

王 蕾, 罗才林, 徐德林, 等. 千里光脂肪酸脱氢酶(*D6D*)的保守基序(CSM)与功能结构域分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 73–77.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.018

千里光脂肪酸脱氢酶(*D6D*)的保守基序(CSM)与功能结构域分析

王 蕾, 罗才林, 徐德林, 钱 刚

(遵义医学院医学细胞生物学与遗传学教研室, 贵州遵义 563000)

摘要: $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶($\Delta 6$ desaturase, *D6D*)是不饱和脂肪酸合成途径中的限速酶。以高等植物千里光为材料, 通过构建全长 cDNA 文库克隆得到脂肪酸脱氢酶基因(*D6D*), 明确了 *D6D* 基因的氨基酸保守基元序列(conserved sequence motif, CSM)对蛋白质功能结构域的决定作用。结果显示, 千里光 *D6D* 基因由 466 个氨基酸残基组成; 预测蛋白分子量为 53.40 ku, 理论等电点为 8.48; 进化树和序列比对结果提示 3 个富含 His 的保守基元序列(His I-片段、His II-片段、His III-片段)在不同物种中表现出高度保守性; 三维结构预测结果表明, *D6D* 基因的保守结构域以及一个类似于细胞色素(cytochrome, cyt) b_5 的血红素结合区是形成底物结合部位和酶催化活性中心的结构基础。

关键词: 千里光; 脂肪酸脱氢酶(*D6D* 基因); 保守基元序列(CSM); 三维结构

中图分类号: S567.23+9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0073-05

脂肪酸脱氢酶是多不饱和脂肪酸合成途径中的关键酶, 分为可溶性脱氢酶和膜结合脱氢酶, 其中膜结合脱氢酶又可分为羧基定向的脂肪酸脱氢酶(“frond-end”脱氢酶)和甲基定向的脂肪酸脱氢酶^[1]。脂肪酸脱氢酶结构上都有 3 个保守的组氨酸富集区, 除此之外羧基定向的脱氢酶 N 端还有 1 个类似于细胞色素 b_5 Cyt b_5 的血红素结合区(HPGG)^[2-3]。

$\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶(*D6D*)属于羧基定向的膜结合脱氢酶, 它以 NADH、细胞色素 b_5 氧化还原酶和细胞色素 b_5 作为

电子供体催化甘油酯中的脂肪酸脱氢^[4]。 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶具有催化亚油酸、 α -亚麻酸分别脱氢形成 γ 亚麻酸和十八碳四烯酸的功能^[5]。

千里光(*Senecio scandens* Buch. - Ham. ex D. DO)为菊科(Compositae), 属多年生草本植物, 它是中国传统中药之一, 具有清热解毒、明目、杀虫、保肝、凉血、驱风除湿、抗菌、抗钩端螺旋体等诸多功效^[6-7]。迄今为止, 已经从蓝细菌^[8]、黑茶藨子^[9]、深黄被孢菌^[10]、高山被孢菌^[11]、月见草^[12]、假狼紫草^[13]、雅致枝霉^[14]、卷枝毛霉^[15]、少根根霉^[16]中克隆到 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶。尽管 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因在微生物和植物等不同物种中已有报道^[1], 目前, 关于 *D6D* 基因高级结构和功能关系的研究尚少, 该基因在菊科植物的相关研究也未见报道。本研究率先开展药用植物千里光 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的功能研究, 分析了该蛋白理化性质和保守基序对功能结构域的决定作用, 为深入了解高等植物多不饱和脂肪酸(PUFAs)合成的次生代谢途径和蛋白质组学研究提供依据。

收稿日期: 2015-11-03

基金项目: 国家自然科学基金(31560087); 贵州省优秀科技教育人才省长基金(编号: 黔省专合字 2008-61 号)。

作者简介: 王 蕾(1991—), 女, 黑龙江五大连池人, 硕士研究生, 主要从事药用植物分子遗传学研究。E-mail: 1807840035@qq.com。

通信作者: 钱 刚, 博士, 教授, 主要从事药用植物分子遗传学研究。E-mail: pengjiaqiong@163.com。

recombinant apolipoprotein AIMilano from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds[J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(2): 250–263.

[5] Parmenter D L, Boothe J G, van Rooijen G J, et al. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 29(6): 1167–1180.

[6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 437–438.

[7] 刘 芳, 袁 鹰, 高树仁, 等. 外源 DNA 花粉管通道途径导入机理研究进展[J]. 玉米科学, 2007, 15(4): 59–62.

