomerní formy báze do DNA při replikaci

mechanismus vzniku mutací v DNA v důsledku tautomerních přesmyků

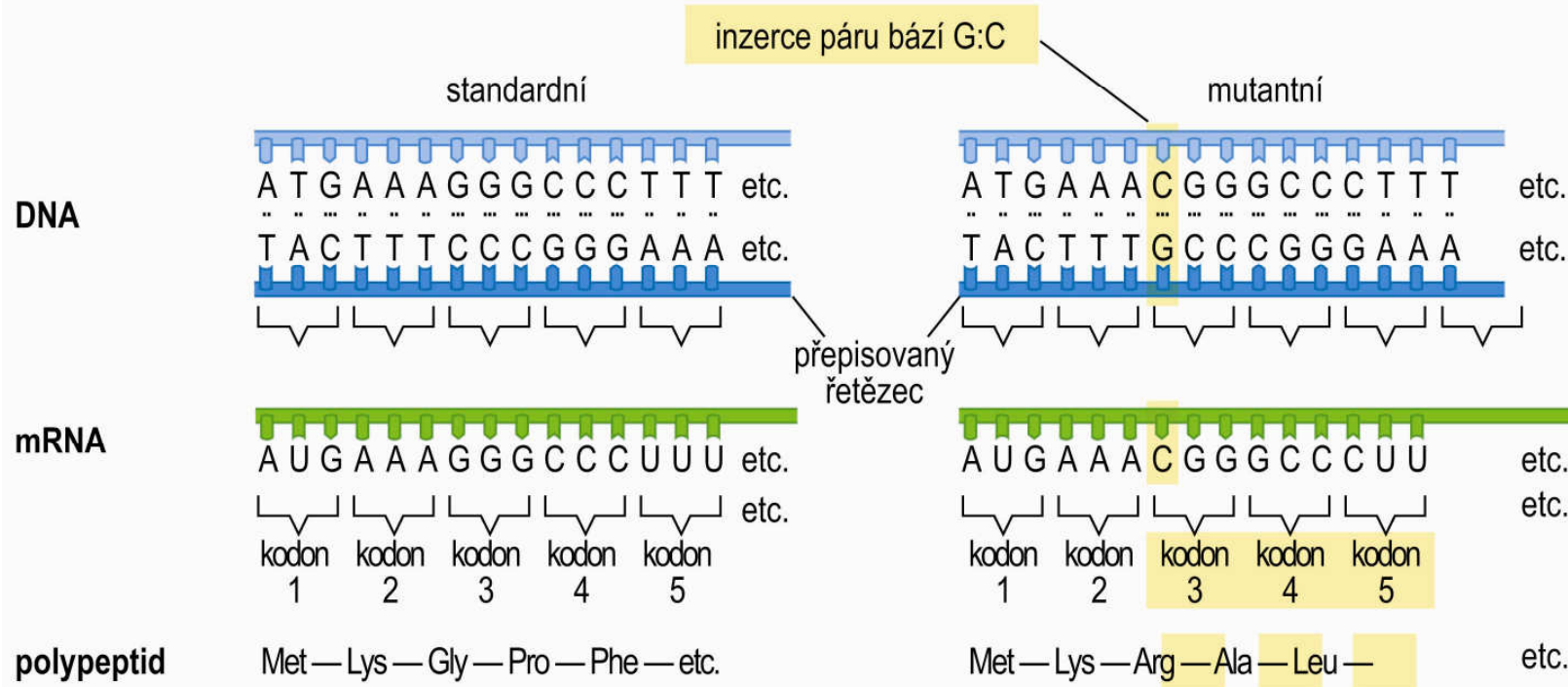


Důsledky spontánní deaminace bází



Posunová mutace vede k posunu čtecího rámce

inzerce nebo delece jednoho nebo dvou párů bází
mění čtecí rámec v genu od místa mutace



(b)

Vznik inzercí a delecí - horká místa (Hot-spots) - oblasti repeticí

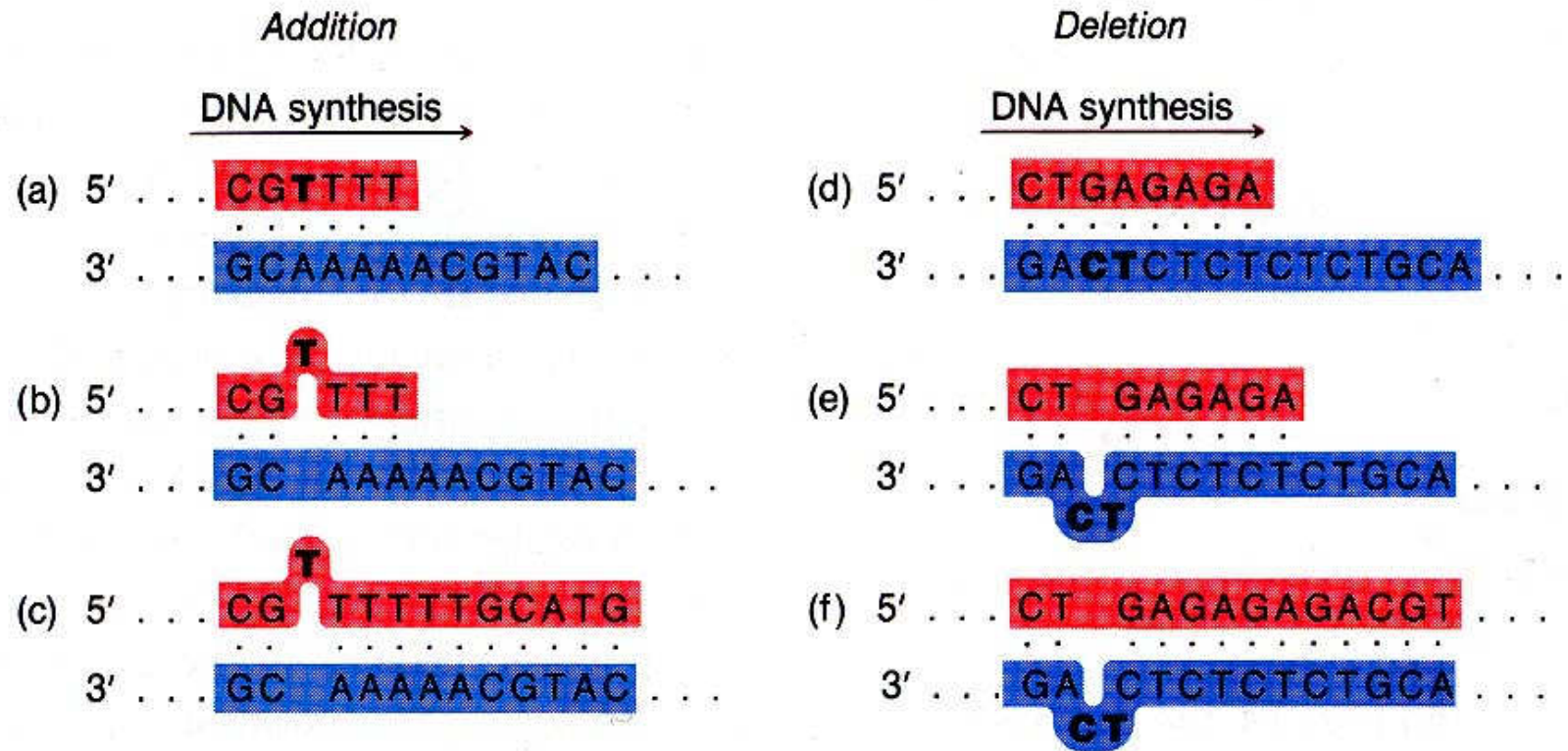
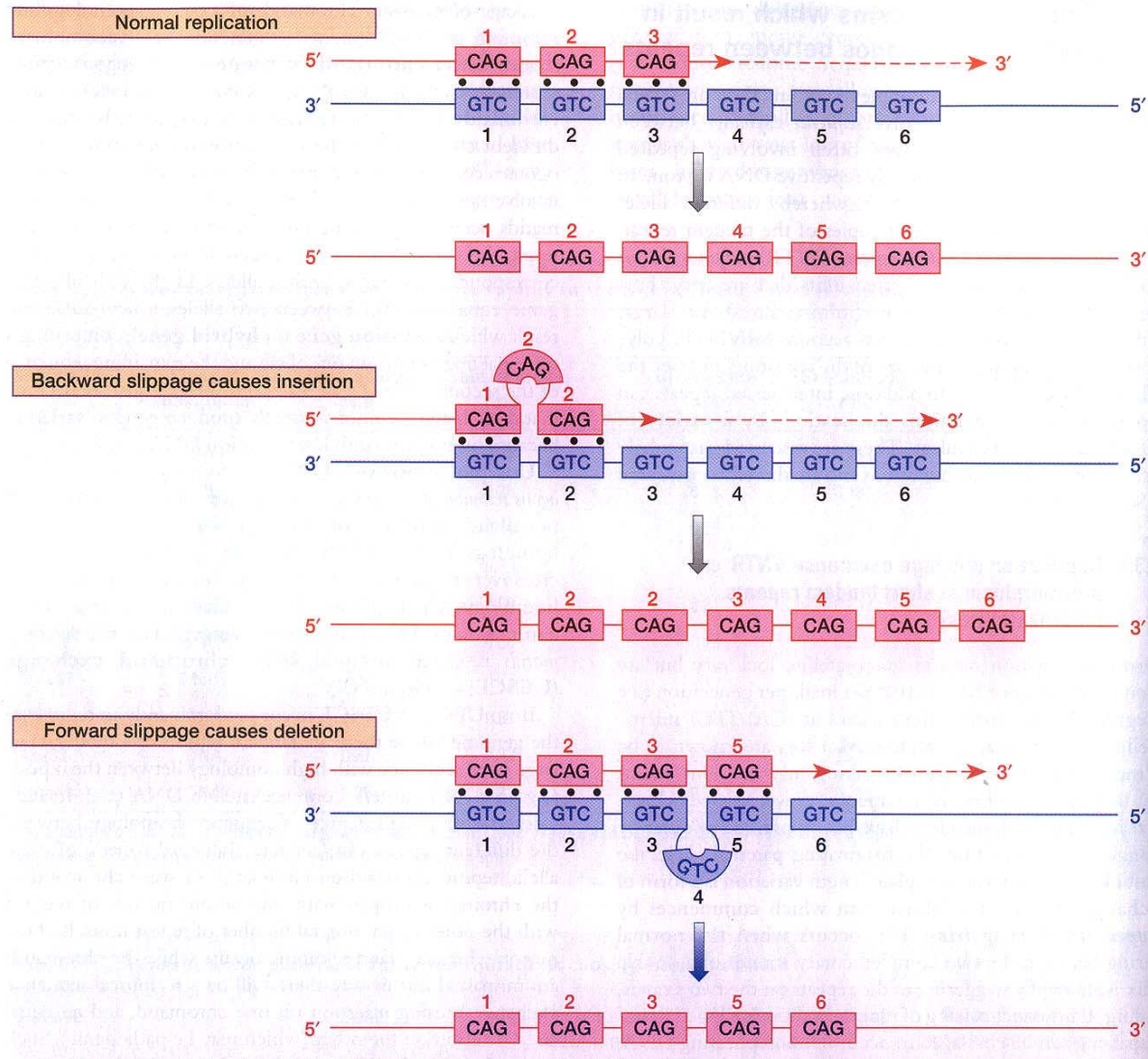


Figure 19-4 A simplified version of the Streisinger model for frameshift formation. (a) to (c) During DNA synthesis, the newly synthesized strand slips, looping out one or several bases. This loop is stabilized by the pairing afforded by the repetitive-sequence unit (the A bases, in this case). An addition of one base pair, A–T, will result at the next round of replication in this example. (d) to (f) If instead of the newly synthesized strand, the template strand slips, then a deletion results. Here the repeating unit is a CT dinucleotide. After slippage, a deletion of two base pairs (C–G and T–A) would result at the next round of replication.

Vznik inzercí a delecí „skluzáváním“ řetězců při replikaci



„replication slippage“
„polymerase slippage“

Expanze trinukleotidů:
dědičné neurologické
choroby

Chemomutageny

A. analogy bází ----- po inkorporaci do DNA během replikace se vlivem tautomerie mohou párovat s různými bázemi

5- BROMURACIL (BU) - analog tyminu

A-BU (ketoforma) <====> BU (enolforma)-G

AT <=====> GC

(8-azaguanin, 5-azacytidin, 5-joddeoxyuridin)

B. látky chemicky modifikující báze -----> změny v párování
(působí i na DNA, kteřá se nereplikuje)

* kyselina dusitá - deaminace C na U GC-->AT
 -"- A na H AT-->GC
 -"- G na X GC-->AT

* hydrogensířičitan - deaminace C na U GC--> AT

* hydroxylamin - NH₂->/NHOH GC-->AT (AT-->GC)

* alkylační látky - (alkylsulfáty, N-nitrozosloučeniny)

- dimetylsulfát

- etylmetansulfonát

- nitrozoguanidin

alkylované báze se nepárují nebo vytvářejí chybné páry bází, případně meziřetězcové křížové vazby

* interkalační látky -----> posunové mutace

akridiny

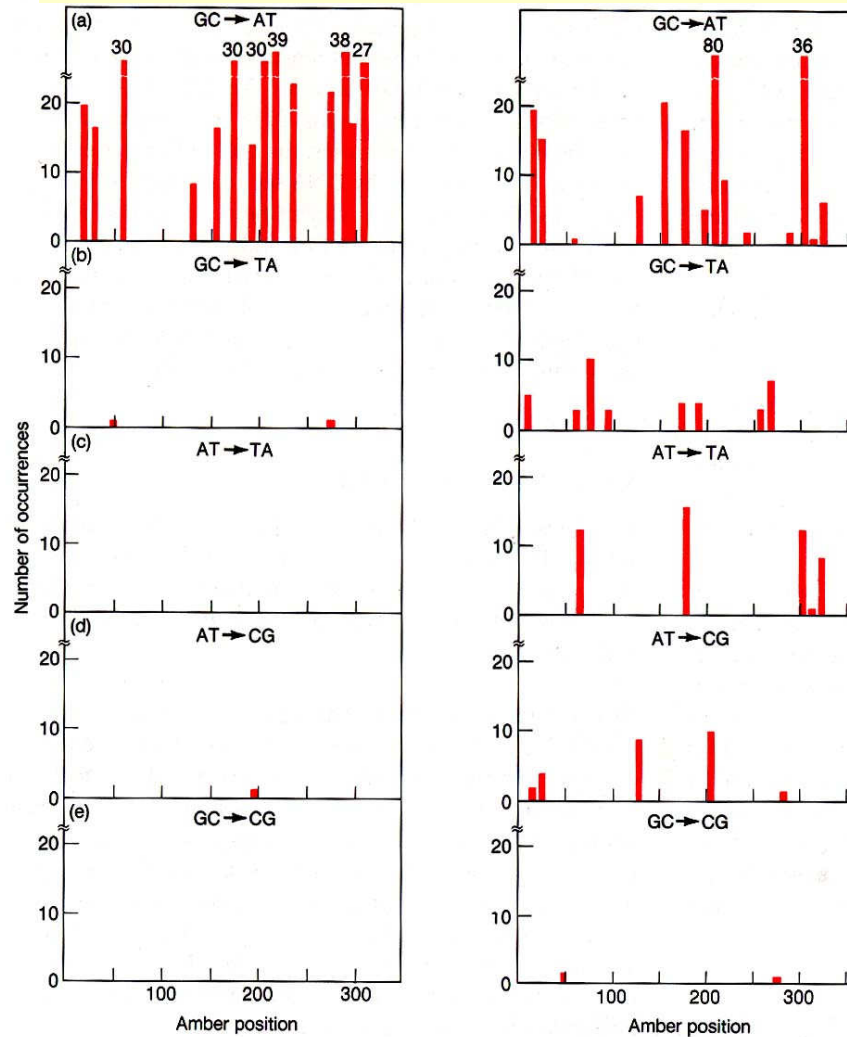
etidumbromid

psoraleny (furokumariny)

Specificita mutagenů - distribuce mutací různého typu vyvolaných různými mutageny v genu *lacI*.

EMS

UV-záření



Mutageneze pomocí 5-BU

účinek enolformy 5-bromuracilu během:

