

15. Schwab R., Palatnik J. F., Rieger M., Schommer C., Schmid M., Weigel, D. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome // *Dev. Cell.* - 2005. - Vol. 8. - P. 517-527.
16. Debernardi J.M., Rodriguez R.E., Mecchia M.A., Palatnik J.F. Functional specialization of the plant miR396 regulatory network through distinct microRNA-target interactions // *PLoS Genet.* - 2012. - Vol. 8. - e1002419. - doi: 10.1371/journal.pgen.1002419.
17. Hauser F., Chen W., Deinlein U., Chang K., Ossowski S., Fitz J., Hannon G.J., Schroeder J.I. A genomic-scale artificial microRNA library as a tool to investigate the functionally redundant gene space in Arabidopsis // *Plant Cell.* - 2013. - Vol. 25. - P. 2848-2863.
18. Yang F., Liang G., Liu D. Yu D. Arabidopsis miR396 mediates the development of leaves and flowers in transgenic tobacco // *J. Plant Biol.* - 2009. - Vol. 52. - P. 475-481.
19. Jones-Rhoades M.W. and Bartel D.P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA // *Mol. Cell.* - 2004. - Vol.14. - P. 787-799.
20. Bari A.A., Orazova S.B., Ivashchenko A.T. miR156- and miR171-Binding Sites in the Protein-Coding Sequence of Some Plant Genes // *BioMed Res. Int.* - 2013. - Vol. 2013. - P. 1-7.

УДК 602.6

Б.Б. Смайлов, А.А. Мурсалимов, А.К. Бисенбаев*

НИИ проблем биологии и биотехнологии

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

*e-mail: amangeldy.bissenbaev@kaznu.kz

Выделение и характеристика кДНК гена киназы рибосомального белка S6 *Triticum aestivum*

Выделена кДНК гена, кодирующего гомолог киназы рибосомального белка S6 (S6K) *Triticum aestivum* (TaS6K). Анализ доменной структуры TaS6K выявил в киназном домене петлю активации, гидрофобный мотив (НМ) и мотив-изгиб (ТМ) характерные для всех S6 киназ. Выявлено, что Ser в положении 466 на С-концевом НМ-мотиве (S466) является предполагаемым сайтом фосфорилирования TOR киназы *Triticum aestivum*. Показано, что в алейроновом слое зерна пшеницы происходит ингибирование фосфорилирования S466 TaS6K в присутствии pp242, специфического ингибитора TOR киназы. Выявлен более высокий уровень активации TaS6K в клетках алейрона в присутствии гиббереллина по сравнению с абсцизовой кислотой. Это может служить показателем участия TOR сигнальной системы в гиббереллин-зависимых процессах в ходе прорастания зерна пшеницы.

Ключевые слова: TOR киназа, киназа рибосомального белка S6, pp242, *Triticum aestivum*.

Б.Б. Смайлов, А.А. Мурсалимов, А.К. Бисенбаев*

***Triticum aestivum* S6 рибосомалық белогінің киназасын кодтайтын кДНК генді бөліп алу және сипаттау**

Жұмыс барысында жұмсақ бидайдың (TaS6K) S6K гомологын кодтайтын геннің кДНК-сы бөлініп алынды. TaS6K домендік структурасының анализі киназалық доменде активтелу ілмегі және барлық S6 киназаларға тән гидрофобты мотив (НМ) және буктеме-мотив (ТМ) бар екені көрсетілді. С- соңды НМ-мотивтің 466 орнында тұратын Ser амин қышқылы TOR киназа ферментімен фосфорлануы мүмкін. Зерттеу жұмысы нәтижесінде mTOR спецификалық ингибиторы pp242 бар болған жағдайда бидай дәнінің алейрон қабатында эндогенді TaS6K-нің S466 сайты бойынша фосфорлануының тежелетіндігі анықталды. Бұл TaS6K-ның TOR киназамен активтенуін және *Triticum aestivum*-ның TOR сигналды жолына қатысатыны туралы болжамды дәлелдейді. Сонымен қатар, алейрон клеткасында TaS6K активациясы абсциз қышқылымен салыстырғанда гибберилин бар ортада жоғары деңгейде жүретіні көрсетілді. Бұл бидай дәнінің өсіп-өнуі барысындағы гибберилин-тәуелді процесстерге TOR сигналдық жүйенің қатысуының көрсеткіші бола алады.