[8] Rueb S, Hensgens L A M. Improved histochemical staining for β -D-glucuronidase activity in monotylenous plants[J]. Rice Genet Newsletter, 1989, 6: 168–169.

[9] Chandrasekharan M B, Bishop K J, Hall T C. Module-specific regulation of the β -phaseolin promoter during embryogenesis[J]. Plant

Journal, 2003, 33(5): 853–866.

[10] Wu C, Washida H, Onodera Y, et al. Quantitative nature of the prolamins-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression[J]. The Plant Journal, 2000, 23(3): 415–421.

[11] Forde B G, Heyworth A, Pywell J, et al. Nucleotide sequence of a B1 hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat and maize[J]. Nucleic Acids Research, 1985, 13(20): 7327–7339.

[12] 朱亚兰, 姚伟一, 窦建华, 等. 种子特异表达启动子的克隆分析及其植物表达载体的构建[J]. 华北农学报, 2007, 22(2): 6–10.

[13] 刘昱辉. 植物油体表达体系的建立及 Profilin2 维管束特异表达启动子的区段缺失分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2001.

[14] 王永芳, 张 军, 崔润丽, 等. 利用花粉管通道转化谷子 DNA 基因获得转基因小麦[J]. 华北农学报, 2009, 24(2): 17–21.

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料千里光资源(SC-36)系笔者所在课题组采自贵州省遵义地区野生种。

1.2 方法

1.2.1 千里光全长 cDNA 文库的构建 按照 RNA 提取试剂盒说明提取千里光叶片组织的总 RNA,采用 SMART 方法构建了千里光的全长 cDNA 文库^[17],随机挑选阳性克隆进行测序(华大基因)。

1.2.2 *D6D* 基因生物信息学的分析 依据测序结果,通过 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)的 BLAST 进行核苷酸序列比对,并利用 ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析开放阅读框;采用 Expsay ProtParam 程序(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白质的分子量、等电点和氨基酸组成;使用 MEGA 5.0 软件邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发生树;依据软件 DNAMAN 进行多物种氨基酸序列比对并确定蛋白质保守结构域;使用在线工具 SOPM(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto-mat.pl?page=npsa_sopm.html)对千里光 *D6D* 基因进行二级结构分析;通过 NCBI 数据库 GenBank 和 Conserved domains 分析蛋白质保守结构域;将氨基酸序列信息提交(European Bioinformatics Institute(<http://www.isb-sib.ch>)),采用同源模

型服务软件 SWISS-MODEL 构建 *D6D* 基因的 3-D 结构^[17],根据最小叠合法利用 Swiss-Pdb Viewer 软件对 3-D 结构进行修正和叠合^[18]。

2 结果与分析

2.1 千里光 *D6D* 基因的理化性质

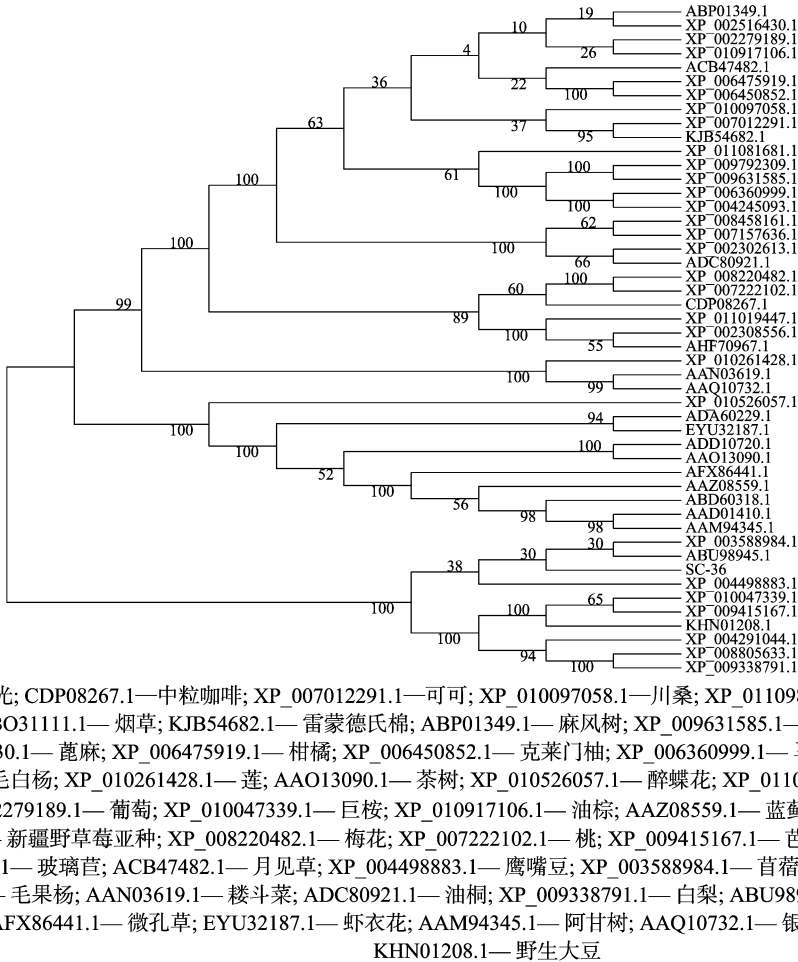
从表 1 可以看出,该千里光 *D6D* 基因的分子量为 53.40 ku,理论等电点 pI 为 8.48,不稳定系数为 42.98,表明该千里光 *D6D* 基因状态不稳定;脂溶指数为 90.58;平均疏水指数为 0.078。该千里光 *D6D* 基因由 20 种氨基酸组成,亮氨酸含量较高,为 12.0%,不含脯氨酸和硒半胱氨酸;原子组成为 C₂₄₆₂H₃₆₉₄N₆₄₀O₆₄S₂₅。