začleňování

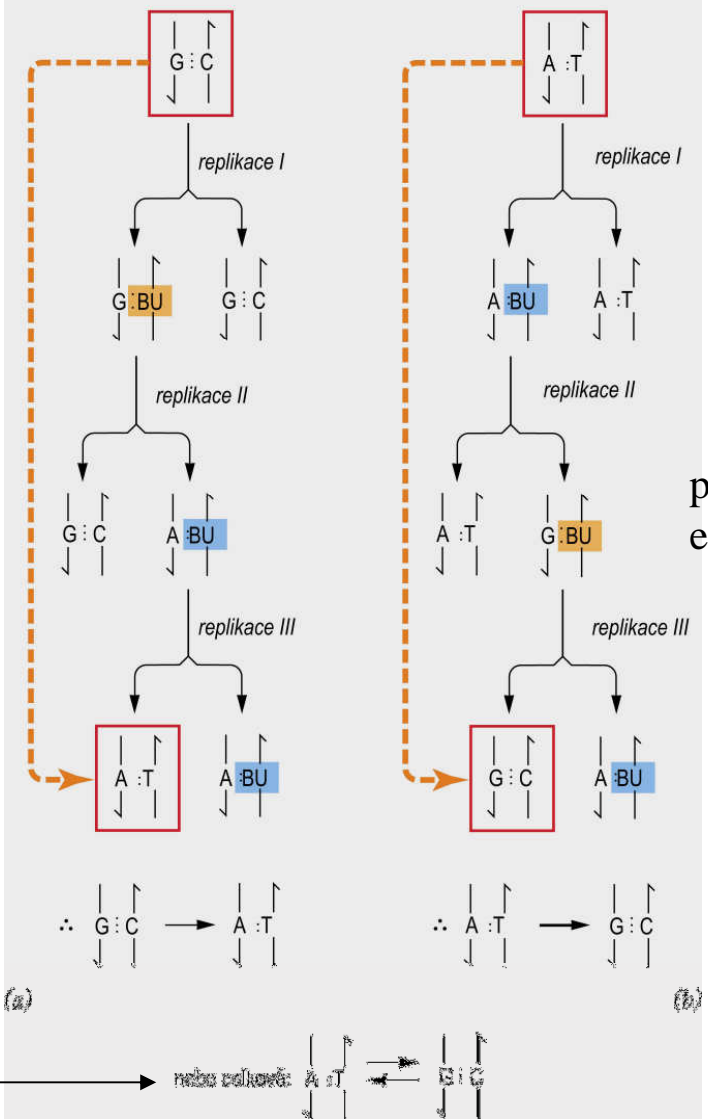
replikace po začlenění

Začlenění vzácnější enolformy BU proti G

Začlenění běžnější ketoformy BU proti A

přechod enolformy BU na ketoformu a párování s A

přechod ketoformy BU na enolformu a párování s G



Výsledek: transice oběma směry



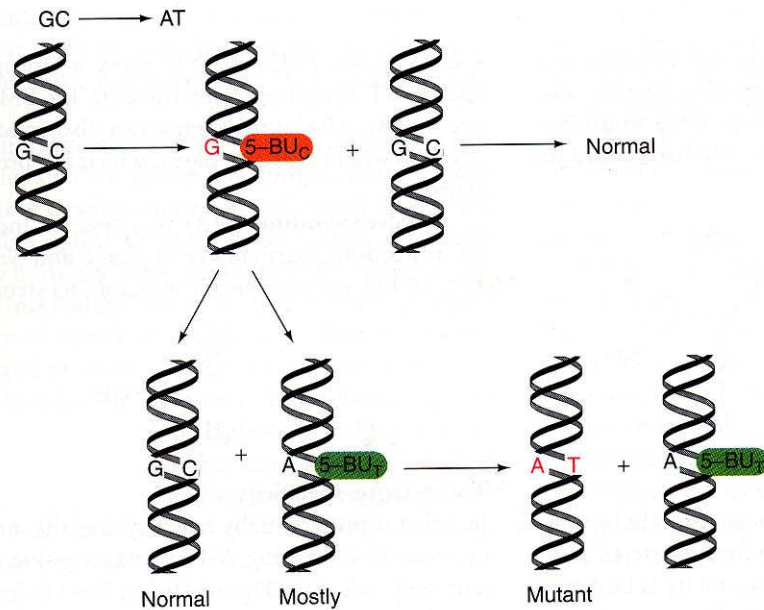
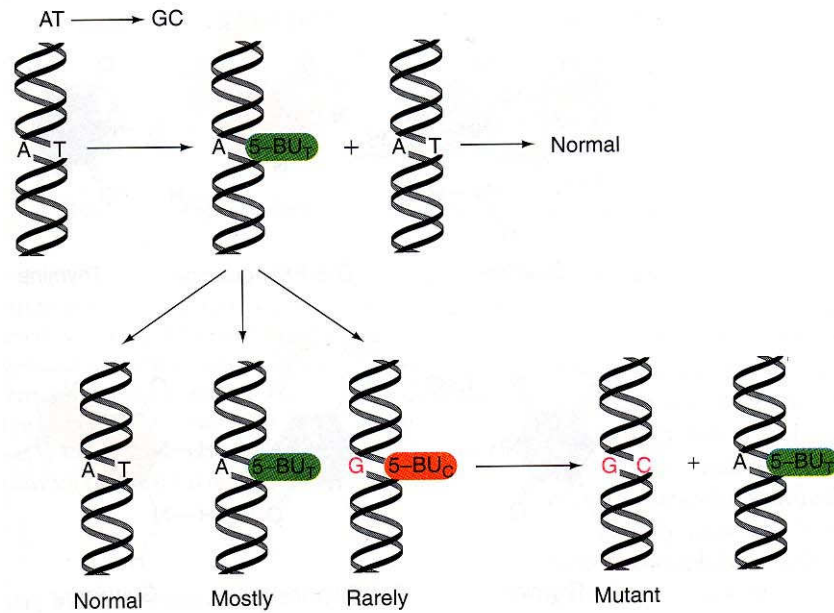
Mutagenese pomocí 5-BU

(analog tyminu)

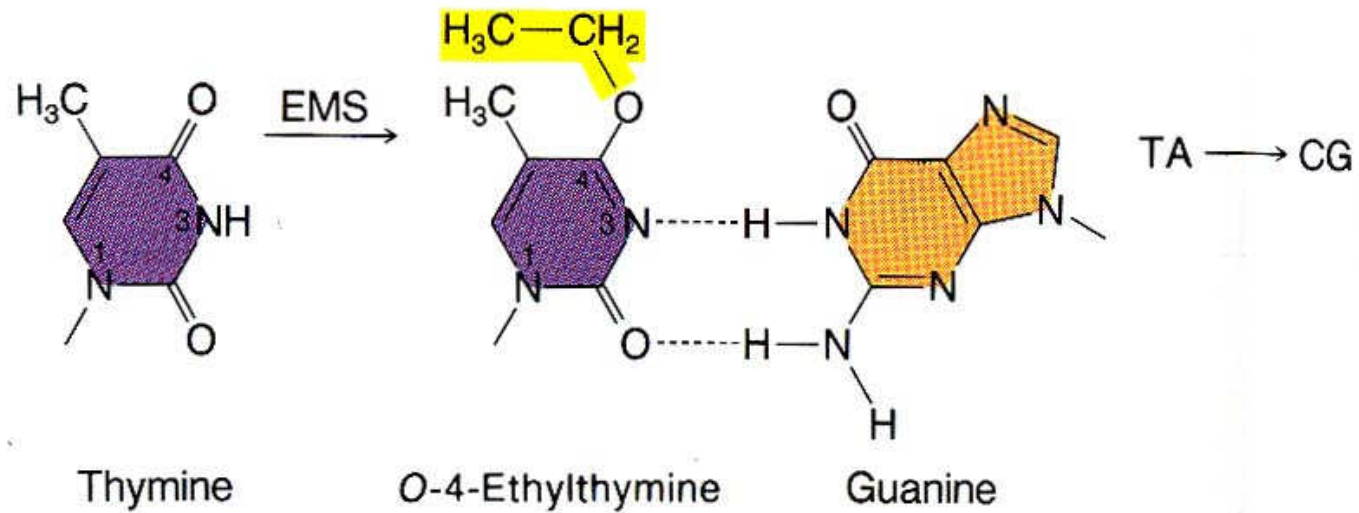
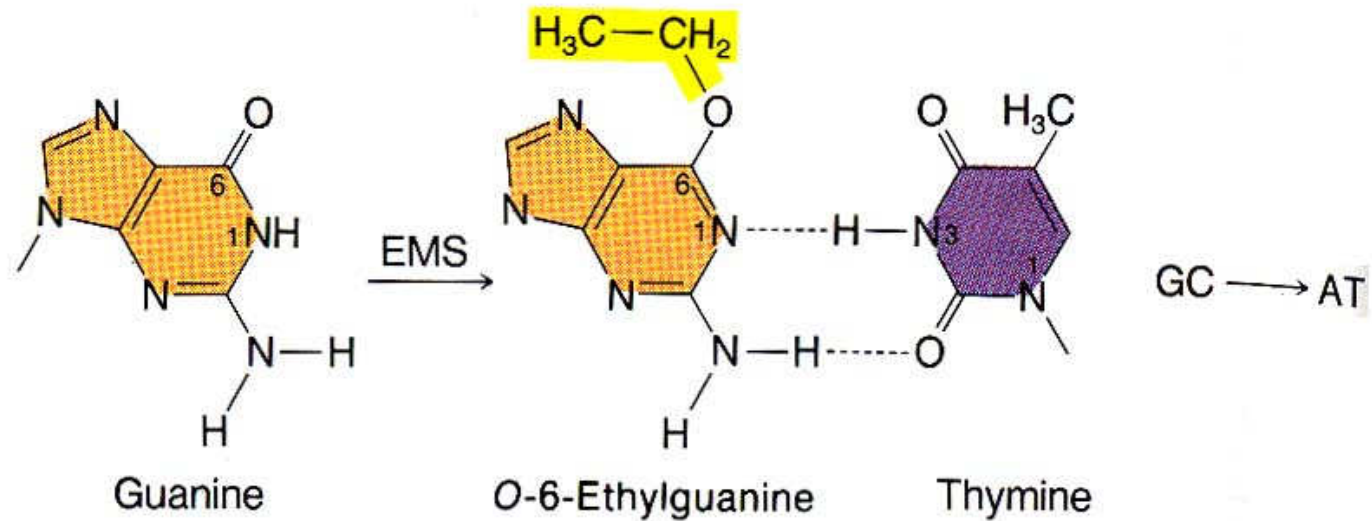
transice v obou směrech:

5-BU(keto) - A

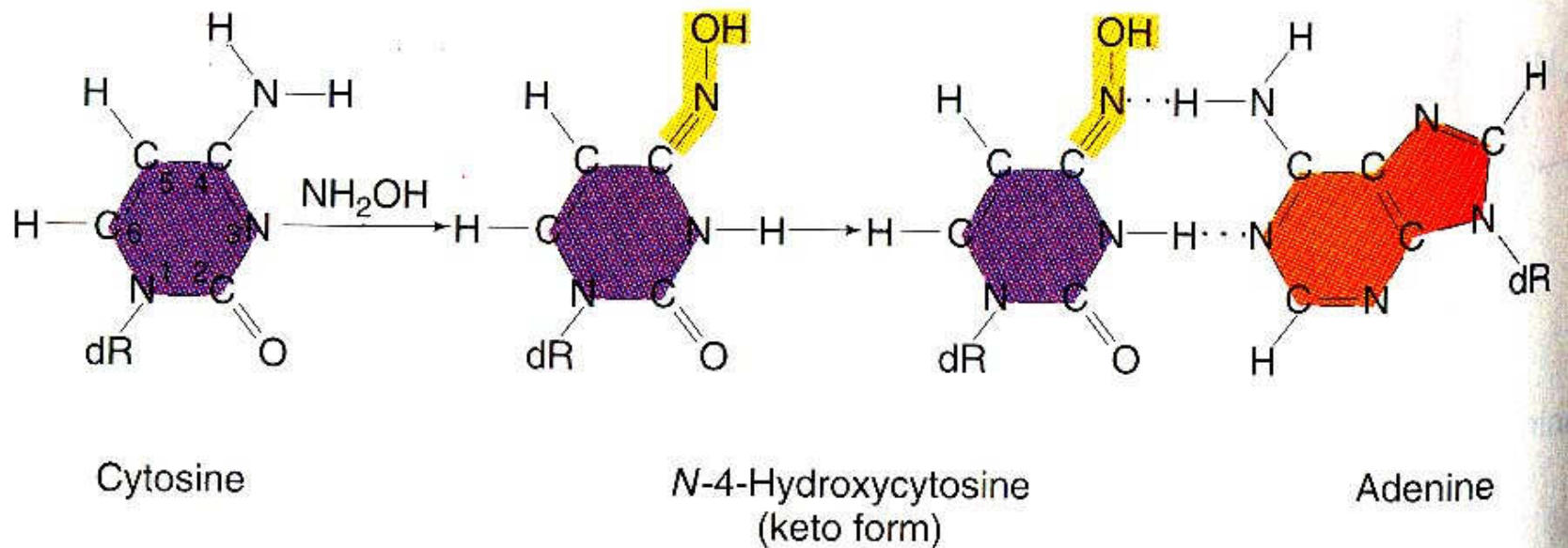
5-BU(enol, ioniz) - G



Působení alkylačních činidel

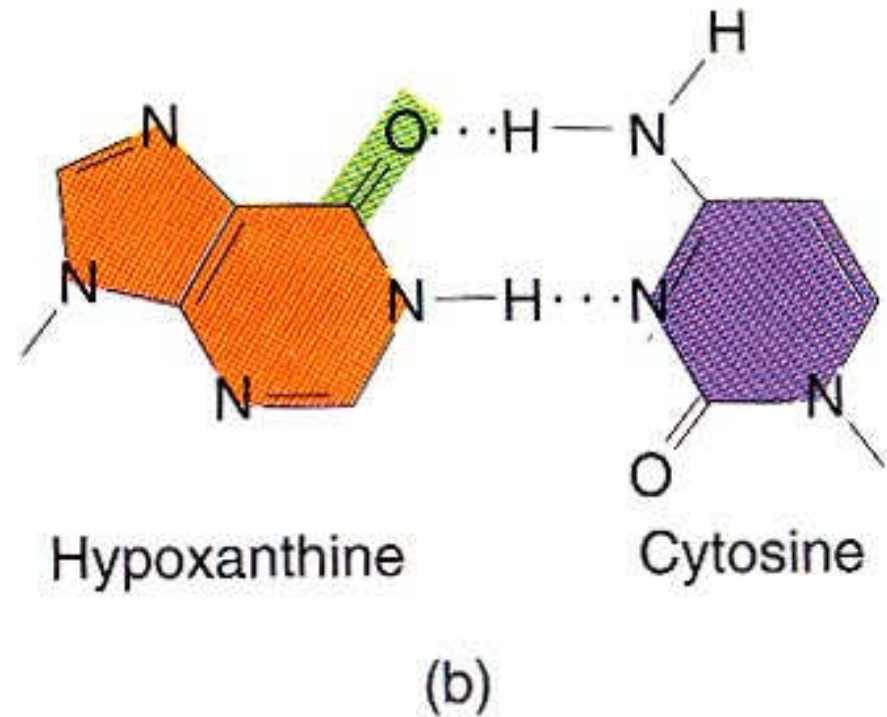
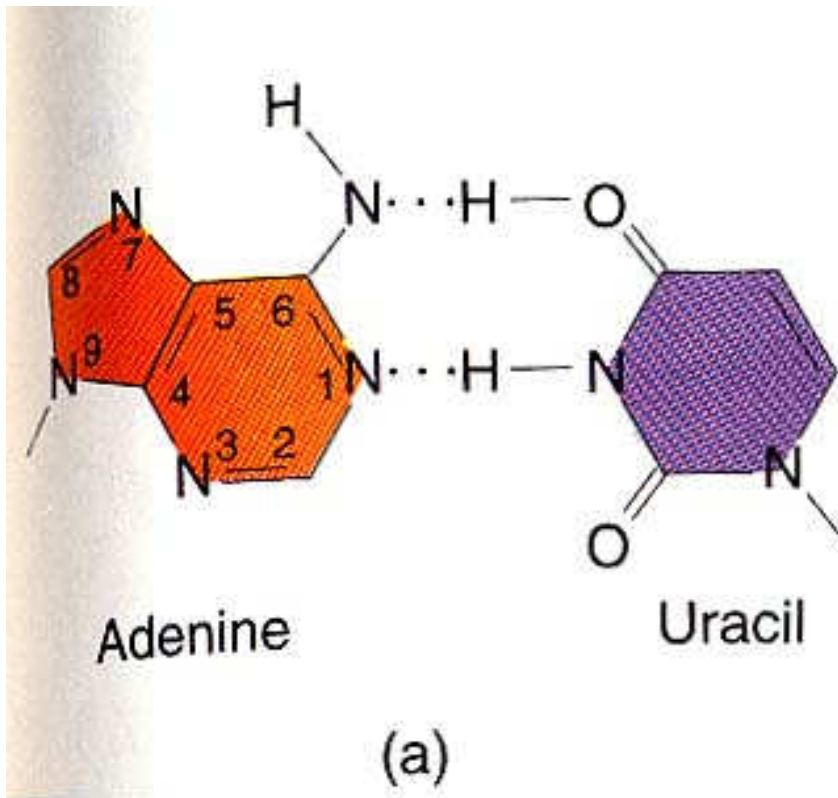


Působení hydroxylaminu: specifické transice **GC** → **AT**
(preferenční hydroxylace **N** na C-4 cytozinu)

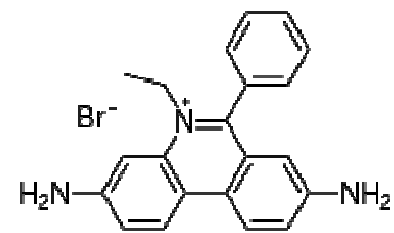
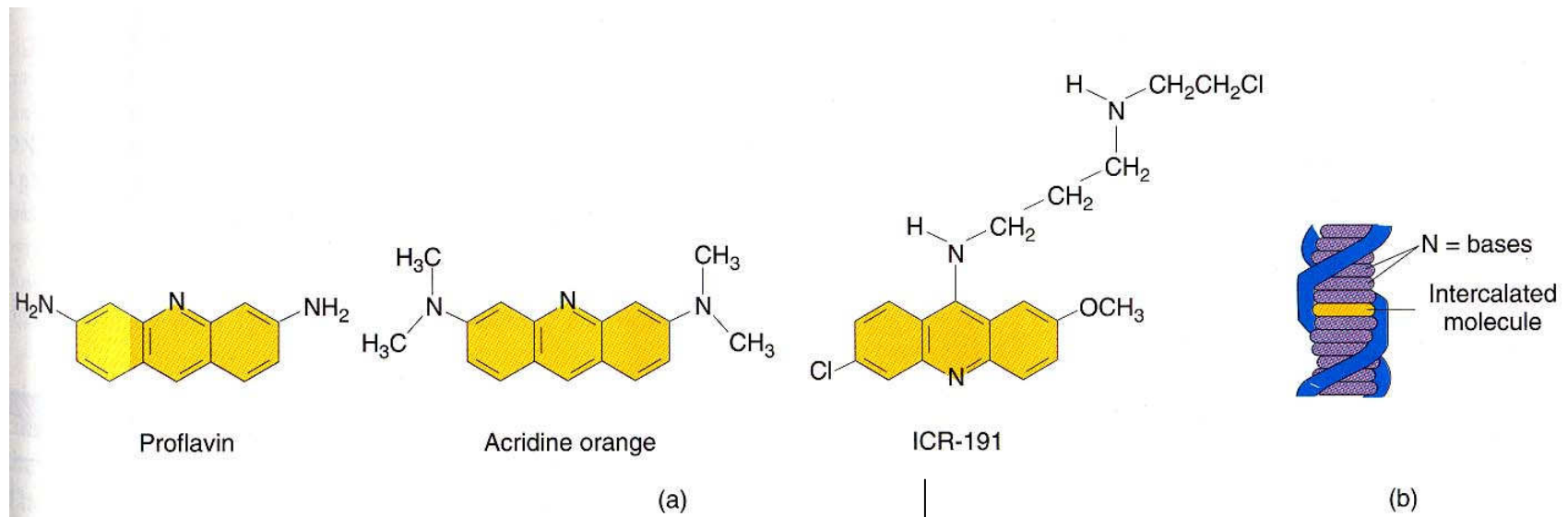


Oxidativní deaminace bází vyvolaná kyselinou dusitou

cytozin \longrightarrow **uracil (T)**, **adenin** \longrightarrow **hypoxantin (G)**