Түйін сөздер: TOR киназа, S6 рибосомалық белок киназасы, pp242, *Triticum aestivum*.

B.B. Smailov, A.A. Mursalimov, A.K. Bissenbaev

Isolation and characterization of ribosomal protein S6 kinase gene's cDNA in *Triticum aestivum*

In present work cDNA of *Triticum aestivum* gene encoding homologue of ribosomal protein S6 kinase (S6K) was isolated. Analysis of TaS6K protein revealed conservative elements in kinase domain characteristic of all S6 kinases: activation loop, hydrophobic and turn motives. It was shown that Ser-466 in C-terminal HM-motif of TaS6K is a putative site of phosphorylation by T.aestivum TOR kinase. The phosphorylation of Ser-466 TaS6K is inhibited in presence of TOR-specific inhibitor pp242 in aleuronic layer of wheat grain. Also a higher level of activated TaS6K in aleuronic cells treated with gibberellin compared to abscisic acid was observed as an indication of possible participation of TOR signaling pathway in gibberellin-activated processes during germination of wheat grain.

Key words: TOR kinase, ribosomal protein S6 kinase, pp242, *Triticum aestivum*.

TOR (target of rapamycin) - это серин/треониновая протеинкиназа, обнаруженная у всех эукариот, начиная от дрожжей и заканчивая человеком. Основной функцией этой киназы является трансдукция сигналов, поступающих от ростовых факторов и питательных веществ, к эффекторам клеточного роста и пролиферации. TOR млекопитающих (mTOR) входит в состав двух комплексов (TORC1 и TORC2), каждый из которых обладает своим набором субстратов и модулирует разные процессы. Всего несколько непосредственных субстратов mTORC1 было обнаружено. Наиболее изученные из них - 4EBP1 и p70S6K [1]. Уровень фосфорилированности этих двух белков является индикатором активности mTORC1 в клетках. p70S6K1 фосфорилируется mTORC1 по T389 в гидрофобном мотиве, связывающем каталитический домен с С-концевым автоингибиторным доменом.

p70S6K относится к семейству AGC серин/треониновых протеинкиназ (protein kinase A/protein kinase G/protein kinase C) и является ключевым медиатором факторов роста и сигнальной трансдукции инсулина [2]. Он участвует в регуляции многих клеточных процессов, включая рост, деление, дифференциацию и метаболизм. p70S6K катализирует фосфорилирование и последующую активацию рибосомального белка S6, таким образом, участвуя в регуляции процесса трансляции. Помимо S6, этот фермент фосфорилирует ряд других белков, среди которых TOR, IRS-1, GSK3, eEF2 и проапоптотический белок Bad [3, 4].

Геном арабидопсиса также содержит два гена S6 киназы (*AtS6k1* и *AtS6k2*, каталожные номера генов - At3g08720 и At3g08730 соответственно), непосредственного субстрата TOR [5]. Несмотря на то, что N- и С-концевые последовательности этих белков отличаются от S6K животных, у киназного домена сохраняется высокая консервативность.

У арабидопсиса гомолог p70S6K – белок AtKP1/AtKP6 (*AtS6K1*) функционирует под действием AtTOR в качестве киназы фосфорилирующей рибосомальный протеин S6 (*AtRPS6*). Также было показано его активация киназой AtPDK1 аналогично гомологичному белку млекопитающих [6]. В недавних исследованиях было показано, что фосфорилирование сайта T449 *AtS6K1* ингибируется рапамицином в дозозависимой манере [7]. Таким образом, все данные указывают на сохранение основных элементов и механизмов функционирования TOR-сигнальной системы у растений.

Пшеница является основным возобновляемым ресурсом для производства продовольствия, кормов, промышленного сырья, а также наиболее важной сельскохозяйственной культурой сельского хозяйства Мира и Республики Казахстан. Это одна из последних основных сельскохозяйственных культур, для которых секвенирование генома и выявление важных генов до сих пор продолжается. Предполагается, что, выявление новых генов и цепочки их генетической регуляции позволит существенно повысить продуктивность пшеницы за счет использования биотехнологических подходов.