表 1 脂肪酰脱氢酶一级结构预测结果

千里光 <i>D6D</i> 基因一级结构特征	预测结果
氨基酸数目(个)	466.00
分子量(ku)	53.40
等电点(pI)	8.48
负电荷残基	35.00
正电荷残基	40.00
不稳定系数Ⅱ	42.98
脂溶指数	90.58
平均疏水性	0.078

2.2 *D6D* 基因系统进化分析

利用 MEGA 5.0 软件,选择 NJ 法构建系统进化树(图 1)。



SC-36—千里光; CDP08267.1—中粒咖啡; XP_007012291.1—可可; XP_010097058.1—川桑; XP_011098230.1—芝麻; XP_009792309.1—
美花烟草; ABO31111.1—烟草; KJB54682.1—雷蒙德氏棉; ABP01349.1—麻风树; XP_009631585.1—茸毛烟草; ADD10720.1—油茶;
XP_002516430.1—蓖麻; XP_006475919.1—柑橘; XP_006450852.1—克莱门柚; XP_006360999.1—马铃薯; XP_002308556.1—杨树;
AHF70967.1—毛白杨; XP_010261428.1—莲; AAQ13090.1—茶树; XP_010526057.1—醉蝶花; XP_011019447.1—胡杨; XP_004245093.1—
番茄; XP_002279189.1—葡萄; XP_010047339.1—巨桉; XP_010917106.1—油棕; AAZ08559.1—蓝蓟; ADA60229.1—黑果茶藨; XP_
004291044.1—新疆野草莓亚种; XP_008220482.1—梅花; XP_007222102.1—桃; XP_009415167.1—芭蕉亚种; XP_008805633.1—海枣;
AAD01410.1—玻璃苣; ACB47482.1—月见草; XP_004498883.1—鹰嘴豆; XP_003588984.1—苜蓿; XP_008458161.1—甜瓜; XP_
002302613.1—毛果杨; AAN03619.1—楼斗菜; ADC80921.1—油桐; XP_009338791.1—白梨; ABU98945.1—钩柱花草; ABD60318.1—
假狼紫草; AFX86441.1—微孔草; EYU32187.1—虾衣花; AAM94345.1—阿甘树; AAQ10732.1—银莲花; XP_007157636.1—菜豆;
KHN01208.1—野生大豆

图1 *D6D* 氨基酸序列构建的进化树

结果表明, *D6D* 基因与钩柱花草 (XP_003588984.1)、苜蓿 (ABU98945.1) 处于同一进化分支上, 表明它与二者亲缘关系较近; 与月见草 (ACB47482.1)、野生大豆 (KHN01208.1) 亲缘关系较远。

2.3 *D6D* 基因的保守基序分析

根据 *D6D* 基因遗传进化树, 选择包含千里光在内的 5 个亲缘关系差异最大的物种进行序列比对。序列比对结果显示, 这 5 个亲缘关系差异最显著的物种表现出高度同源性, 同源性为 76.31%。序列比对结果发现, 3 个富含组氨酸的保守基元序列 His I - 片段、His II - 片段、His III - 片段和 *N* 端的 1 个类似于细胞色素 b_5 (Cyt b_5) 的血红素结合区 (HPGG) 在不同物种中表现出高度保守性 (图 2)。