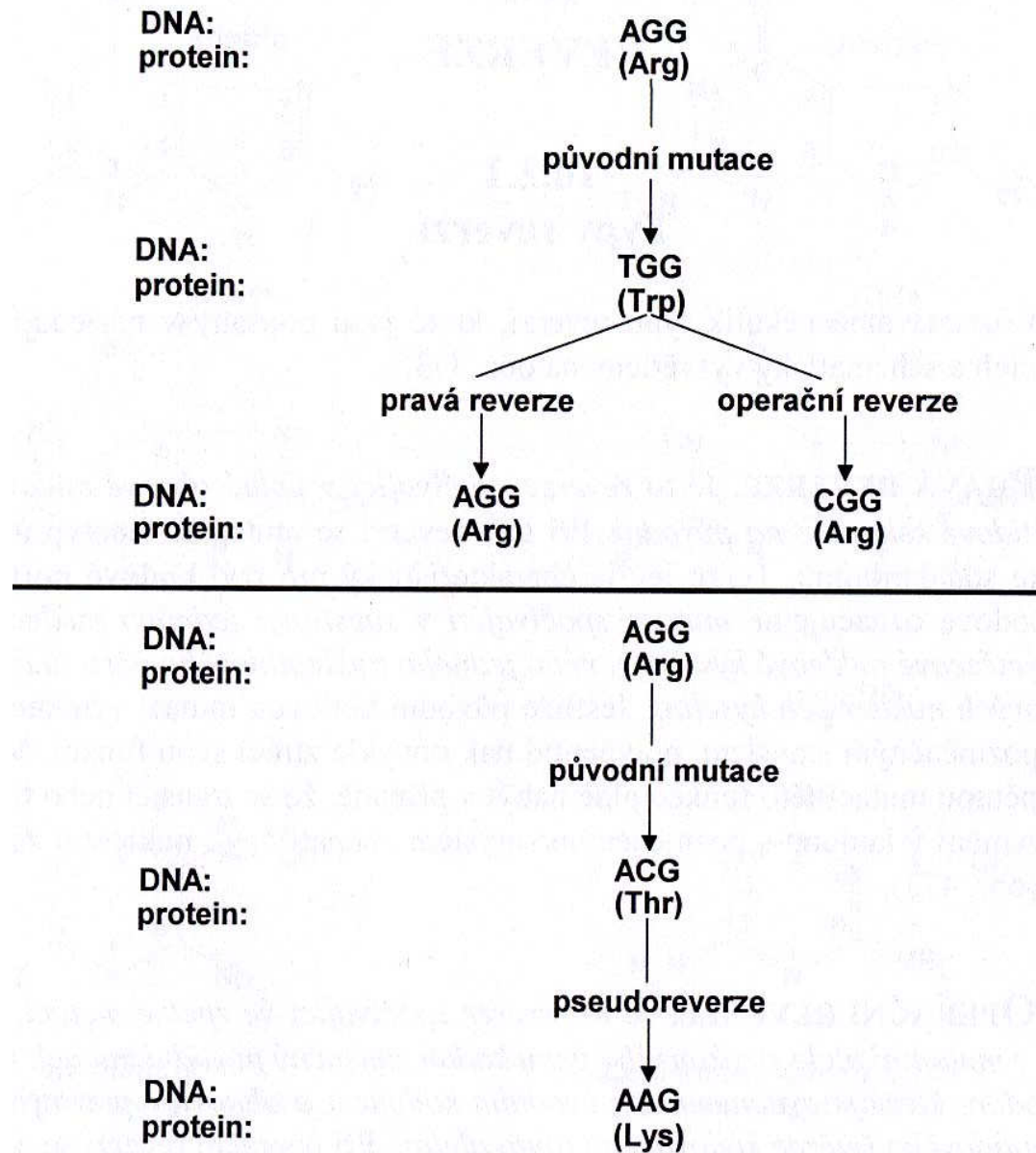
Interkalační činidla



etidium bromid

Inst.Cancer.Res.
(akridinový derivát)

Typy reverzí (záměny bází ve stejné pozici kodonu)



Supresorová mutace

Definice: mutace, která částečně nebo úplně ruší účinek jiné mutace (tzv. supresorsenzitivní mutace)

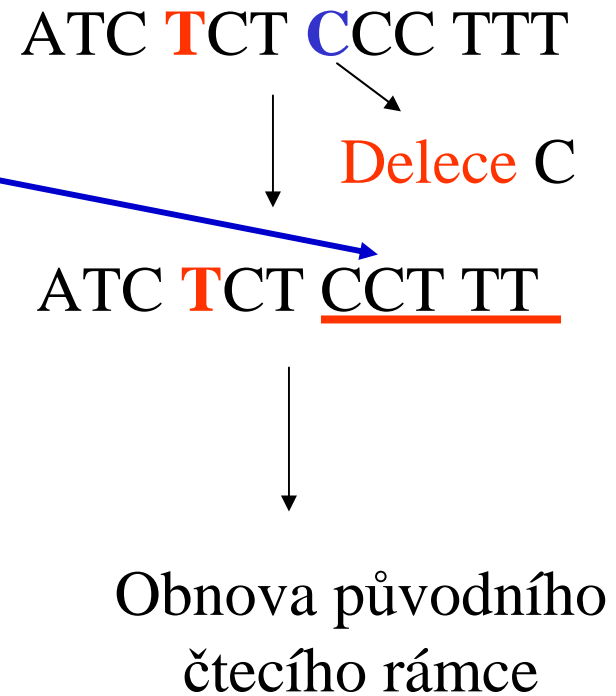
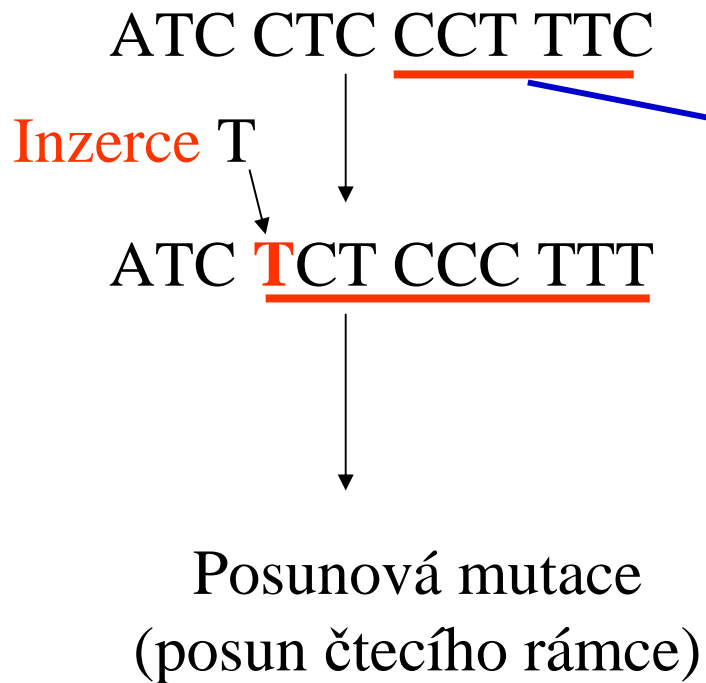
- a) intragenová: vzniká uvnitř téhož genu**
- b) intergenová: vzniká v jiném genu**

Na rozdíl od reverzí mutace proběhne v jiném místě DNA

Intragenová supresorová mutace (I)

Supresorsenzitivní mutace

Supresorová mutace



Intragenová supresorová mutace (II)

TCA původní kodon



Supresorsenzitivní mutace (první mutace)

TAA stop kodon, ztráta funkce produktu



Supresorová mutace (druhá mutace)

TAT kodon pro jinou aminokyselinu, obnova funkce produktu (někdy jen částečná)

Intergenová supresorová mutace

nemění se mutovaný gen, ale je ovlivněn způsob, jímž je překládána jeho mRNA

vlastní mutace = supresorsenzitivní (sus-)

- změna určitého kodonu na kodon nesmyslný nebo kodon s pozměněným smyslem

supresorová mutace = mutace v genu pro tRNA, kterou vzniká tRNA s pozměněným kodonem

gen supresor = mutantní alela genu pro tRNA (sup-)

Kmen obsahující supresor = supresorpozitivní Su⁺

neobsahující -"- = supresornegativní Su⁻

Intergenová supresorová mutace v genu pro tRNA

Standardní gen

TTC CCA ACA GCT TTA

Supresorsenzitivní
mutace

TTC CCA ACA GCT TAA

Přepis do mRNA

UUC CCA ACA GCU UAA
STOP

Předčasné zakončení translace

gen pro tRNA^{Leu}

XYZXYZXYZ-AAT-XYZ

Supresorová mutace

Gen - supresor

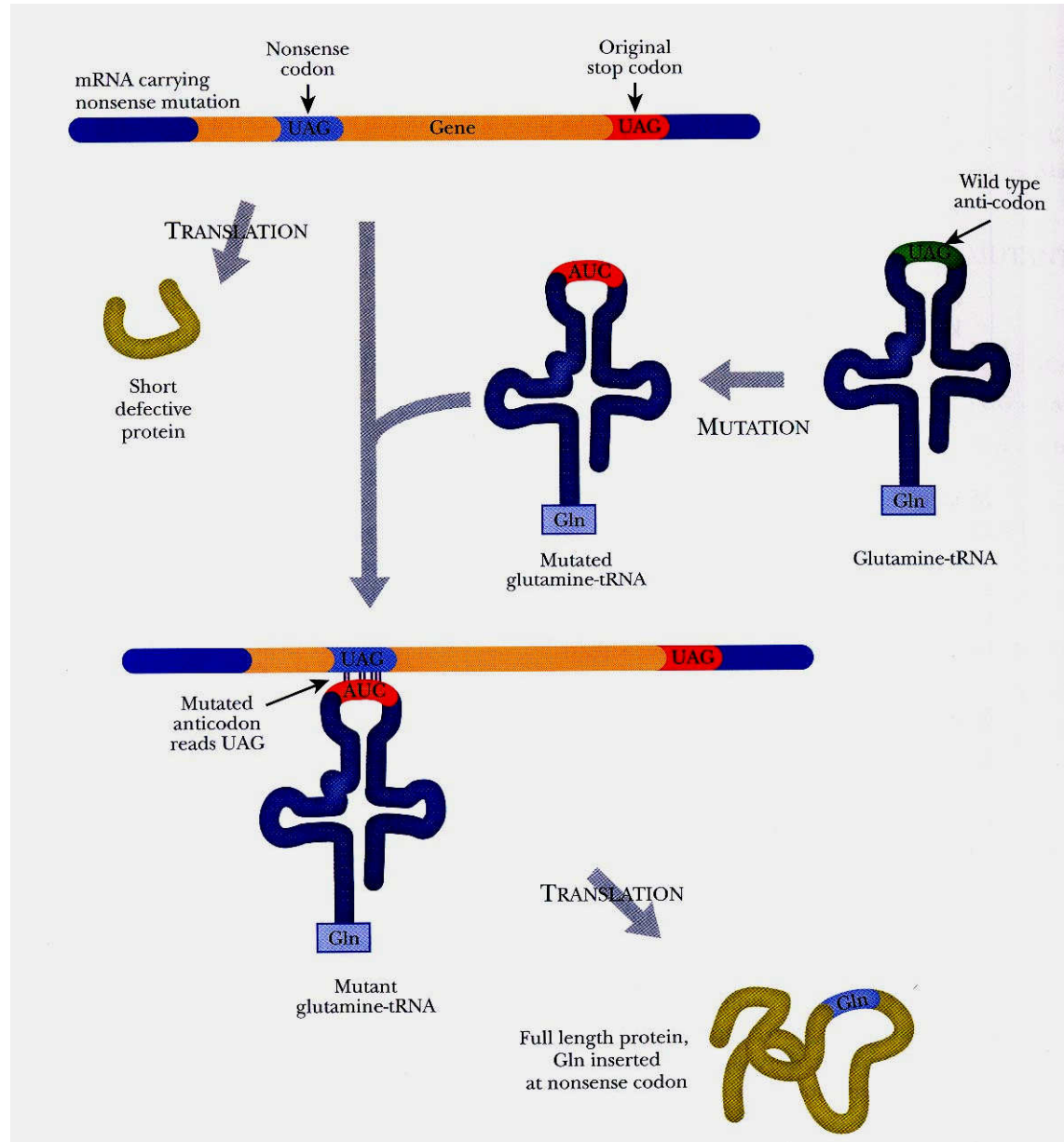
XYZXYZXYZ-ATT-XYZ

Sekvence
přepisovaná do
antikodonu

Přepis do tRNA s
antikodonem **AUU**, který
se bude párovat s
terminačním kodonem
UAA

syntéza proteinu pokračuje

Mechanismus intergenové supresorové mutace



Metabolická aktivace - změna promutagenu na mutagen
(většinou alkylační látka) enzymovou přeměnou v organismu

- **dusičnany** (mění se nejdříve na metylnitrozomočovinu, která se mění na ionty CH_3^+ , které alkylují DNA)

Polycyklické uhlovodíky

- **benzpyren** - cigar, výfuky - mění se arylhydroxylázami, např. na epoxidy

- **N-alkyl-N-nitrózaminy** - vytváří se aktivní CH_3^+

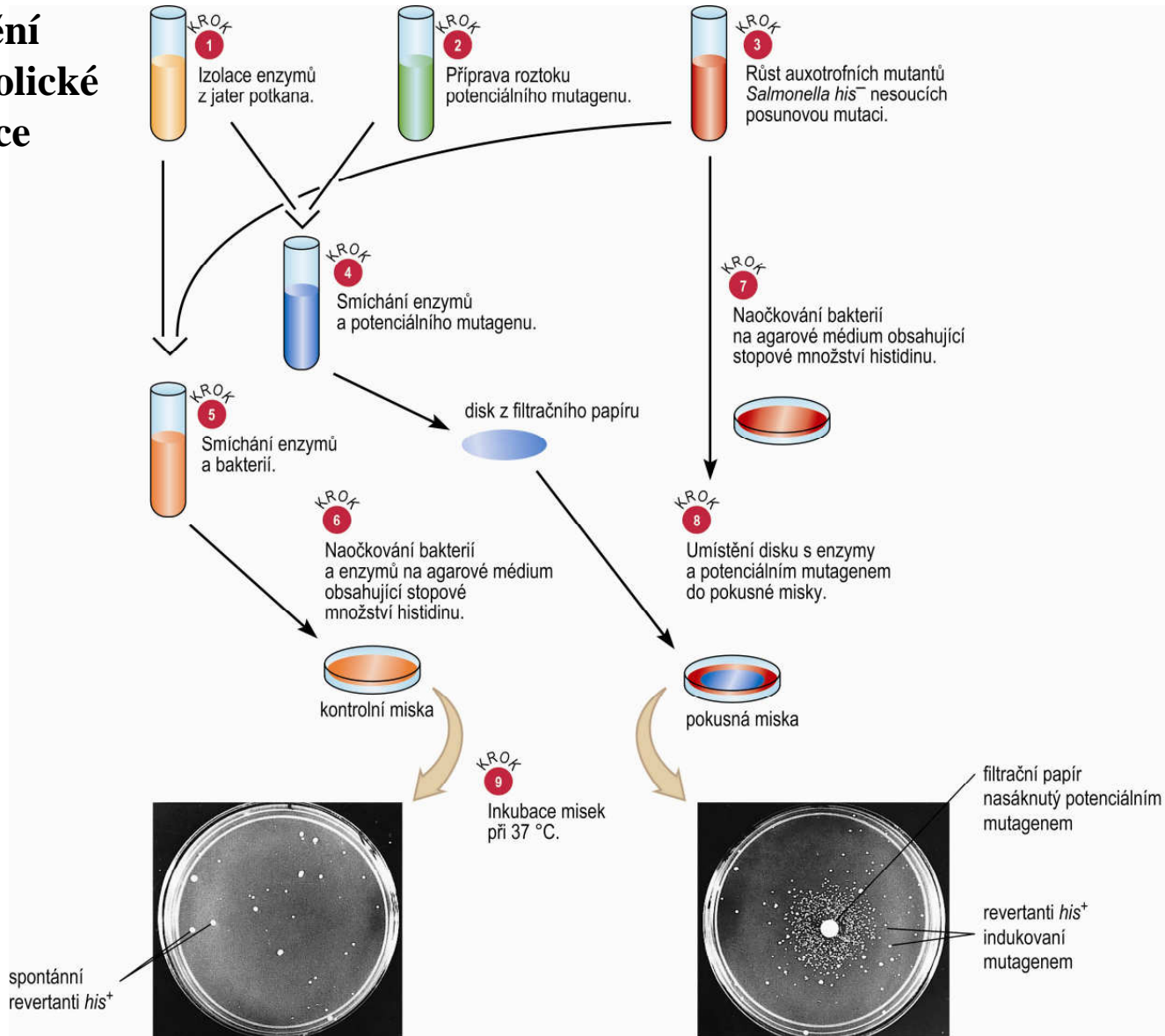
- **aromatické aminy**

- **přírodní produkty (aflatoxin)**- aspergillus

Proteiny cytochromového systému P-450 vyznačující se oxygenázovou aktivitou (detoxikace nepolárních látek),
+ řada dalších enzymů

Amesův test na mutagenitu

Zajištění metabolické aktivity



REPARACE MUTAČNĚ POŠKOZENÉ DNA

- **A. Přímé reparaace**
 - 1. fotoreaktivace
 - 2. dealkylace
- **B. Nepřímé reparaace**
 - 1. Excizní reparaace
 - bázová
 - nukleotidová
 - řízená metylací
 - 2. rekombinační /postreplikační/
 - 3. reparaace kroslinků
- **C. Inducibilní reparaace**
 - 1. SOS-odpověď
 - 2. adaptivní odpovědi
 - na alkylační poškození
 - na environmentální stres

Genetický aparát pro reparaci DNA

- velmi konzervativní
- asi 100 genů
- distinktní dráhy,
které se mohou
prolínat

TYPY REPAROVATELNÝCH POŠKOZENÍ NA DNA

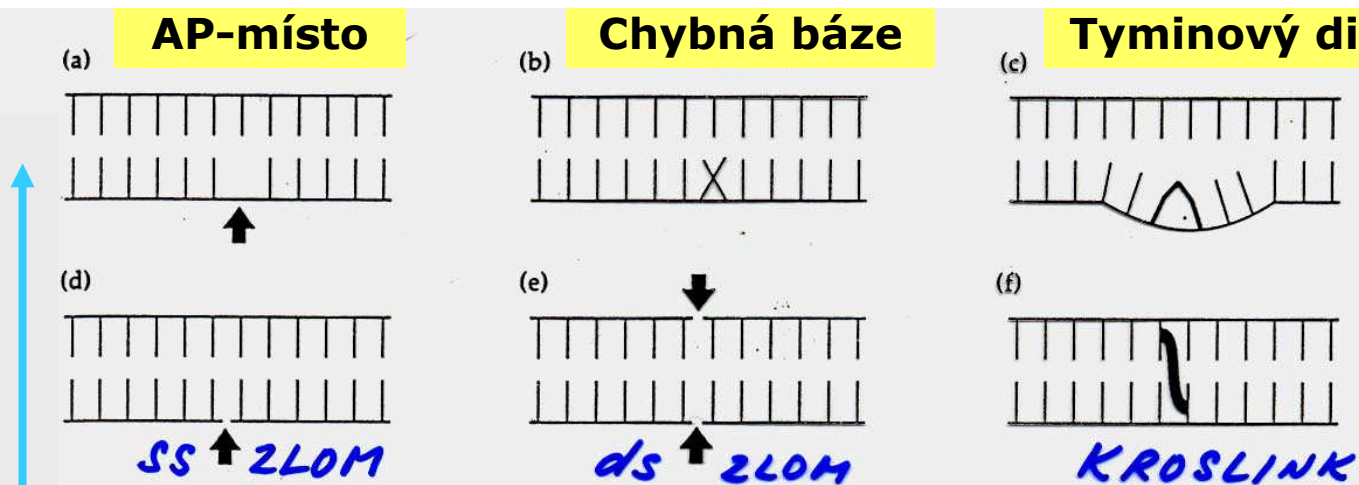


Fig. 8.1 Classification of repairable lesions. (a) Missing base; (b) incorrect base; (c) modified base (distorting the double helix); (d) single-strand break; (e) double-strand break; (f) interstrand cross-link.