В настоящей работе впервые была выделена и охарактеризована кДНК гена киназы рибосомального белка S6 пшеницы (*TaS6K*).

Материалы и методы

Выделение РНК и получение кДНК. Ген *TaS6K*, кодирующий предполагаемую киназу рибосомального белка S6 пшеницы, был выявлен посредством скрининга EST с геном *ZmS6K* кукурузы. На основе выявленных последовательностей были сконструированы олигонуклеотиды для получения кДНК: прямой праймер - 5' ATG GTT TCCTCTGAGATACCT TC 3'(P1), обратный праймер - 5' TTA GCC TAG AGG ACT CGG CTT 3'(P2). Тотальная РНК была выделена из 100 мг листьев 6-7 дневных проростков пшеницы мягкой сорта Надежда при помощи тризол метода [8]. 2 мкг РНК было использовано в реакции обратной транскрипции. Реакция обратной транскрипции проведена при следующих условиях: 200 ед. RevertAid M-MuLV ревертазы, 0,2 мМ праймера P2, 1 мМ смеси dNTP в конечном объеме 20 мкл. Синтез второй цепи кДНК проводили с помощью ступенчатой ПЦР в присутствии двух ген-специфических праймеров. Условия синтеза: предденатурация 2 мин при 94°C; 8 циклов 30 сек при 94°C, 30 сек от 50°C до 42°C со снижением по 1°C за цикл и 1.5 мин элонгации при 72°C; 25 циклов по 30 сек при 94°C, 30 сек при 42°C и 1.5 мин при 72°C и конечный этап элонгации 15 мин при 72°C. Полученные продукты были разделены в 1% агарозном геле, и фрагмент ожидаемого размера был вырезан и элюирован при помощи набора Silica Bead DNA gel extraction kit (Thermo Scientific, Литва). Фрагмент ожидаемого размера клонировали в вектор pBluescriptII KS (-)сMyc по методу ТА-клонирования с использованием Rapid Ligation kit (Thermo Scientific, Литва). Затем продукт лигирования трансформировали в компетентные клетки *E.coli* штамм DH5α. Трансформированные колонии, несущие вектор со

вставкой, были выявлены по комплементации гена *lacZ*, и плазмидная ДНК была выделена при помощи GeneJET Plasmid Miniprep kit (Thermo Scientific, Литва). Наличие вставки в выделенных плазидах было подтверждено посредством ПЦР, и последовательность гена была определена при помощи секвенирования с применением пары праймеров M13 в обоих направлениях.

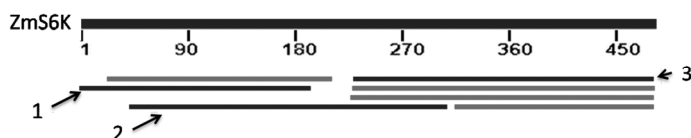
Экспрессия и очистка рекомбинантного белка. кДНК гена *TaS6K* была переклонирована в вектор pET19b по сайтам XhoI-BamHI, в результате чего был получен экспрессионный вектор pET19b-TaS6K- Myc•tag с His•tag последовательностью на N-конце. Данный вектор был трансформирован в *E. coli* (DE3) штамм Rosetta и Amp^R трансформанты были выращены при 37°C до OD_{600nm} = 0,6. Экспрессия белка была индуцирована 0,1 мМ изопропил-β-D-1-тиоглуктопиранозида (ИПТГ) в течение ночи при 30°C. Клетки были осаждены и лизированы в Френч-прессе при 18000 psi в лизирующем буфере (20 мМ HEPES-KOH pH 7.6, 50 мМ KCl, ингибиторы протеаз Complete™ (Roche Diagnostics, Швейцария)). Лизат был очищен центрифугированием 30 мин при 40,000 x g, 4°C; полученный супернатант был доведен до 500 мМ NaCl и 20 мМ имидазола и загружен в колонку HiTrap Chelating HP column (Amersham Biosciences, GE Health), заряженную ионами Ni²⁺. Связанные белки были элюированы в градиенте 50-600 мМ KCl. Очищенный белок хранился в 50% глицероле при 20°C. Чистота белковых образцов была проверена посредством ДСН-ПААГ электрофореза.