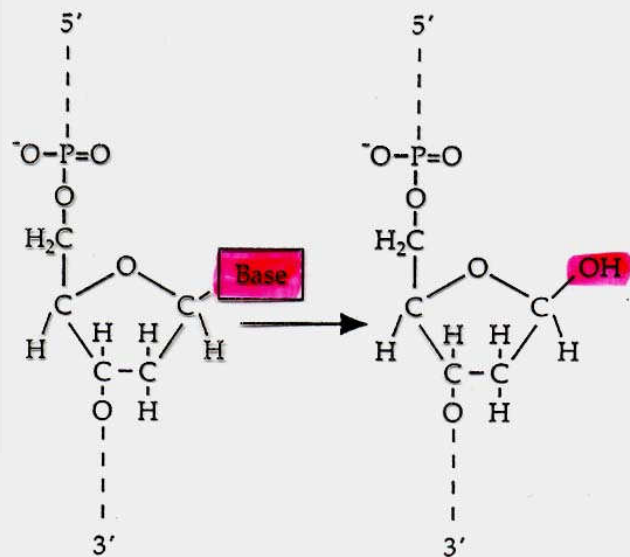
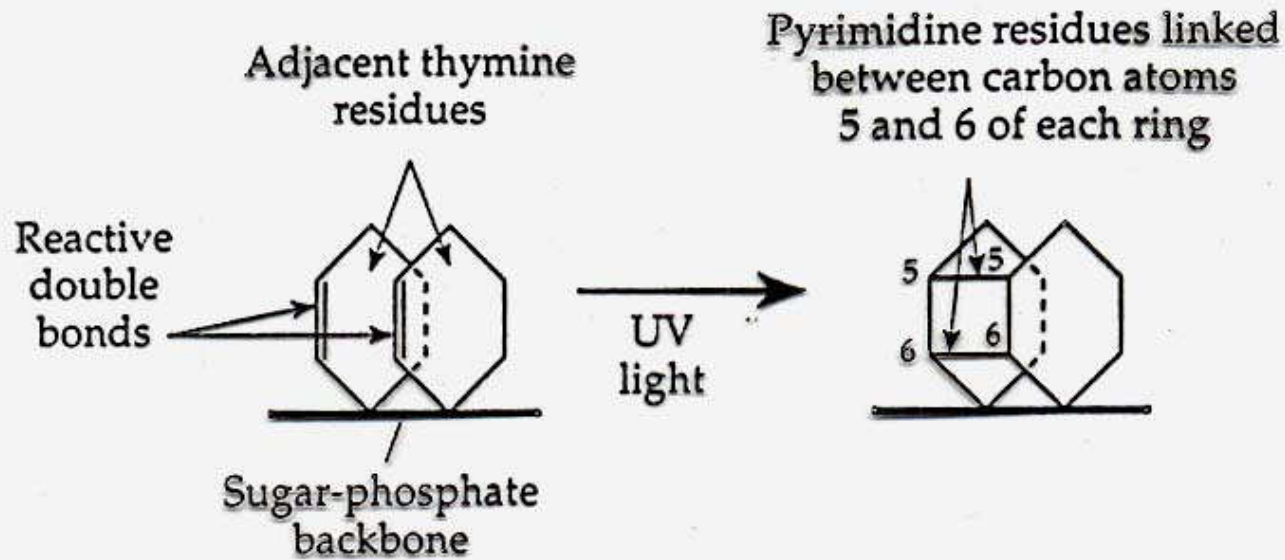


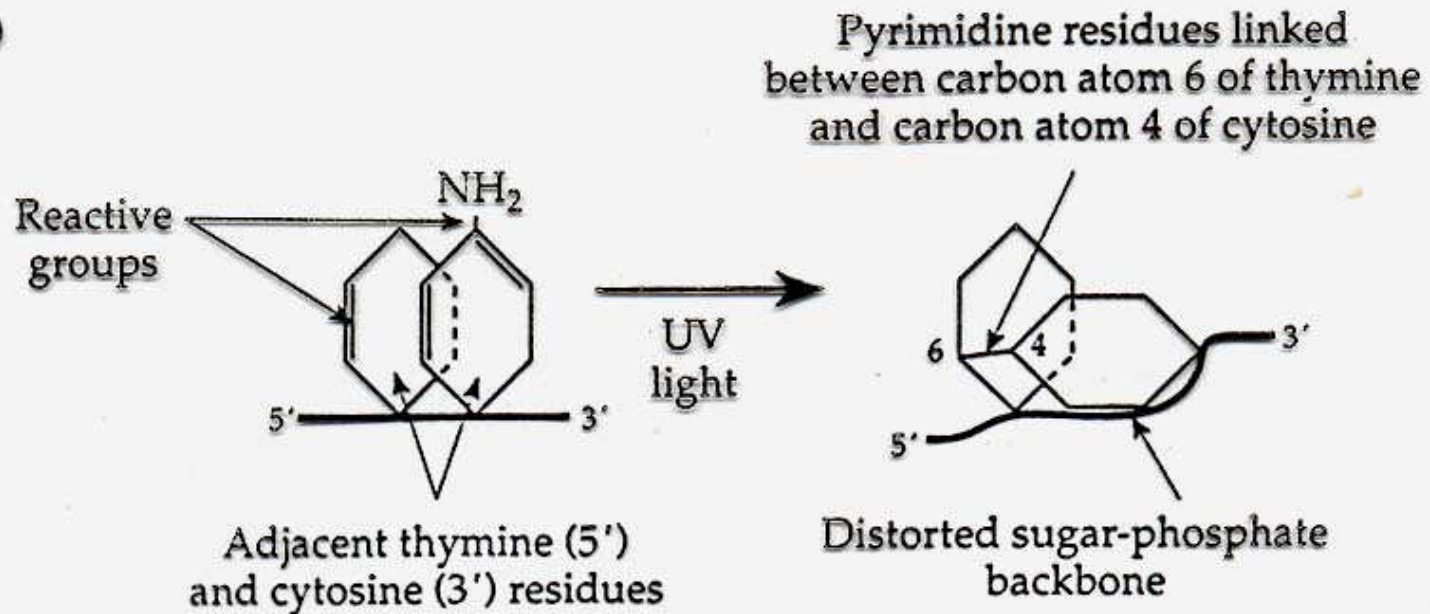
Fig. 8.2 Formation of an AP (apurinic/apyrimidinic) site.

Vznik AP míst = nejčastější spontánní mutace (depurinace je 100x častější než depyrimidinace)

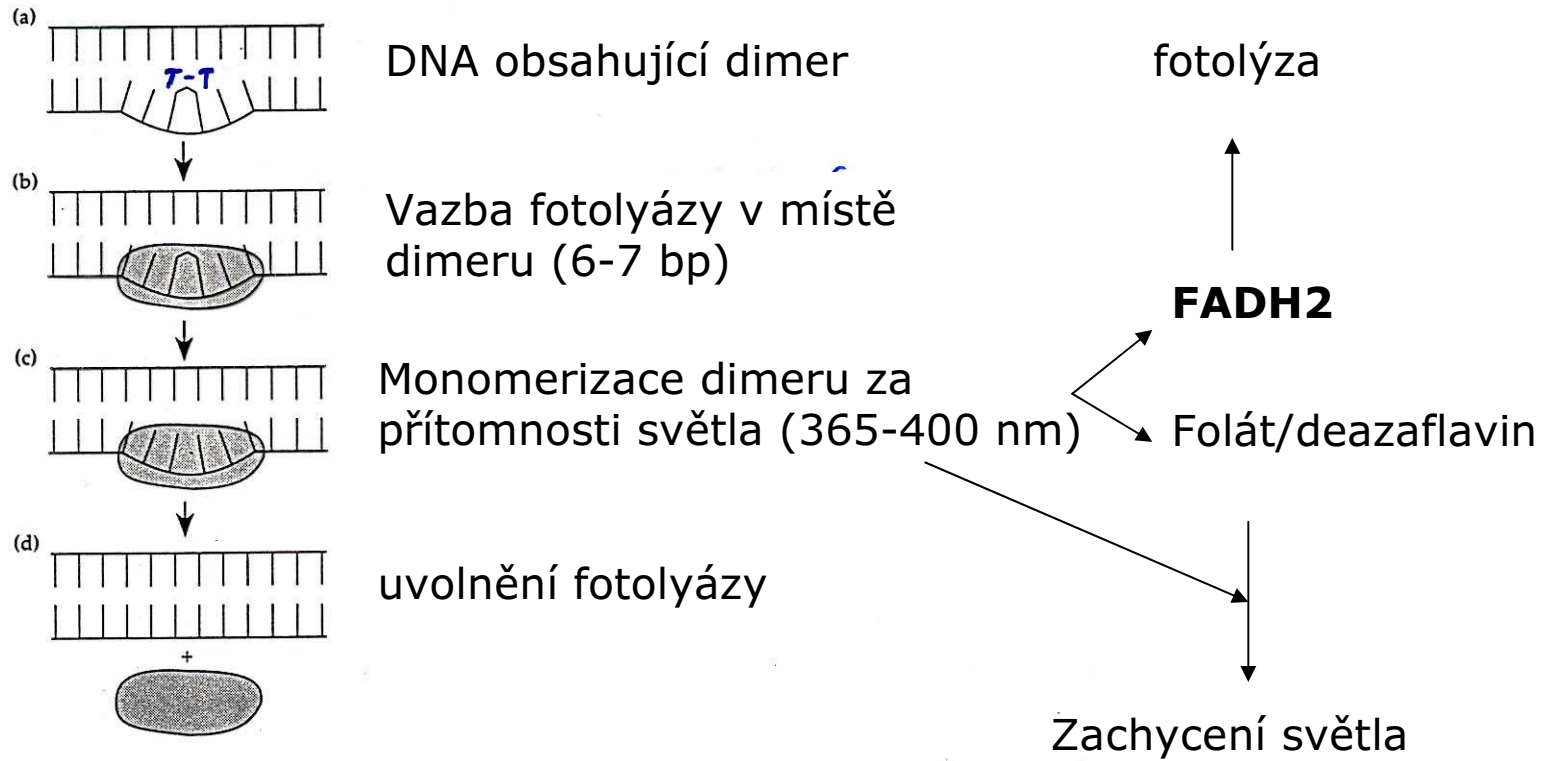
(a)



(b)



FOTOREAKTIVACE



Alkyltransferáza: ⁶O-Metylguanin-DNA-metyltransferáza (⁶O-MGT= Ada-protein)

nemetylovaná forma

metylovaná forma

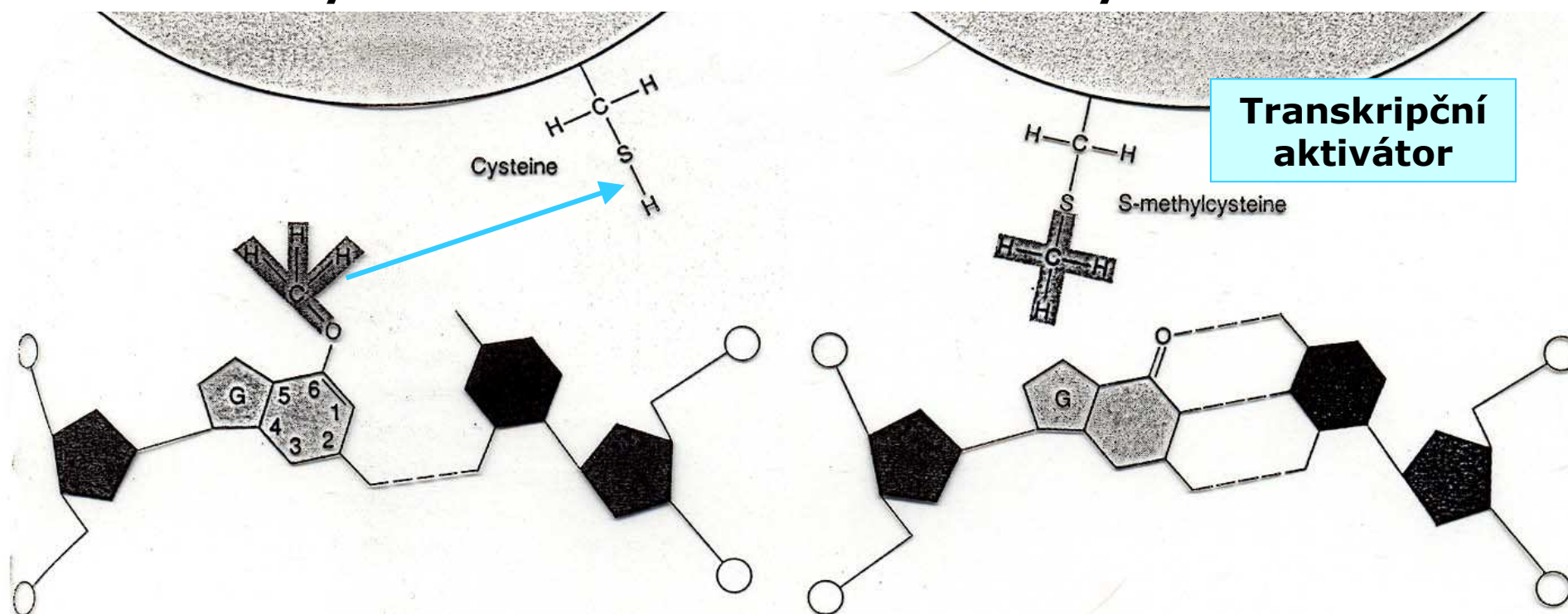
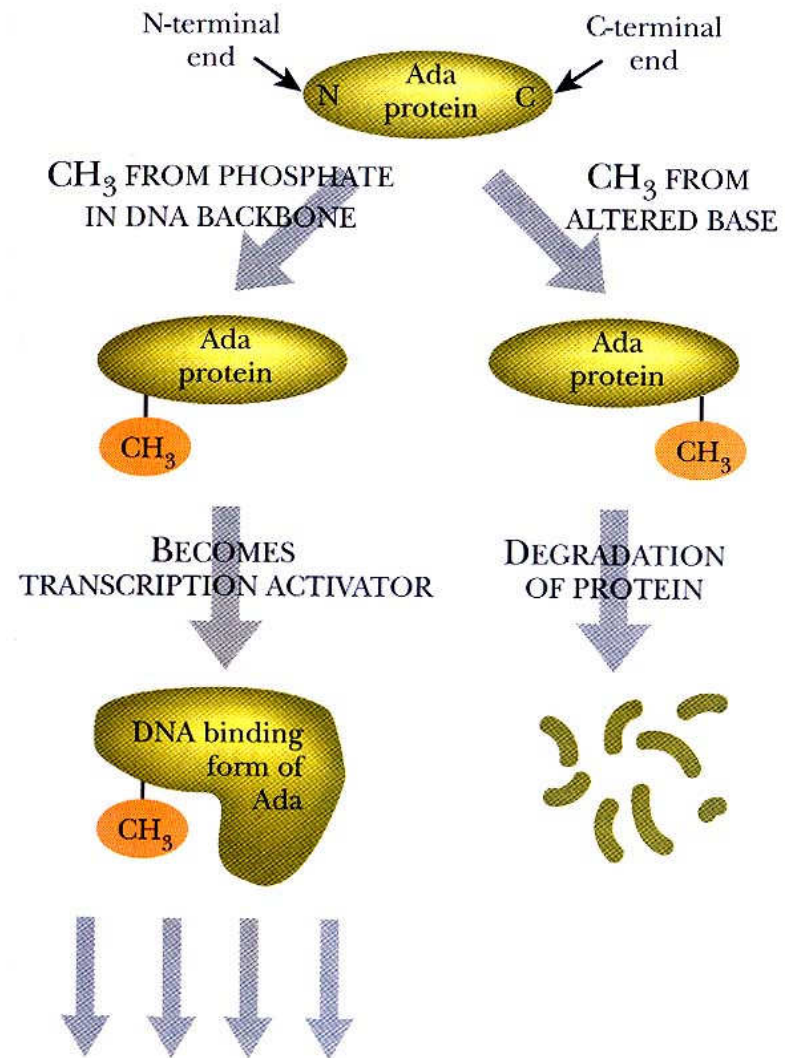
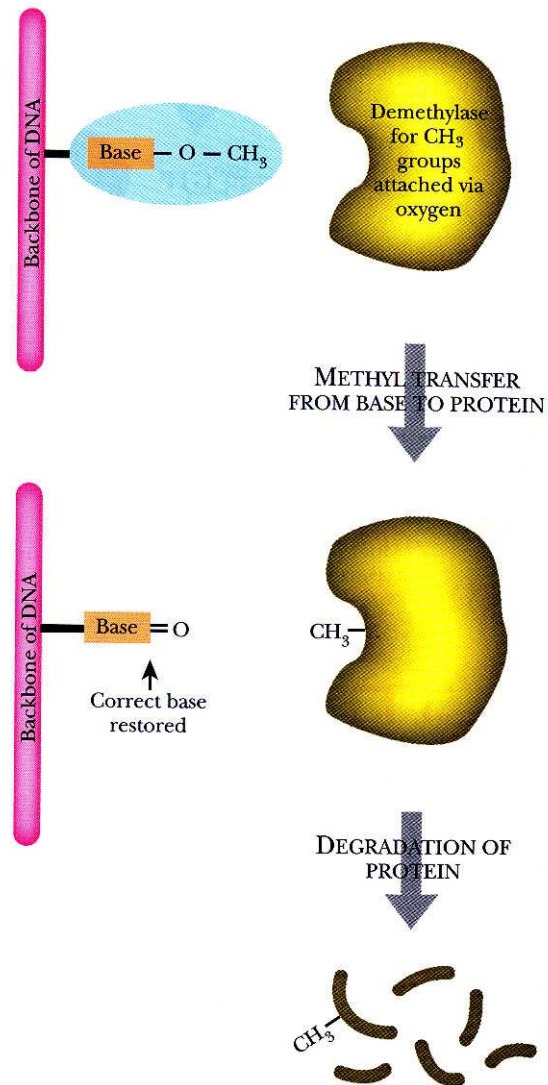


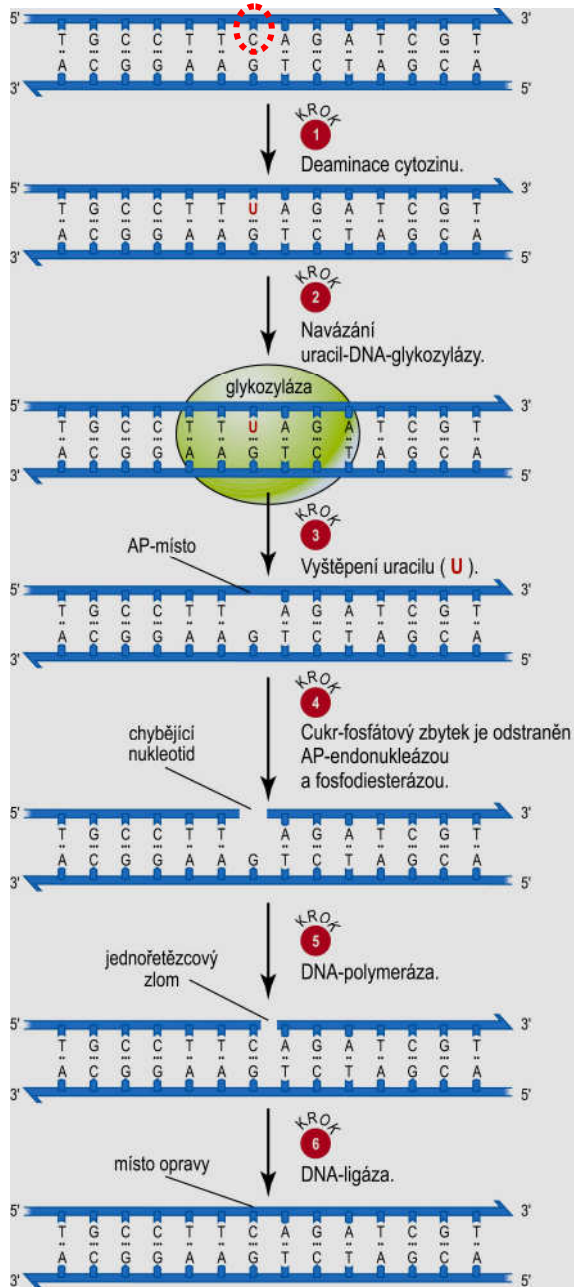
Figure 19-29 Direct reversal of DNA damage by an alkyltransferase. Methylation of a guanine residue by nitrosoguanidine (NG) is repaired by this novel process. The NG adds a methyl group (CH₃) at various sites in the DNA, including an oxygen atom at position 6 of guanine (*left*). This disrupts the hydrogen bonding of guanine to a cytosine. The repair is accomplished by a methyl-acceptor protein, one of the enzymes known as *alkyltransferases*. A cysteine residue on the protein acts as the methyl acceptor: it binds the CH₃ group, thereby restoring the guanine to its original state (*right*). (From P. Howard-Flanders, "Inducible Repair of DNA." Copyright © 1981 by Scientific American, Inc. All rights reserved.)