Выделение белков из алейрона и иммуноблоттинг. Беззародышевые части зерен пшеницы инкубировали на фильтровальной бумаге, смоченной водой с добавлением гибберелина или абсцизовой кислоты. Алейроновый слой отделяли от эндосперма и гомогенизировали в ступке с добавлением экстракционного буфера (50 мМ Трис-HCl pH 7.6, 40 мМ ЭДТА, 20 мМ ЭГТА, 20 мМ NaF, 1.2 μМ ДТТ, 0.1% Triton X-100, ингибиторы протеаз Complete™) и потом 30 мин при 4°C на цилиндрическом ротаторе. Экстракт очищали от дербиса центрифугированием 13000x g при 4°C. Белки были денатурированы в 1-кратном буфере Лэммли при 95°C в течение 5 мин. Образцы были разделены в 10% ДСН-ПААГ и перенесены на PVDF мембрану. Инкубация с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4°C. Для выявления сигнала на пленке Kodak (Carestream Health, США) использовался набор реагентов ECL™ (GE Healthcare, США).

Результаты и их обсуждение

Для поиска гена *TaS6K* в базе данных уникальных фрагментов экспрессирующихся последовательностей пшеницы (EST), использовали последовательность кДНК гена кодирующего S6K кукурузы (*ZmS6K*, каталожный номер AY389497.1). Сравнение аминокислотной последовательности *ZmS6K* с транслированными последовательностями (EST) пшеницы выявило наличие нескольких высоко гомологичных к *ZmS6K* фрагментов мРНК (рис.1).

Как видно из результатов tBLASTn поиска все 3 выбранных фрагмента обладают высокой гомологией по отношению к *ZmS6K* (Score - 226, 419 и 429, значение E - 5e-69, 4e-143 и 1e-146 соответственно). В среднем 74.3% аминокислотных остатков оказались идентичными к *ZmS6K* и 84.7% - позитивными.

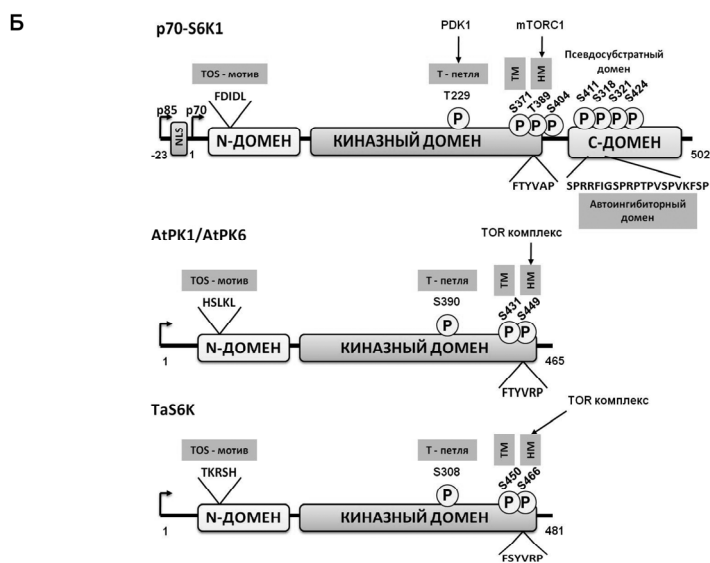
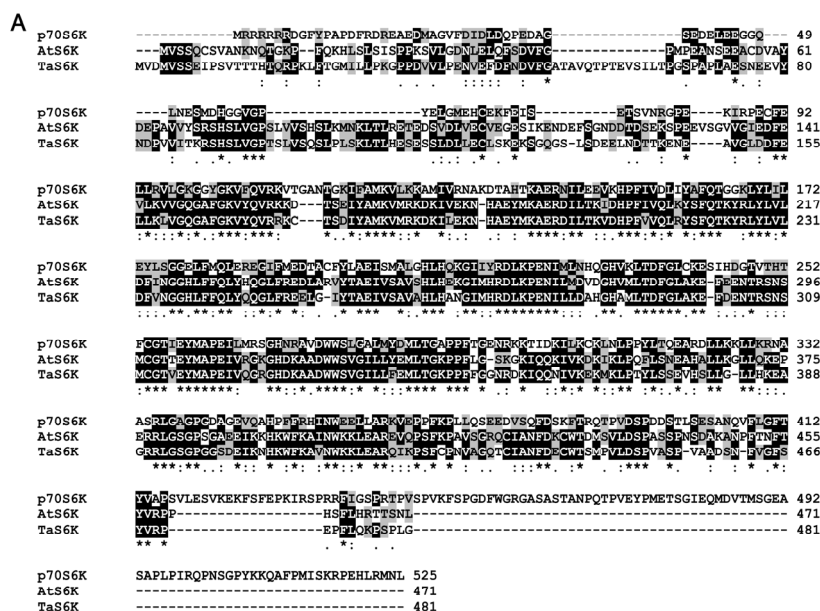