Dvojitá úloha proteinu Ada při reparaci alkylované DNA



Aktivace genů zodpovědných za reparaci

Bázová excizní oprava



1. Abnormální báze v DNA

2. Rozpoznání **specifickou glykozylázou**

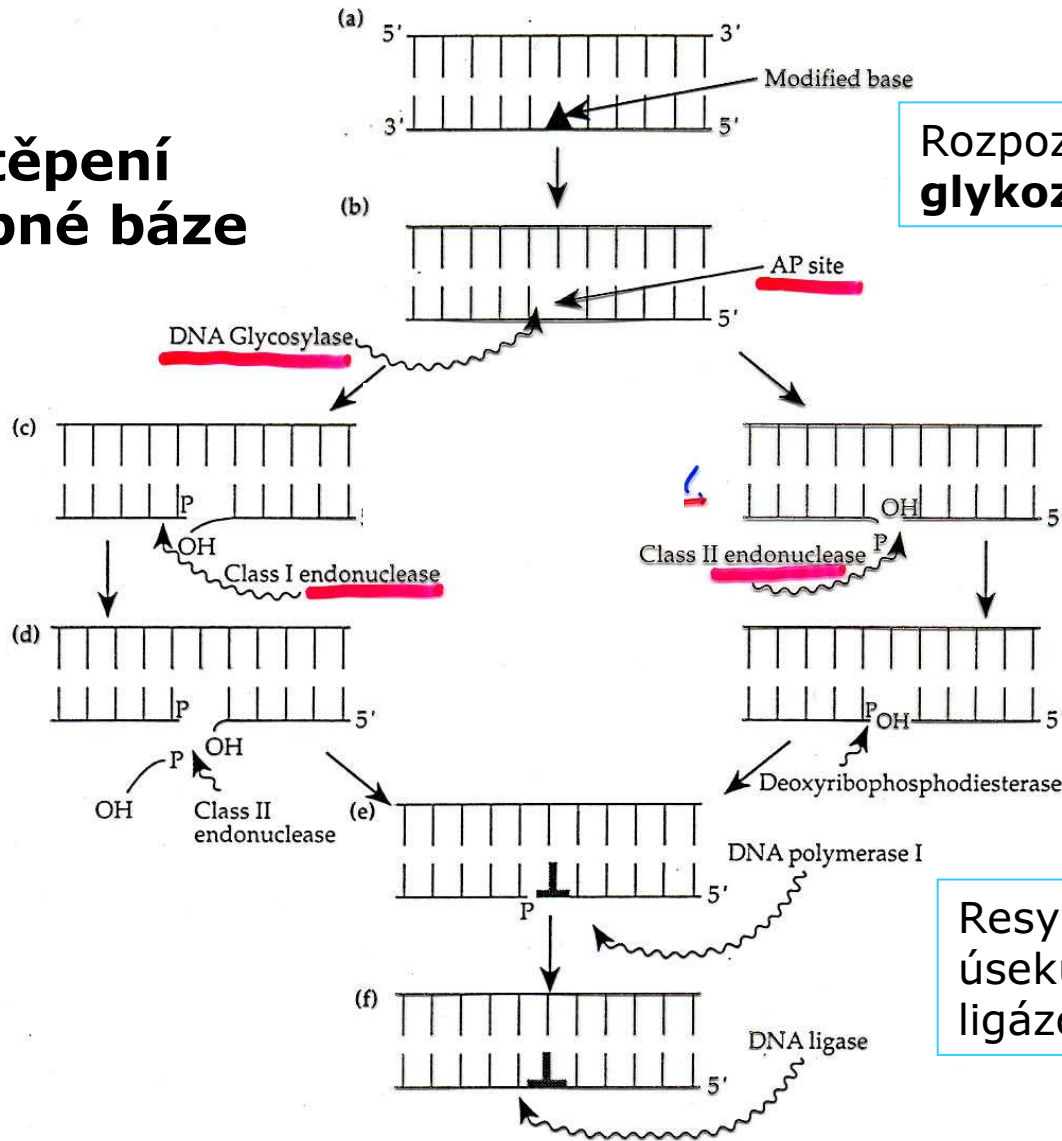
3. Vyštěpení abnormální báze

4. Odstranění cukrfosfátového zbytku

5. Zacelení mezery

BÁZOVÁ EXCIZNÍ REPARACE

Vyštěpení chybné báze



Rozpoznání chybné báze
glykozylázou, vznik AP-místa

Přerušení cukr-
fosfátových vazeb
AP-endonukleázami

Odstranění dR
s chybějící bází

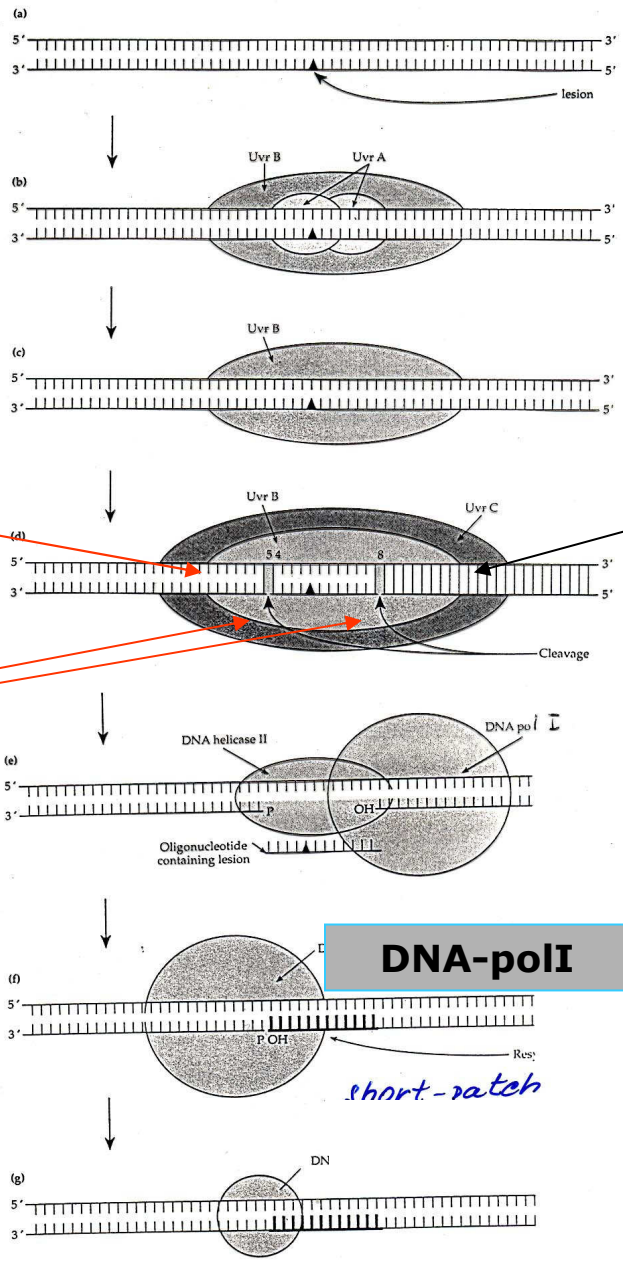
Resyntéza chybějícího
úseku, spojení mezery DNA-
ligázou

DNA-GLYKOZYLÁZY PŮSOBÍCÍ NA POŠKOZENÉ DNA

Enzyme	Substrate	Products
Ura-DNA glycosylase	DNA containing uracil	Uracil + AP sites
Hmu-DNA glycosylase	DNA containing hydroxymethyluracil	Hydroxymethyluracil + AP sites
5-mC-DNA glycosylase	DNA containing 5-methylcytosine	5-methylcytosine + AP sites
Hx-DNA glycosylase	DNA containing hypoxanthine	Hypoxanthine + AP sites
Thymine mismatch-DNA glycosylase	DNA containing G-T mispairs	Thymine + AP sites
MutY-DNA glycosylase	DNA containing G-A mispairs	Adenine + AP sites
3-mA-DNA glycosylase I	DNA containing 3-methyladenine	3-Methyladenine + AP sites
3-mA-DNA glycosylase II	DNA containing 3-methyladenine, 7-methylguanine, or 3-methylguanine	3-Methyladenine, 7-methylguanine, or 3-methylguanine + AP sites
FaPy-DNA glycosylase	DNA containing formamidopyrimidine moieties, or 8-hydroxyguanine	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamido-pyrimidine and 8-hydroxyguanine + AP sites
5,6-HT-DNA glycosylase (endonuclease III)	DNA containing 5,6 hydrated thymine-moieties	5,6-Dihydroxydi-hydrothymine or 5,6 dihydrothymine + AP sites
PD-DNA glycosylase	DNA containing pyrimidine dimers	Pyrimidine dimers in DNA with hydrolyzed 5' glycosyl bonds + AP sites

SOURCE: E. C. Friedberg, G. C. Walker, and W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, D.C.

NUKLEOTIDOVÁ EXCIZNÍ REPARACE (SHORT PATCH REPAIR)



DNA obsahující poškození (T-T, chybný pár bazí aj)

Vazba UvrA2B1 } **SOS**
 disociace UvrA

vytvoření **preincizního komplexu**

vazba UvrC

vytvoření **incizního komplexu** štěpení cukr-fosfátové kostry

vyštěpení krátkého oligonukleotidu o délce 11-13 b

resyntéza chybějícího úseku DNA - jako templát slouží řetězec bez poškození

spojení mezery DNA-ligázou

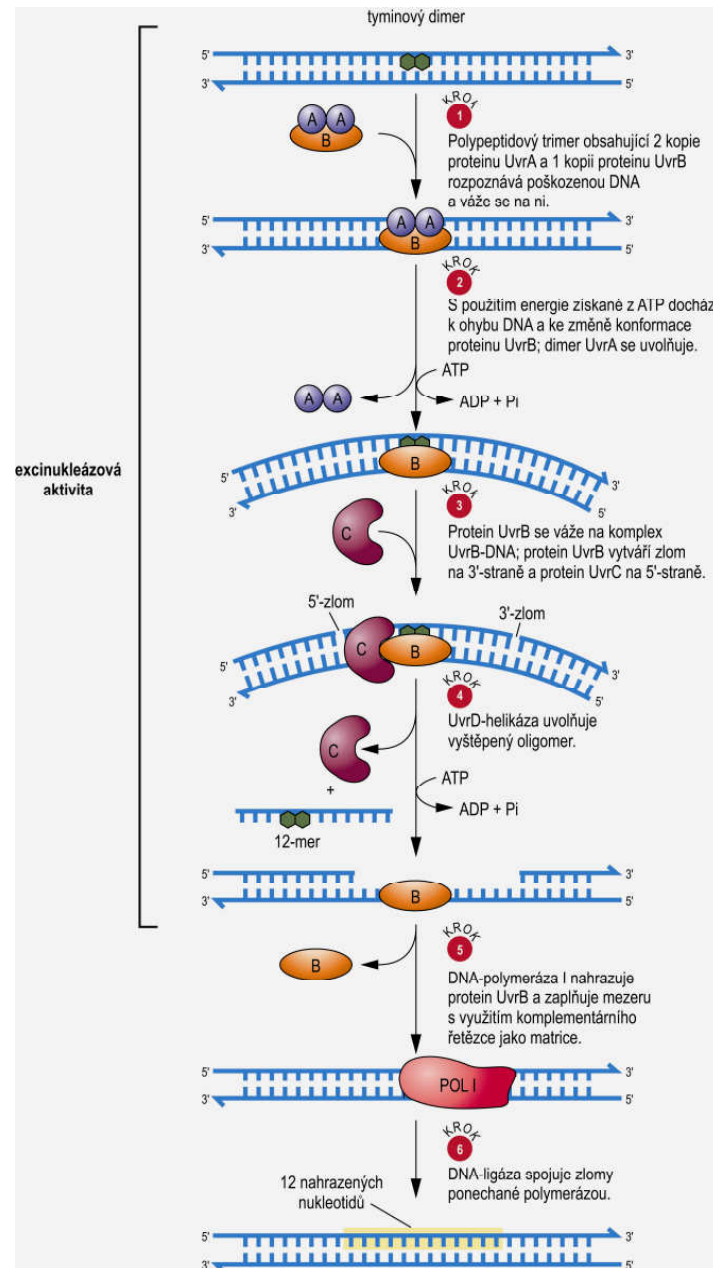
UvrABC excinukleáza

4-5b -x-- 8b

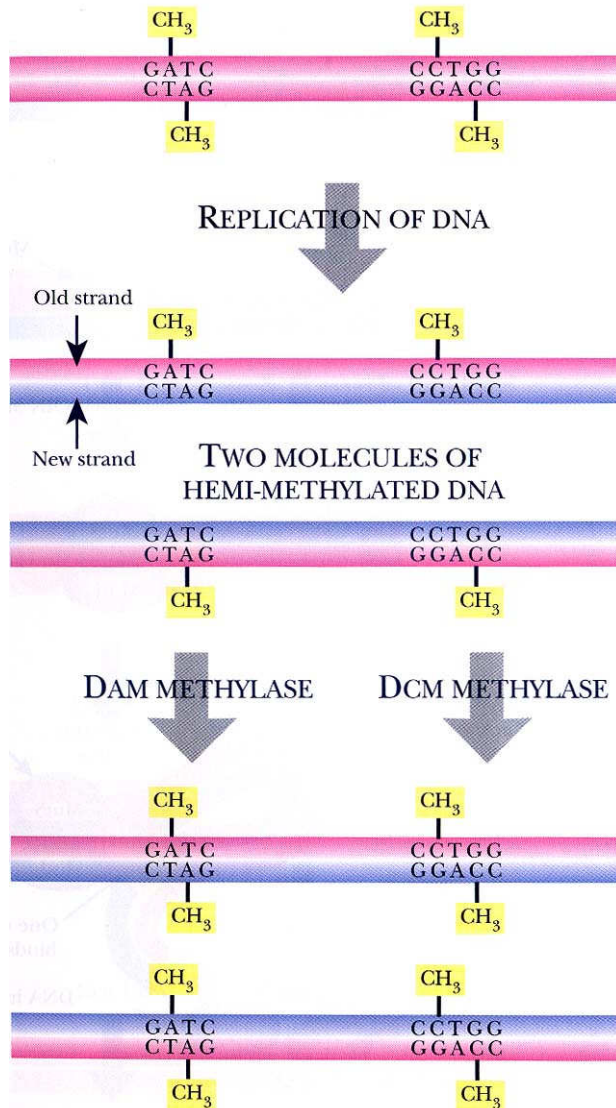
DNA-pol I

short-patch

Nukleotidová excizní oprava



Metylace DNA místně-specifickými metylázami

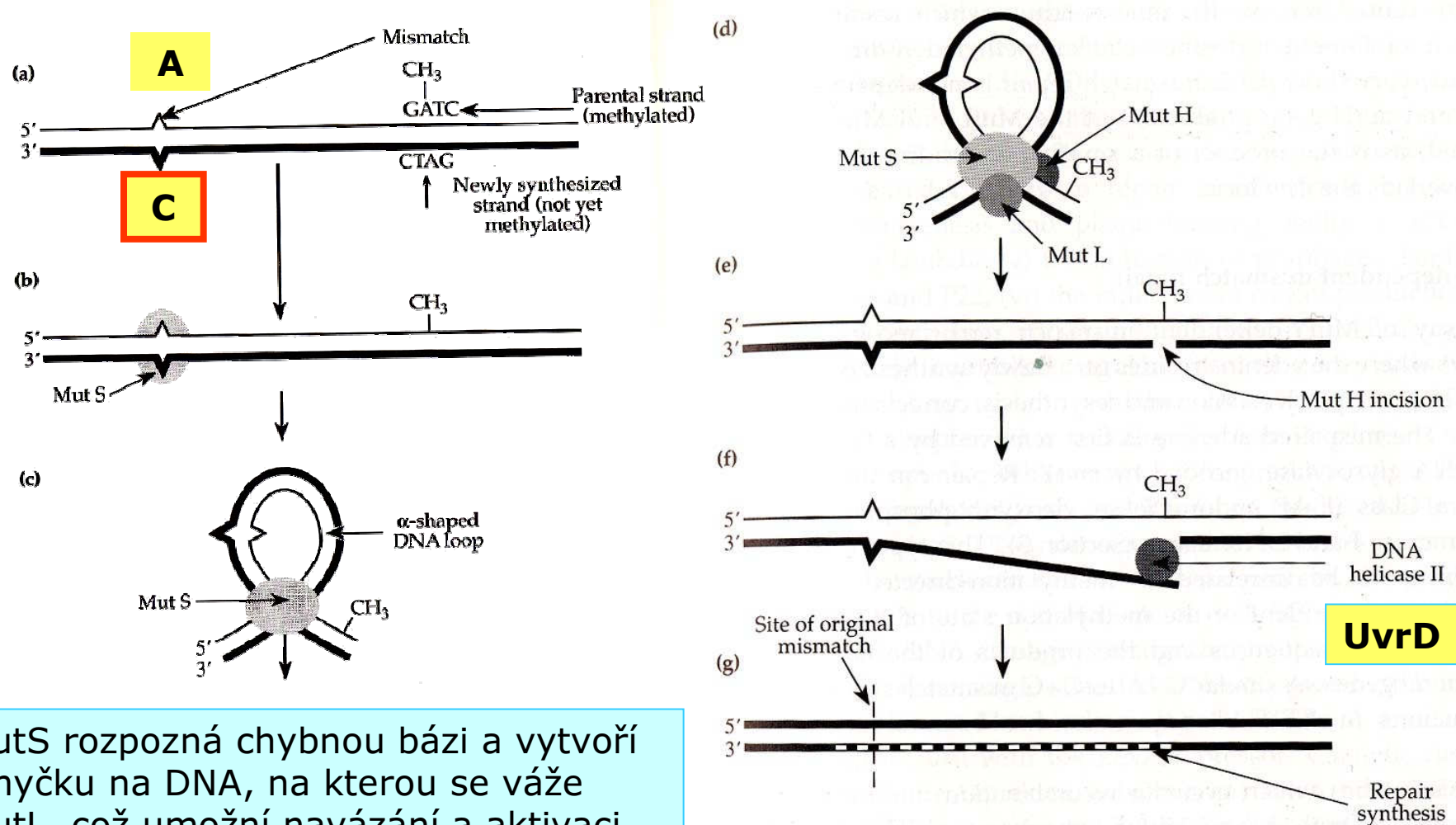


Rodičovská molekula

Dceřiné molekuly DNA
krátce po replikaci

Plně metylované dceřiné
molekuly DNA

REPARACE ŘÍZENÁ METYLACÍ (REPARACE NA DLOUHOU VZDÁLENOST, mismatch repair)