Фрагмент 1. *Triticum aestivum* кДНК клон wpa1c.pk012.e18 (5'-фрагмент мРНК длиной 613 нп); Фрагмент 2. *Triticum aestivum* кДНК клон whhg18j03 (5'-фрагмент мРНК длиной 830 нп); CJ659222 библиотека кДНК Wh_HGCPDAM; Фрагмент 3. *Triticum aestivum* кДНК клон gwacs5m05 (3'-фрагмент мРНК длиной 877 нп); CJ522332 библиотека кДНК Wh_CSEC.

Рисунок 1 - Сравнение *ZmS6K* с транслированными EST пшеницы.

На основе выявленных последовательностей мРНК были созданы праймеры для получения кДНК *TaS6K*. В качестве источника мРНК для реакции ОТ-ПЦР были выбраны листья 6-7-дневных проростков пшеницы. С помощью ОТ-ПЦР получена полная нуклеотидная последовательность кДНК предполагаемого гена *TaS6K* длиной 1446 пн, что полностью соответствует к предполагаемой открытой рамке считывания *TaS6K* (см. раздел «Материалы и методы исследования»). Показано, что

кДНК *TaS6K* содержит одну рамку считывания из 481 аминокислот. Расчетная молекулярная масса составляет 53,6 кДа. Выравнивание аминокислотной последовательности *TaS6K* показала высокую гомологию с *p70S6K1* человека (31% идентичность) и *AtS6K1* арабидопсиса (68% идентичность) (рис. 2, А). Как и у других *S6* киназ, в киназном домене *TaS6K* были обнаружены характерные консервативные элементы: петля активации (Т-петля), гидрофобный мотив (НМ) и мотив-изгиб (ТМ; рис. 2, Б).

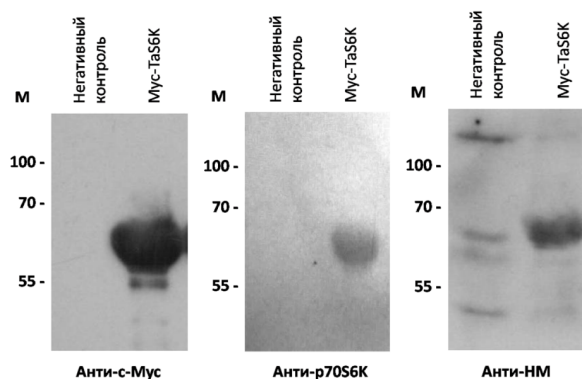


Звездочки (*), двоеточия (:), и точки (.) указывают на идентичные, консервативные и полуконсервативные аминокислотные участки, соответственно. А - Сравнительное выравнивание аминокислотной последовательности. Б - Схематическая структура *TaS6K* в сравнении с *p70S6K1* человека и *AtS6K1* арабидопсиса.

Рисунок 2 - Сравнение *TaS6K* с *p70S6K1* человека и *AtS6K1* арабидопсиса.

Известно, что *S6K1* фосфорилируется по множественным сайтам в ответ на действия инсулина и митогенов у человека [10], а также у арабидопсиса в ответ на фитогормон – ауксин [11]. Анализ аминокислотной последовательности *TaS6K* показала на консервативность сайтов фосфорилирования: S308 для Т-петли, S450 для ТМ и S466 для НМ. Сайты S450 и S466 предположительно фосфорилируются гомологами киназ *PDK1* и *TOR*. Данные результаты предполагают, что механизм

активации и функционирования киназы TaS6K аналогичен p70S6K и других AGC-киназ. Необходимо отметить отсутствие С-терминального псевдосубстратного домена у S6 киназ растений [12].