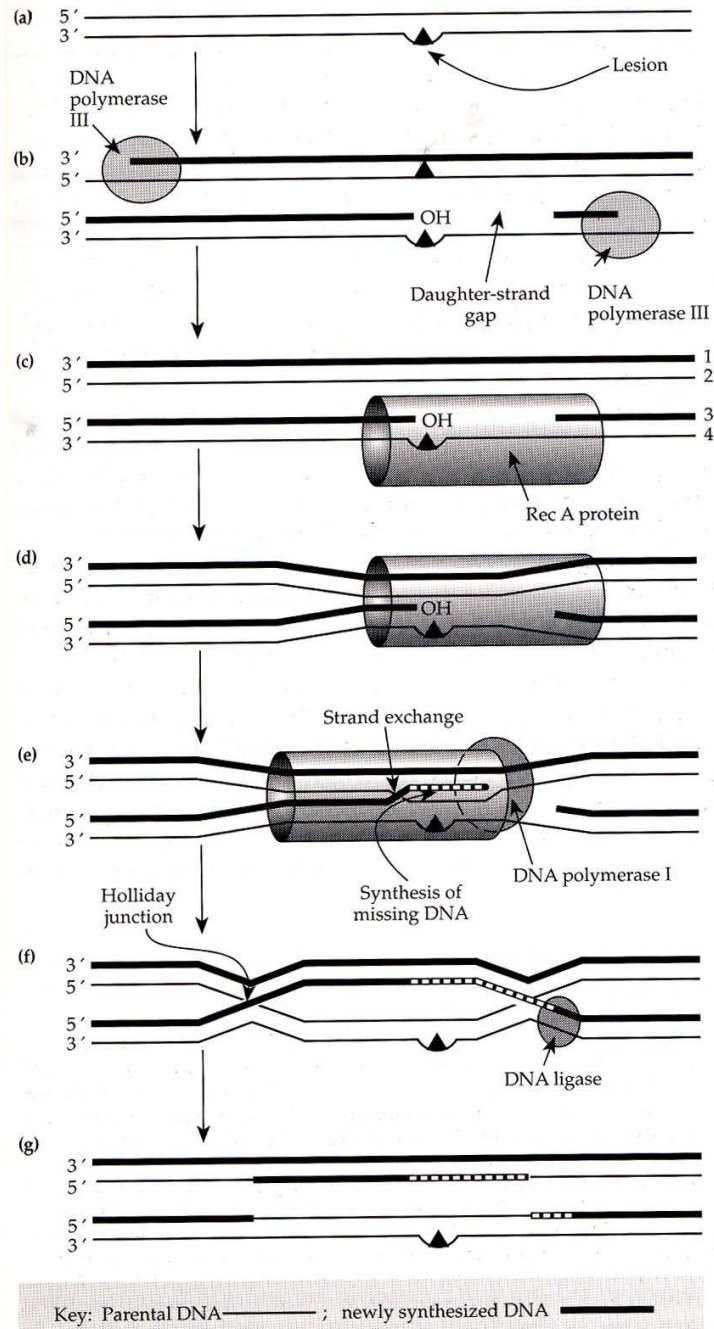
UvrD

MutS rozpozná chybnou bázi a vytvoří smyčku na DNA, na kterou se váže MutL, což umožní navázání a aktivaci MutH, která štěpí G v GATC - poté DNA-helikáza odmotá jednořetězec a ten je nahrazen reparační syntézou

A-C → A-T

DNA polymeráza

POSTREPLIKAČNÍ REKOMBINAČNÍ REPARACE



Vznik mezery při syntéze DNA

vazba proteinu RecA

navození homologního párování
neporušeného a porušeného řetězce

reparační syntéza DNA podle sesterského
řetězce

rekombinace homologních řetězců

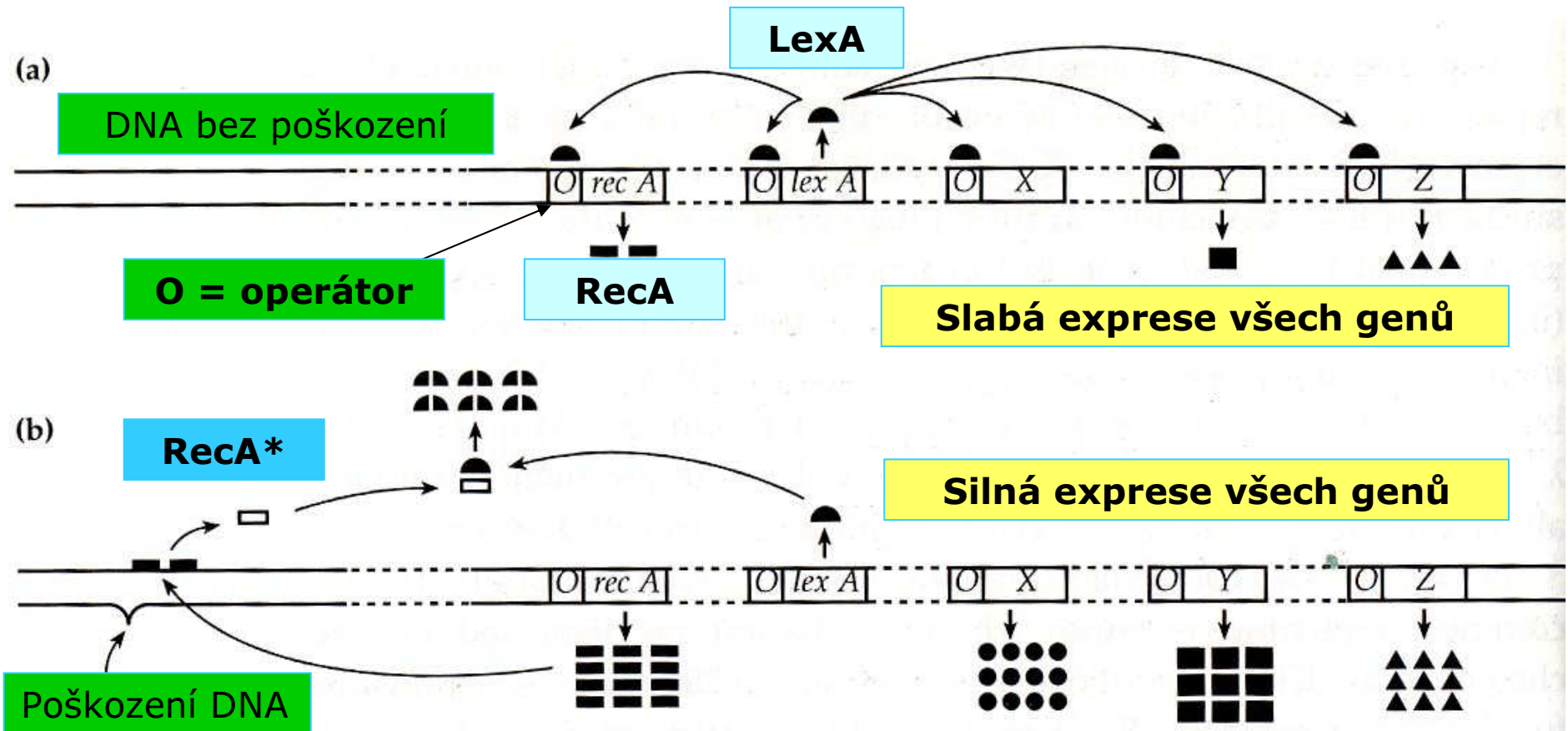
poškození zůstává v jedné z molekul a je
opraveno později

SOS-ODPOVĚĎ

geny din = damage induced, SOS-genes (31 genů u E. coli)

- **1. Indukce SOS mutagenese – vznik adaptivních mutací (mutagenese adaptivní fáze)**
- **2. Excizní reparace dlouhých úseků**
- **3. Zvýšená schopnost reparace ds zlomů**
- **4. Indukce profágů (lambda, P22, f80)**
- **5. Indukce tvorby kolicinů**
- **6. Zmírnění restrikce**
- **7. Inhibice buněčného dělení**

PRŮBĚH SOS-REPARACE

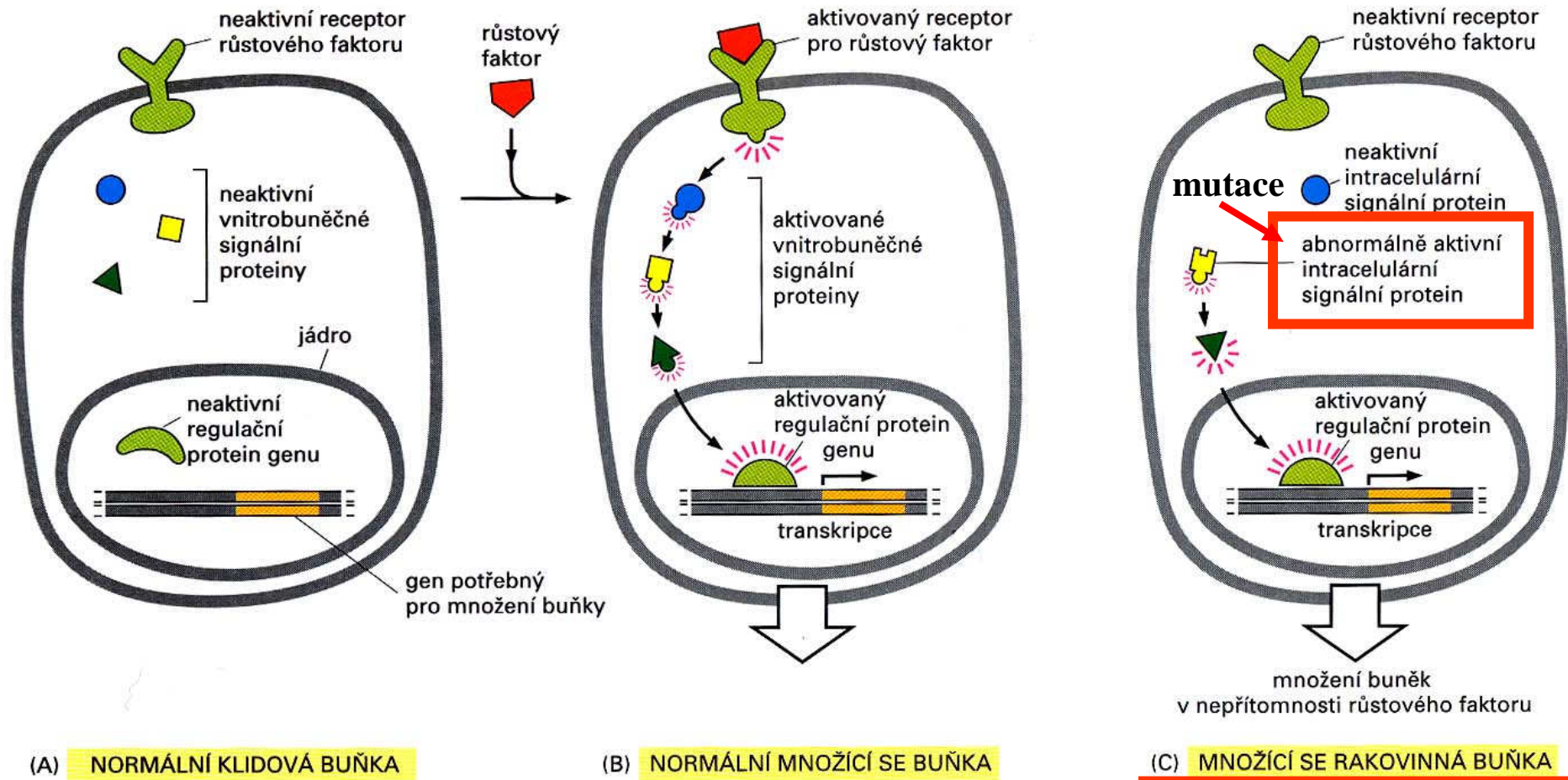


Key: Proteins

●	Lex A;	■	Rec A;	●	X;	■	Y;	▲	Z;
■	inactive	} Rec A protease;	●	inactive	} Lex A repressor.				
□	activated		▲	activated					

LexA = dimer, podrobující se autokatalytickému štěpení za účasti RecA* (koproteáza) helikální filament RecA-DNA

Změny růstových vlastností buněk navozené mutacemi regulačních genů

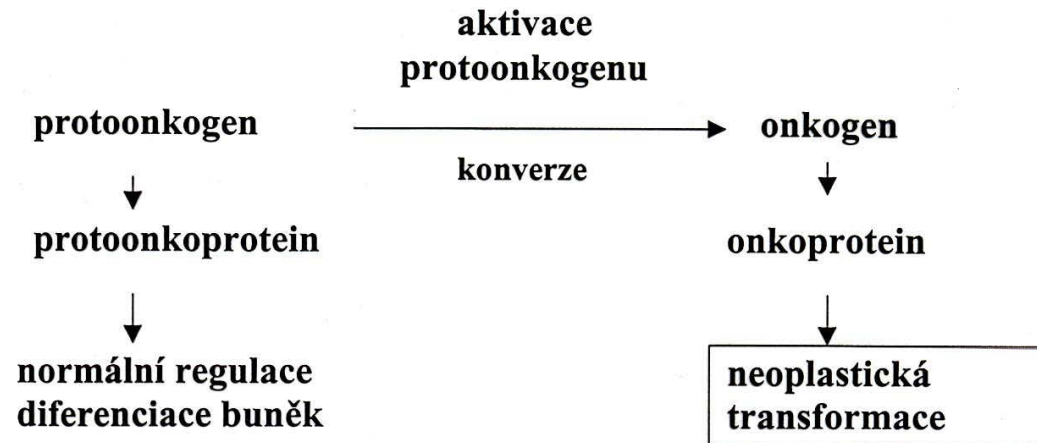


Mutace týkající se rakoviny

Dva typy mutací :

- * **dominantní mutace vedoucí ke vzniku onkogenů**
 - **mutací je v buňce aktivován protein, kodovaný onkogenem (buňky se chovají, jako by byly stále pod vlivem signálu pro dělení buňky)**

- * **recesivní mutace v nádorových supresorových genech (antionkogenech)**
 - **mutacemi se inaktivují proteiny, které normálně brzdí proliferaci (p53, Rb-protein)**
 - **jsou mutovány geny reparující poškození DNA.**



Klasifikace protoonkogenů podle funkce jejich produktů

- *protoonkogeny kódující:*

1. Růstové faktory
2. Receptory růstových faktorů
3. Proteinkinázy
4. Produkty podobné G-proteinům
5. Transkripční faktory

Umístění protoonkoproteinů v buňkách

- cytoplazmatická membrána
- cytoplazma
- jádro
- sekrece mimo buňku

Způsoby aktivace protoonkogenů:

- mutacemi
- amplifikací
- translokací
- promotorem viru (c-onc x v-onc)

Obecné rysy **onkoproteinů**

- vytváří se v buňce, kde se normálně netvoří
- vytváří se v nadměrném množství
- vytváří se ve formě, která není regulovatelná

Porucha regulace
buněčného cyklu

Some Oncogene Proteins Classified by Cellular Location and Function

Location	Protein	Function
Secreted	<i>sis</i>	growth factor derived from PDGF
Transmembrane	<i>erbB</i>	EGF receptor, tyrosine protein kinase
	<i>erbB-2</i>	tyrosine protein kinase
	<i>fms</i>	CSF-1 receptor, tyrosine protein kinase
	<i>ros</i>	tyrosine protein kinase
Plasma membrane	<i>src</i>	tyrosine protein kinase
	<i>abl</i>	tyrosine protein kinase
	<i>ras</i>	guanine-nucleotide-binding
Cytoplasm	<i>fes</i>	tyrosine protein kinase
	<i>mos</i>	serine/threonine protein kinase
	<i>erbA</i>	thyroid hormone receptor
Nucleus	<i>myc</i>	DNA-binding protein
	<i>fos</i>	DNA-binding protein
	<i>jun</i>	DNA-binding protein
	<i>Rb</i>	DNA-binding protein?

Nádorové supresorové geny

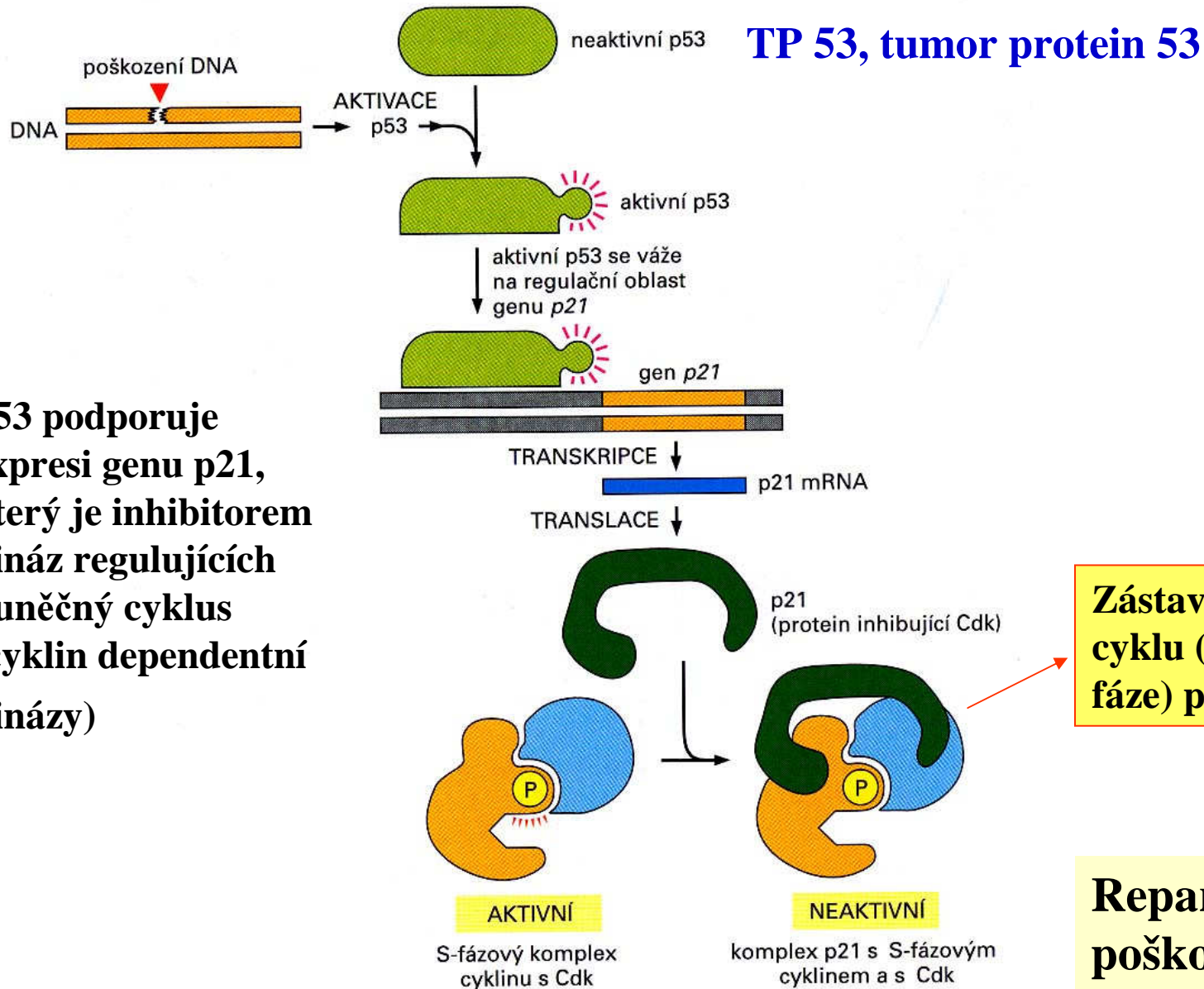
Nádorové supresorové geny (antionkogeny)

- kódují proteiny, které proliferaci buněk potlačují
- mutace v nich vznikají v zárodečných buňkách a dědí se
- mutace vedou k familiálním formám nádorů

Protein p53 - strážce genomu

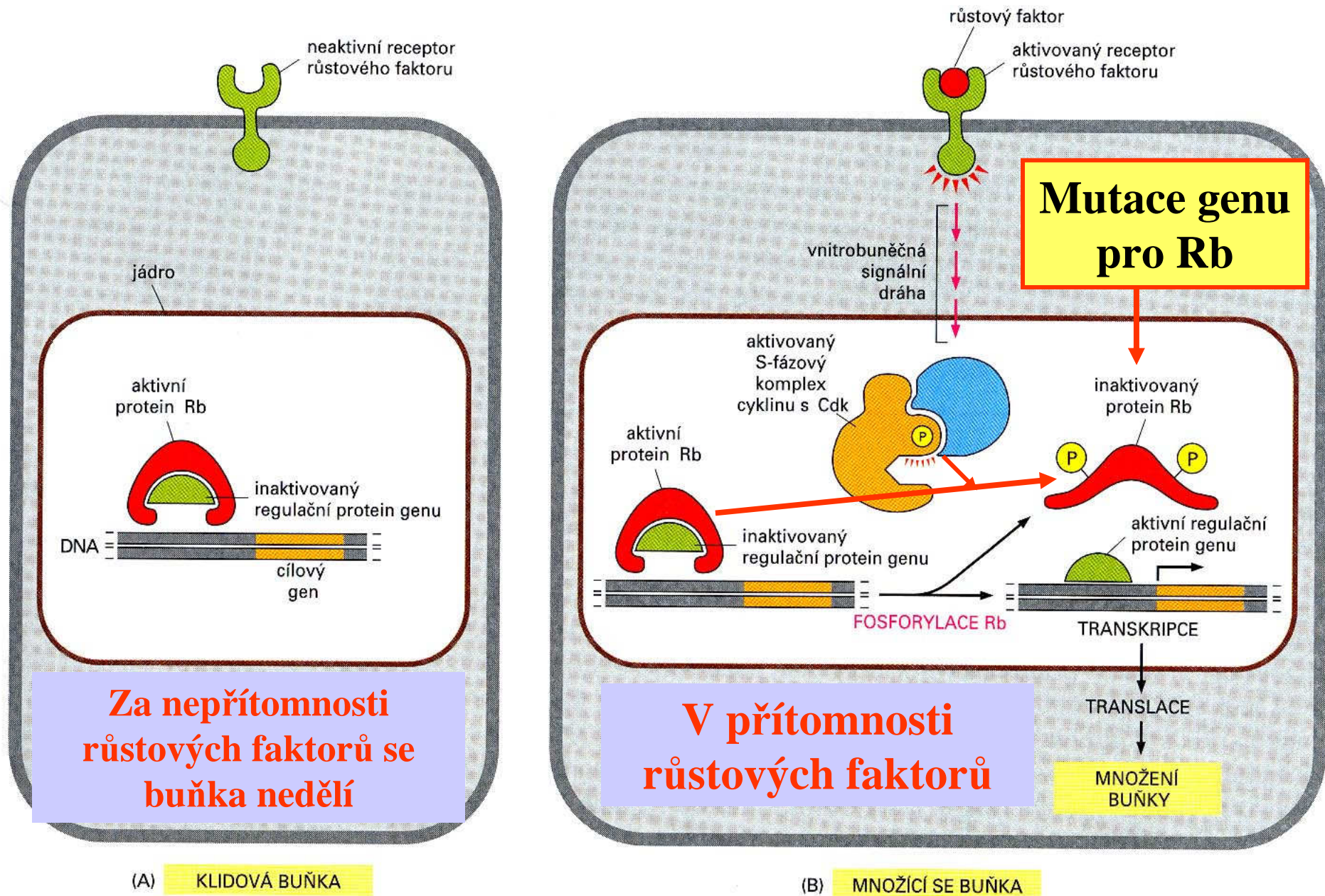
- koordinovaně zastavuje dělení buněk
- aktivuje se vazbou na poškozenou DNA
- stimuluje reparace DNA
- působí jako aktivní TF genů, jejichž produkt brzdí dělení buněk
- stimuluje apoptózu (programovaná buněčná smrt)

Funkce proteinu p53 při zástavě buněčného cyklu

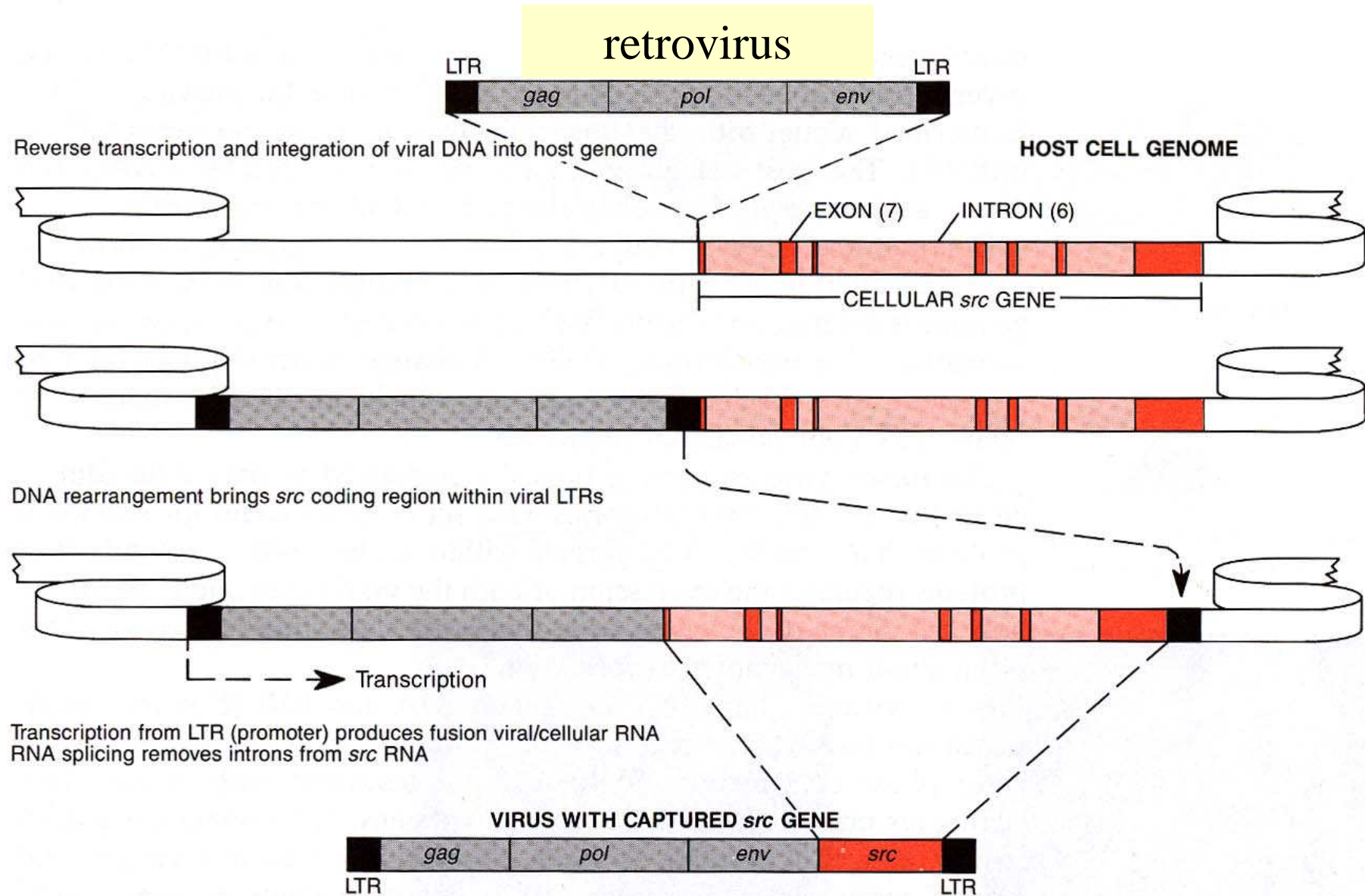


p53 podporuje expresi genu p21, který je inhibítoem kináz regulujících buněčný cyklus (cyklin dependentní kinázy)

Model stimulace proliferace buněk růstovými faktory a účast Rb-proteinu



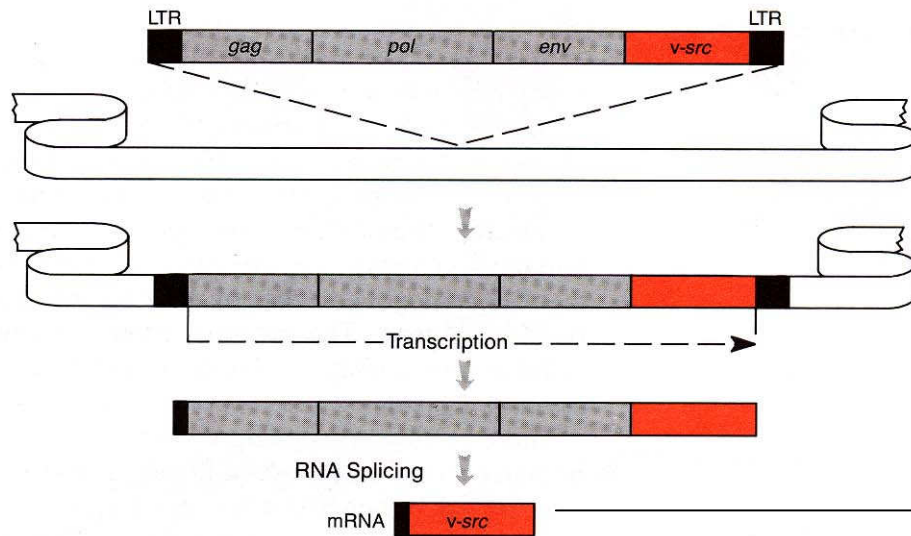
Vznik retrovirů přenášejících onkogeny



Capture of the Cellular *src* Oncogene by a Progenitor Rous Sarcoma Virus

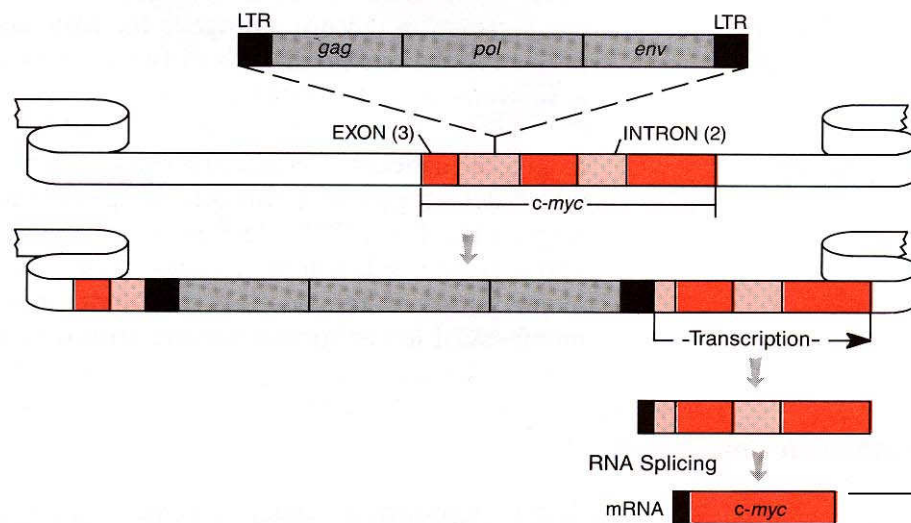
Akutně a pomalu transformující retroviry

ACUTE TRANSFORMATION: ROUS SARCOMA VIRUS (RSV)



Transdukce onkogenu akutně transformujícími retroviry

CHRONIC TRANSFORMATION: AVIAN LEUKOSIS VIRUS (ALV)



Inzerční aktivace protoonkogenu pomalu transformujícími retroviry

Acute vs. Chronic Transformation by Retroviruses

nádor

Rekombinace - proces vzniku nové kombinace genů

- **obecná (homologická, RecA-závislá) – vyžaduje dlouhé úseky DNA s vysokým stupněm sekvenční homologie**
- **místně-specifická, nehomologická, (ilegitimní) – probíhá mezi molekulami DNA, které obsahují jen krátké specifické sekvence rozpoznávané místně-specifickými rekombinázami, nikoliv RecA-proteinem**

jednoduchý crossing-over

	Meiotic chromosomes	Meiotic products	<i>GAMETY</i>
Meioses with no crossover between the genes			Parental
			Parental
			Parental
			Parental
Meioses with a crossover between the genes			Parental
			Recombinant
			Recombinant
			Parental

nesesterské chromatidy

dvojnásobný crossing-over

Possible gene orders	Double recombinant chromatids

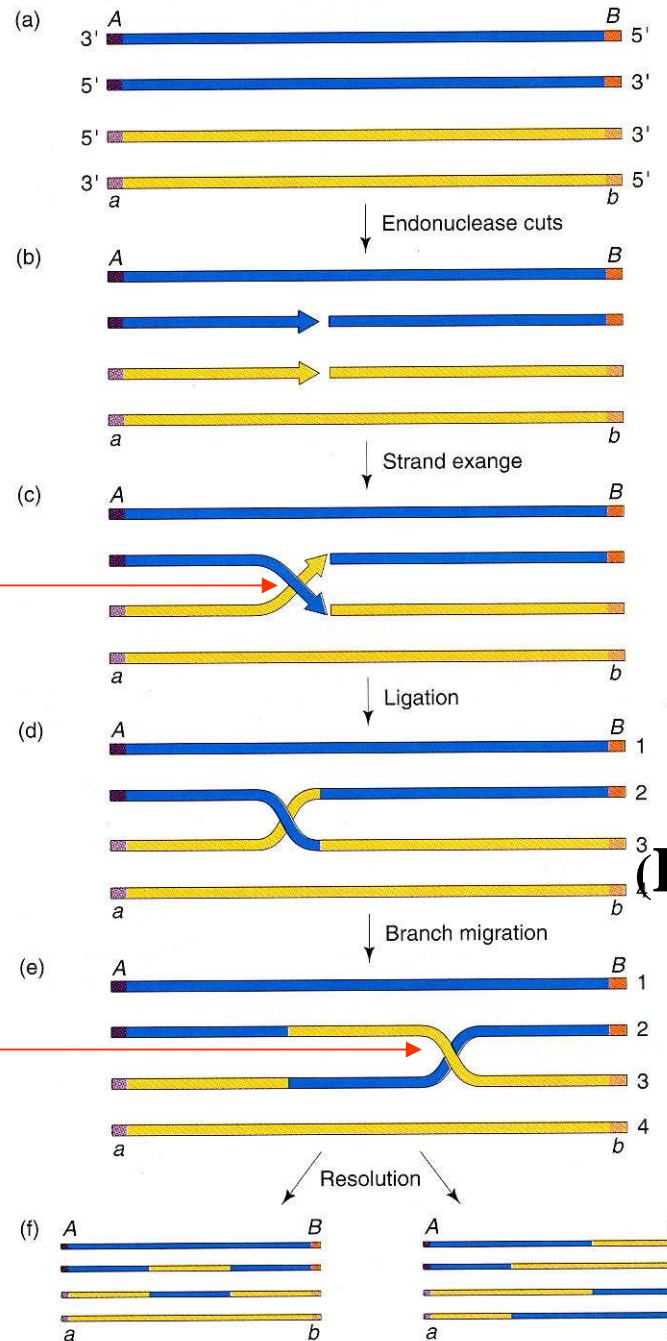
Průběh homologní rekombinace

Vznik náhodných zlomů

Bod překřížení

Spojení řetězců

Posun bodu překřížení

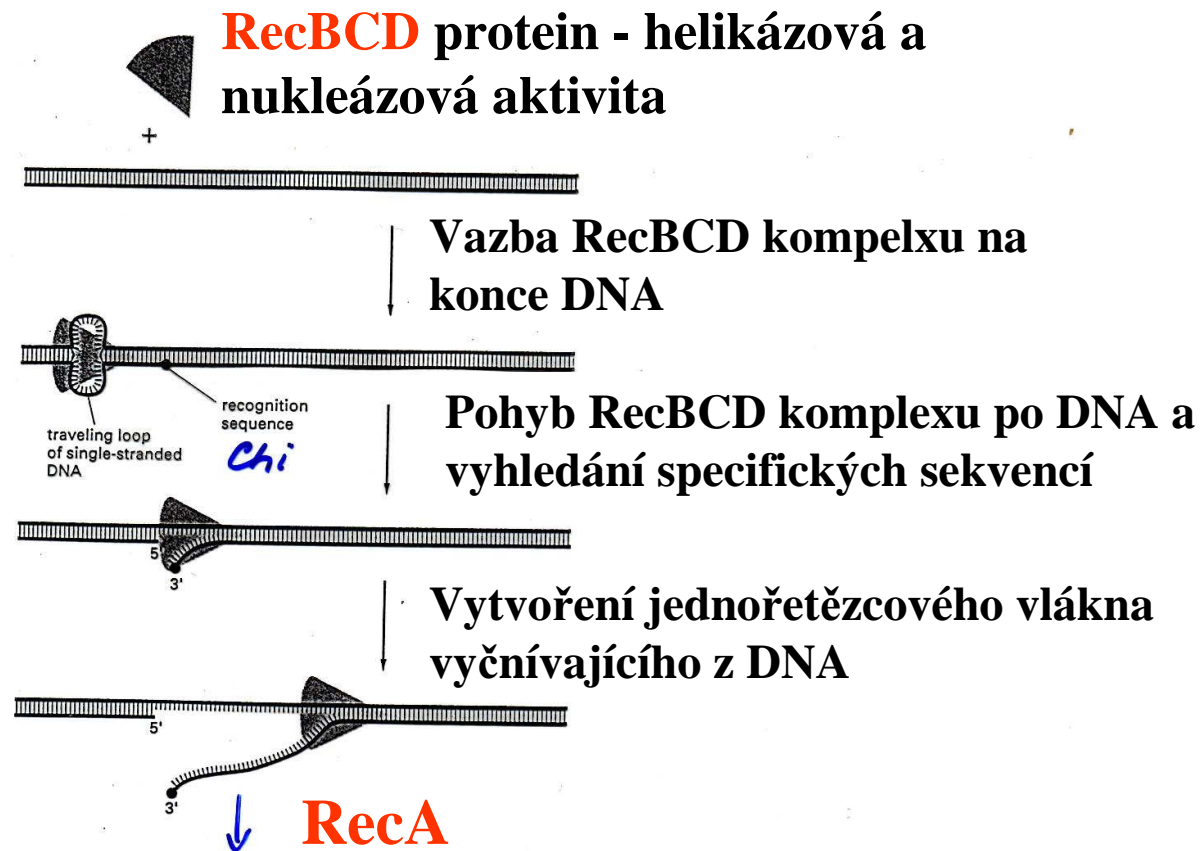


Homologické molekuly dsDNA (dsDNA x ssDNA)