М – белковый маркер, масса в кДа.

Рисунок 3 - Иммуноблоттинг рекомбинантного белка Мус-TaS6K с использованием антител специфичных к с-Мус, p70S6K и НМ-мотиву p70S6K

Для функциональной экспрессии кДНК *TaS6K* с Мус•tag была переклонирована в вектор pET19b по сайтам *XhoI-BamHI*. В результате получили рекомбинантный вектор pET19b-*TaS6K*-Мус•tag с His•Tag последовательностью на N-конце. Затем вектор pET19b-*TaS6K*-Мус•tag-His•Tag был трансформирован в *E. coli* (DE3) Rosetta и канамицин- устойчивые колонии выращивали до $OD_{600nm} = 0.6$ при 37°C. Для индукции синтеза *TaS6K* в среду добавляли 0.1 мМ ИПТГ. Рекомбинантный белок был очищен с помощью никель основанной аффинной хроматографией до гомогенного состояния. Затем с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии была установлена принадлежность рекомбинантного белка к S6 киназам.

Экспрессия кДНК *TaS6K* - Мус•tag также была исследована с помощью 3 различных антител: анти-с-Мус антитела (anti с-Мус, Sigma-Aldrich), анти-p70S6K (anti-p70S6K, Cell Signaling) и анти - НМ p70S6K (anti-RPS6KB1 (AB-389), Sigma-Aldrich). Иммуноблоттинг со всеми 3 типами использованных антител дал положительный результат, что говорит о высокой гомологии *TaS6K* к p70S6K млекопитающих (рис. 3). Сигнал от антител специфичных к p70S6K1 был относительно слабым, что возможно обусловлено различиями в доменной структуре белков. Наличие консервативного НМ-мотива, обнаруженное при сравнительной анализе аминокислотной последовательности, подтвердилось распознаванием рекомбинантного белка анти-НМ антителами. Эти антитела специфичны к пептидной последовательности НМ-мотива вокруг аминокислот 387-391 (GFTYV) в p70S6K1 млекопитающих. В качестве негативного контроля был использован белковый экстракт неиндуцированной бактериальной суспензии.

В целом p70S6K млекопитающих для активации требует, по крайней мере, фосфорилирования семи различных сайтов, четыре из которых расположены в аутоингибиторном домене, Thr-229 в петле активации, Ser-371 в ТМ-мотиве и Thr-389 находится в НМ-доме. Киназой ответственной за фосфорилирование сайта в НМ-доме (Thr-389) является TOR киназа [3].

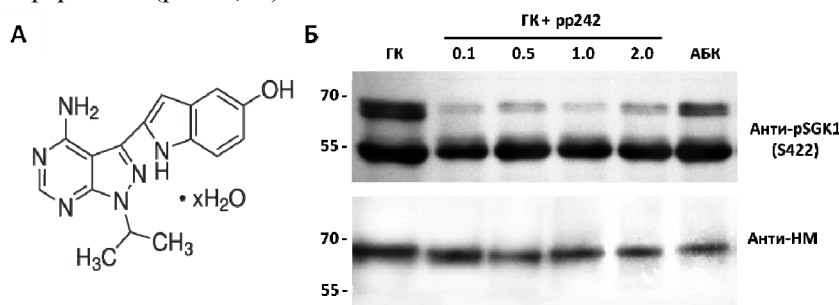
Анализ аминокислотной последовательности НМ-домена с соответствующими доменами p70S6K1 и AtS6K1 выявило высокую гомологию. Однако выявлено, что аминокислота, соответствующая к Thr-389 p70S6K1 и Thr-449 AtS6K1 в НМ-доме фермента, представляет собой Ser-466. В связи с этим, нами был проведен поиск коммерчески доступных антител, имеющих специфичность к фосфорилированному эпиту, гомологичному к НМ-мотиву *TaS6K*.

Все ферменты, принадлежащие к семейству AGC серин/треониновых протеинкиназ, в том числе p70S6K, содержат киназный домен и консервативный С-концевой домен [9]. У всех AGC киназ С-концевой домен включает сайты фосфорилирования в НМ-мотиве и петле активации. НМ-мотив у представителей AGC киназ имеют высокое сродство к НМ-мотиву S6 киназ.