Hollidayovo spojení (Hollidayova struktura)

Dva možné výsledky

Počáteční fáze procesu homologní rekombinace

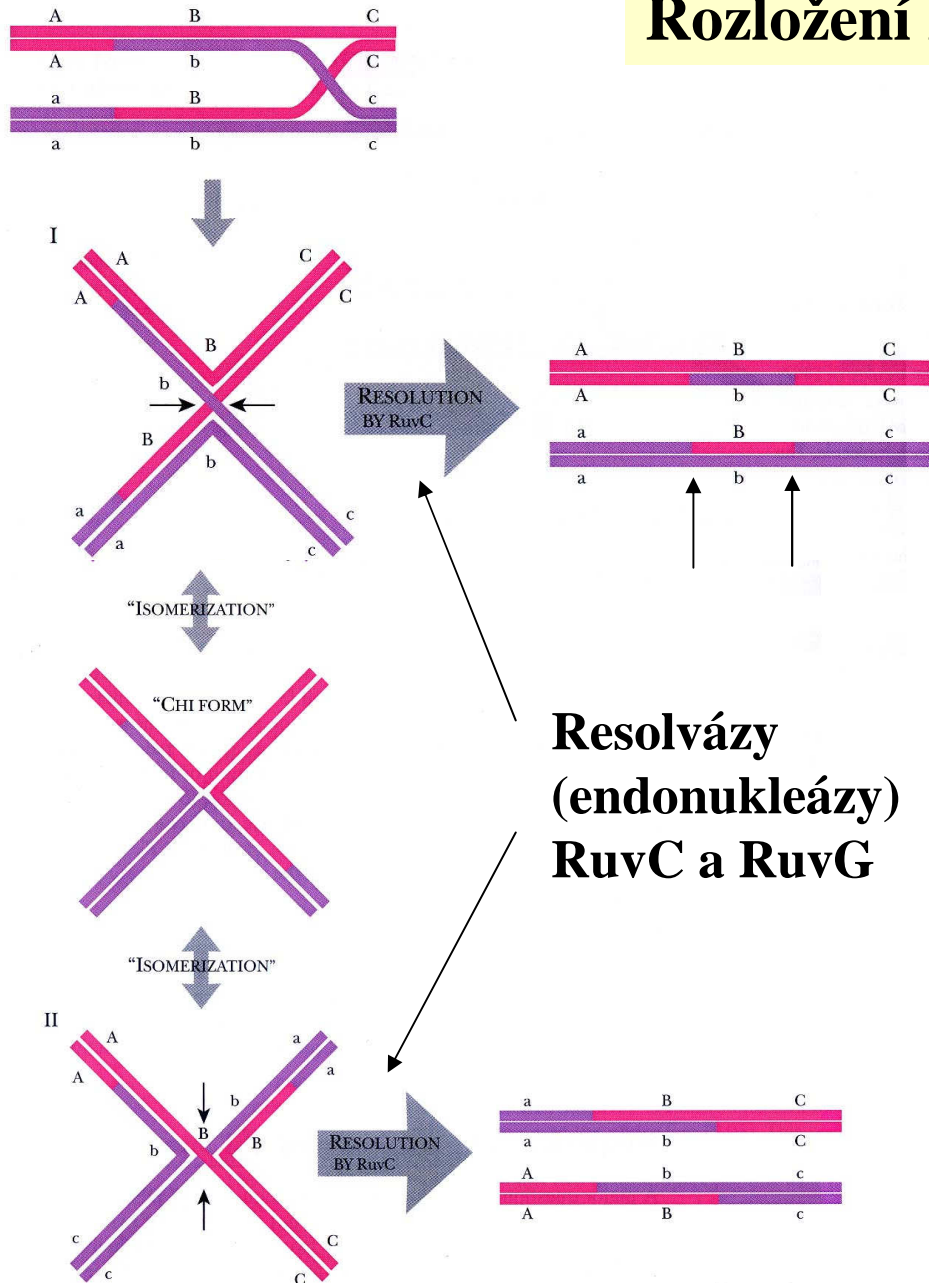


Párování jednořetězce s homologickou sekvencí DNA

chi = cross-over hot-spot instigator

E. coli 5'GCTGGTGG 3'

Rozložení Hollidayova spojení



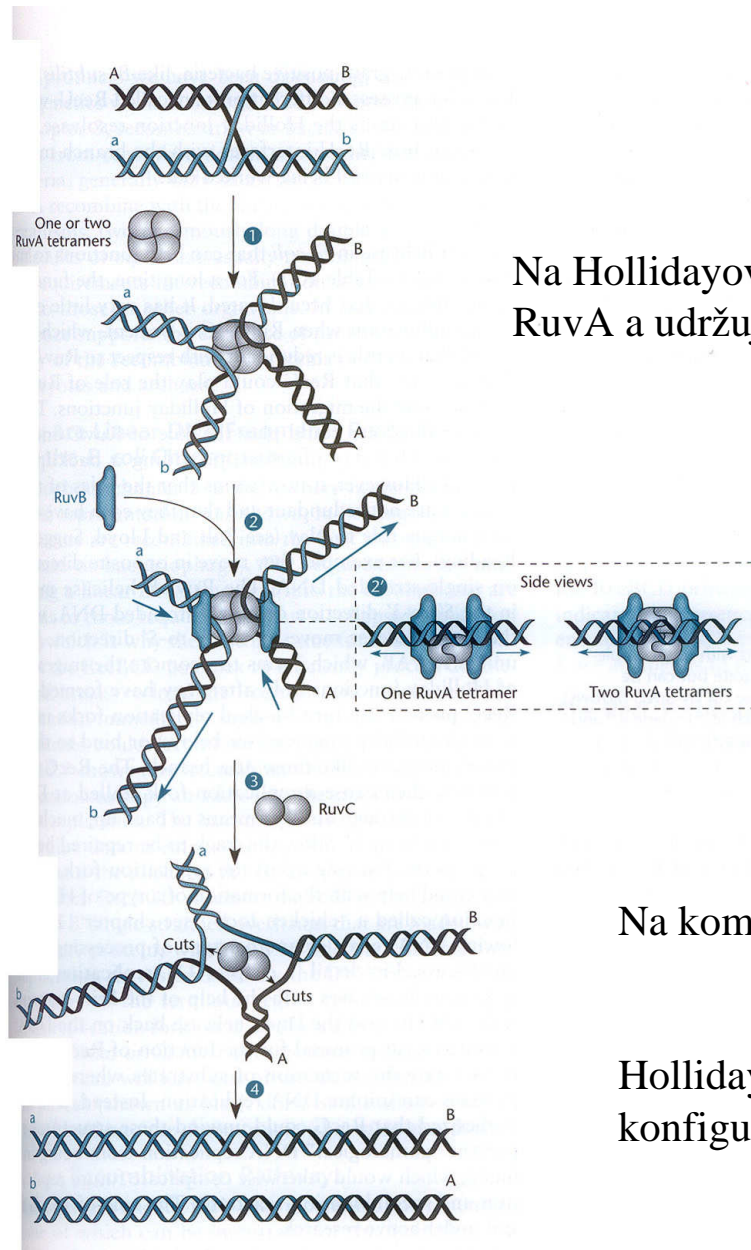
I. regenerace původních molekul DNA obsahujících krátkou heteroduplexní oblast

Konformace I a II se neliší

Resolvázy (endonukleázy) RuvC a RuvG

II. vytvoření hybridních molekul DNA obsahujících krátkou heteroduplexní oblast a zaměněné krajní úseky

Model působení RuvABC proteinů při rekombinaci

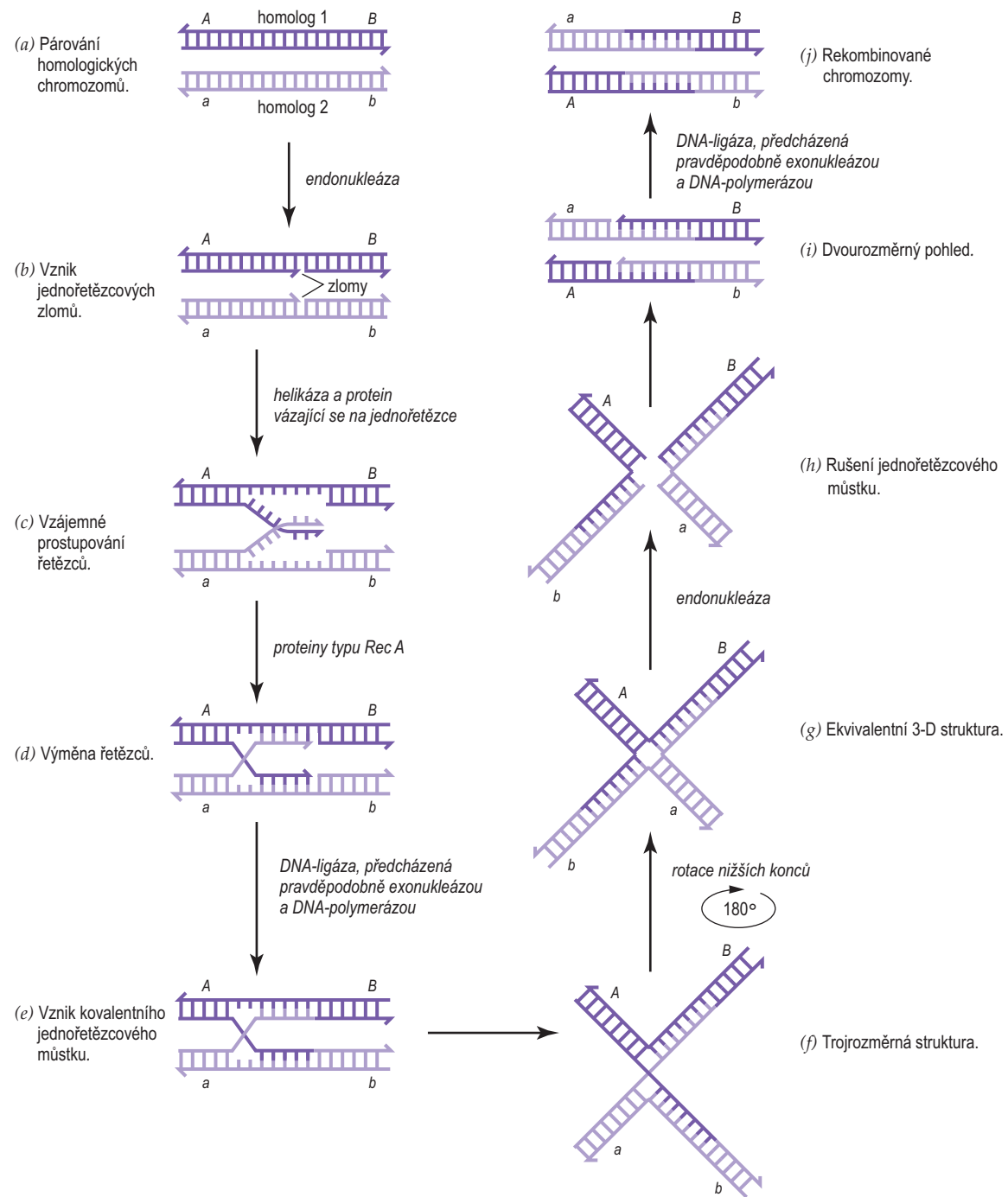


Na Hollidayovo spojení se váže jeden nebo dva tetramery RuvA a udržují ho v planární rovině

Na komplex s RuvA se vážou dva hexamery proteinu RuvB, z nichž každý tvoří kruh okolo řetězce DNA

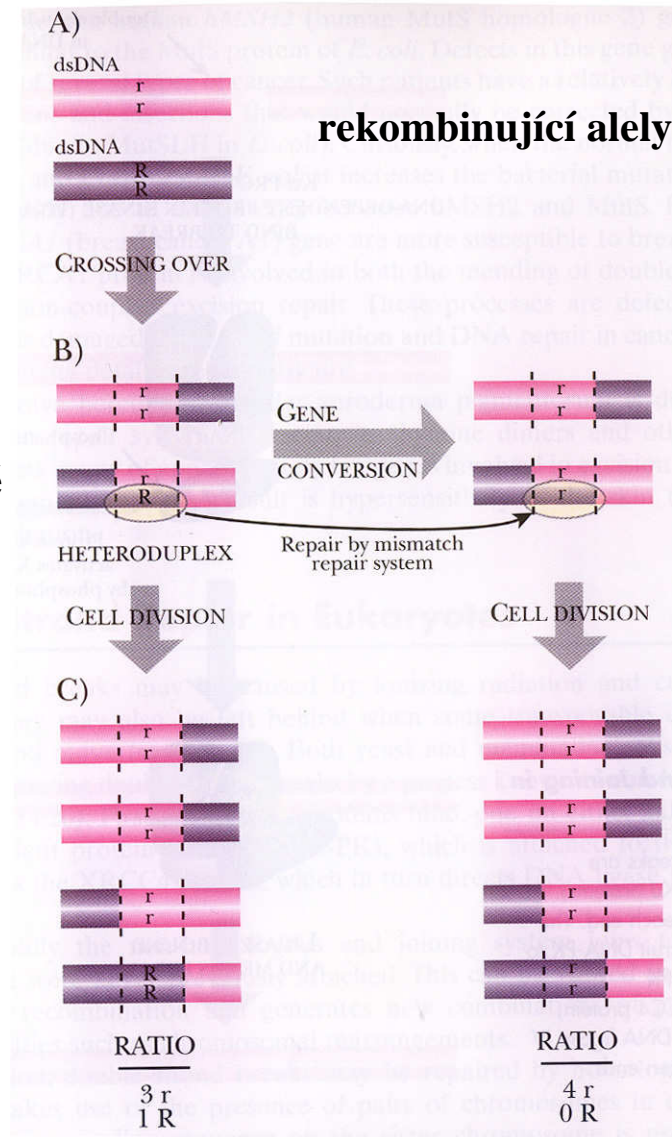
Na komplex se váže RuvC a štěpí dva z řetezců.

Hollidayovo spojení se rozloží na jednu z možných konfigurací podle toho, které řetězce budou štěpeny.



Genová konverze následující po crossing-overu

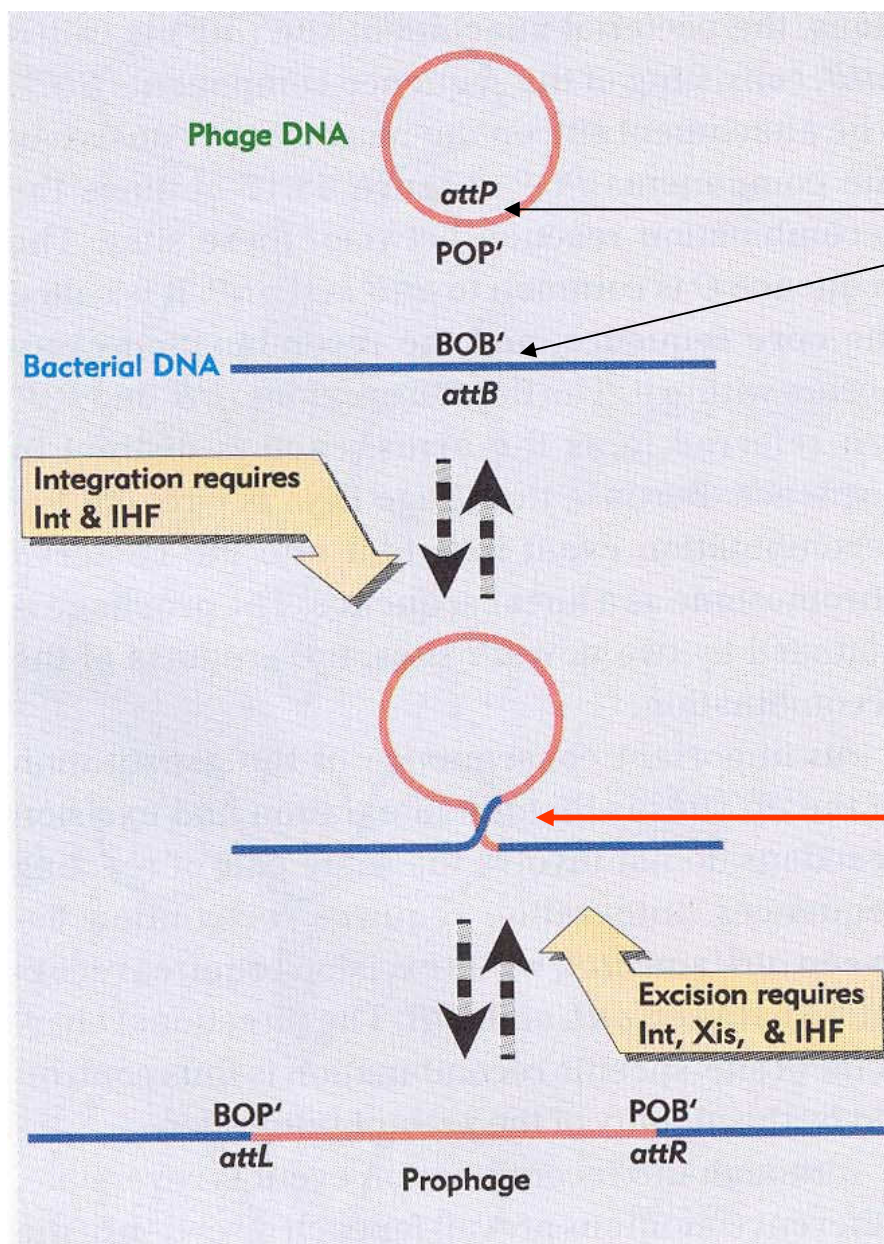
vytvoření krátké heteroduplexní oblasti v místě Hollidayova spojení



Reparace vede k záměně R za r

Opravná syntéza DNA po crossing-overu

Začlenění fágového genomu do chromozomu hostitelské buňky procesem místně-specifické rekombinace



Krátké homologické sekvence

Integráza, integrační faktor hostitele, excizionáza

Jednoduchý crossing-over

Začlenění DNA bakteriofága lambda do chromozomu *E. coli*