Результаты сравнительного выравнивания последовательностей НМ-мотивов разных AGC-киназ человека и S6 киназ растений показало, что наибольшим сходством с гидрофобным мотивом *TaS6K*

обладает глюкокортикоид-индуцибельная киназа SGK1. В связи с этим нами было решено использовать антитела специфичные к фосфорилированной форме SGK1 (anti-pSGK1 (S422), Santa Cruz Biotech.). Сравнение последовательности антигена, используемого для получения данных антител, с НМ-мотивом ТаS6K позволило предположить, что анти-pSGK1 могут быть использованы для детекции фосфорилированной формы ТаS6K (S466) у *Triticum aestivum* (Данные не показаны).

В наших экспериментах для выявления TOR зависимого фосфорилирования ТаS6K в условиях *in vivo* мы использовали селективный ингибитор TOR киназы – pp242. Ингибитор pp242 (2-(4-амино-1-изопропил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-3-ил)-1H-индол-5-ол) – первый сильнодействующий селективный конкурентный ингибитор mTOR киназы [13], действие которого направлено на АТФ-связывающий домен фермента (рис. 5, А).



А – Структура pp242. Б – Ингибирование фосфорилирования S6 киназы пшеницы. Масса белков в кДа.

Рисунок 5 – Эффект pp242, специфического ингибитора TOR киназ, на фосфорилирование ТаS6K.

При этом его эффективность превышает действие рапамицина в несколько раз. В связи с этим в последующих экспериментах алейроновые слои инкубировали в присутствии ГК(1 мкМ) , АБК(5 мкМ) и ГК (1 мкМ) + pp242, с концентрацией ингибитора от 0,1 до 5 мкМ в течение 24 часов. Для выявления TOR зависимого фосфорилирования ТаS6K использовали анти-pSGK1 антитела специфичные к фосфорилированному НМ-мотиву, а также антитела к НМ-мотиву p70S6K для определения эндогенного уровня ТаS6K в алейроновом слое зерна пшеницы.

Как видно из результатов анти-фосфо-SGK1 антитела в клетках алейронового слоя зерна пшеницы выявили две белковые полосы с молекулярной массой приблизительно 50 и 70 кДа, как в присутствии ГК, так и АБК в инкубационной среде (рис. 5, Б). При этом антитела к НМ-мотиву p70S6K выявило только одну белковую полосу с молекулярной массой приблизительно 70 кДа. Присутствие pp242 в дозе от 0,1 до 5 мкМ полностью блокировало фосфорилирование белка с молекулярной массой 70 кДа, что соответствует характеру движения ТаS6K на ДСН-электрофореграмме (рис. 5, Б). Тогда как эндогенный уровень ТаS6K не зависел от присутствия специфического ингибитора TOR-киназы.

Таким образом, можно предположить, что в клетках алейронового слоя зерна пшеницы ТаS6K фосфорилируется TOR-киназой. При этом ГК по сравнению с действием только АБК значительно стимулирует фосфорилирование ТаS6K.

Литература

- 1 Hay N., Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR // *Genes. Dev.* – 2004. - №18. - P.1926–1945.
- 2 Sarbassov D., Sabatini M. Redox regulation of the nutrient-sensitive Raptor-mTOR pathway and complex // *J. Biol. Chem.* – 2005. - №280 (47). – P.39505-39509.
- 3 Holz M., Blenis J. Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase // *J. Biol. Chem.* – 2005. - №280. – P.26089–26093.
- 4 Harada H., Andersen J., Mann M., Terada N., Korsmeyer S. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. - №98 (17). - P.9666-9670.
- 5 Zhang S., Lawton M., Hunter T., Lamb C. Atpk1, a novel ribosomal protein kinase gene from Arabidopsis. Part 1 // *J. Biol. Chem.* – 1994. - №269. – P.17586–17592.
- 6 Mahfouz M., Kim S., Delauney A., Verma, D. Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals // *Plant Cell.* – 2006. - №18. – P.477-490.
- 7 Xiong, Y., Sheen, J. Rapamycin and glucose-target of Rapamycin (TOR) signaling in plants // *J. Biol. Chem.* – 2012. - №287 – P.2836-2842.
- 8 McRae E. Extraction of RNA // *Methods in molecular biology.* – 2007. - №353. P.15-24.