2.4 *D6D* 基因二级结构分析

使用在线工具 SPOM 分别对这 5 个物种的 *D6D* 基因进行二级结构分析, 结果表明, *D6D* 基因的二级结构主要由 α -螺旋、 β -转角、线性结构和自由卷曲等 4 种基本结构组成 (表 2), 其中不同物种的二级结构组成比例都十分相近, 例如 α -螺旋的比例最高, 自由卷曲的组成比例次之, β -转角的含量最低。

结果表明, 酶脱氢所共有的 3 个组氨酸保守区, 分别在氨基酸序列的 172~176、209~213、395~402 处。结合 *D6D* 基因保守基序形成的二级结构, 结果发现, 即使在亲缘关系相距最远的 5 个物种中, 无论是保守基序还是非保守基序所形成的二级结构都非常相近 (图 3)。

表 2 *D6D* 二级结构组成比例

物种	比例 (%)			
	α -螺旋	β -转角	线性结构	自由卷曲
千里光 (SC-36)	37.77	11.59	24.46	26.18
苜蓿 (XP_003588984.1)	35.54	11.92	22.96	29.58
钩柱花草 (ABU98945.1)	33.19	12.09	25.49	29.23
月见草 (ACB47482.1)	33.33	9.40	26.17	31.10
野生大豆 (KHN01208.1)	37.73	10.22	22.67	29.78

2.5 *D6D* 基因的保守结构域与三维结构对比分析

利用 Blast 搜索高等植物脂肪酸脱氢酶功能结构域, 结果表明, *D6D* 是羧基定向的脂肪酸脱氢酶, 它包含 3 个组氨酸保守结构域, 分别为 HXXXH、HXX(X)HH、H/QXX(X)HH, 其 *N* 端存在类似于细胞色素 b_5 (Cyt b_5) 的血红素结合区 (HPGG) (图 2), 这也在 *D6D* 结构域预测图中得到进一步证明 (图 4)。三维结构结果表明, 包括千里光在内的 5 个遗传差异最为显著的物种中, *D6D* 基因具有高度相似的三维结构。如图 5 所示, 在 3-D 结构中, *D6D* 基因结构成分以 α -螺旋和自由卷曲为主; 3 个组氨酸保守区以及类似于细胞色素 b_5 (Cyt b_5) 的血红素结合区 (HPGG) 是形成底物结合部位和酶催化活性中心的结构基础。

3 结论与讨论

1993 年, Reddy 等首先从 1 株产 6,9,12-十八碳三稀酸的蓝细菌 (*Synechocystis* sp. PCC6803) 中克隆得到 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因, 并在 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶缺陷的蓝细菌 (*Anabaena* sp. PCC7120) 中得到功能性表达^[8]。这一科研成果为

后续脂肪酸脱氢酶的深入研究奠定了基础。目前, 通过 cDNA 文库筛选、cDNA 文库随机测序和 cDNA 末端扩增技术 (RACE) 等多种方法已经从动植物和真菌等不同生物中克隆到 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因^[19]。本研究是基于提取并且纯化千里光叶片 mRNA 构建的全长 cDNA 文库^[20], 表明 *D6D* 基因合成中产物对高等植物千里光有重要作用。目前, 可以推测 *D6D* 是决定千里光合成多不饱和脂肪酸的关键基因之一。但由于大部分高等植物不能合成 $\Delta 6$ 位脱氢的脂肪酸, 所以 *D6D* 基因在高等植物中的具体作用机制还有待于进一步研究。

研究证实, 用蛋白质氨基酸序列所构建的遗传进化树分支不仅可以反映物种间的亲缘关系, 还可以作为蛋白功能相关性评价的依据, 这是因为植物在长期适应环境的进化过程中, 执行相关生理功能的基因因其重要的保护作用会表现得相对保守^[21-22]。本研究构建了 *D6D* 基因的遗传进化树, 选择了与千里光亲缘关系差异较大的 4 个物种进行结构与功能分析, 发现其基元序列变异性较高, 说明在代谢过程中可以有其他代谢途径将 *D6D* 基因替代, 同时, 这种较高的变异性也可以加速物种的进化, 说明并不是所有生物体内都必须含有 *D6D* 基因。

为准确分析基元序列特征, 本研究选择与高等植物千里光亲缘关系差异最为显著的 4 个物种, 由此可见, 该保守基序是构成羧基定向的膜结合脱氢酶功能域的基本结构单位, 通过保守结构域的分析也证实了这一点。氨基酸序列分析发现 *D6D* 的 *N* 端和 *C* 端部分缺乏明显的同源性, 但中部序列相对保守, 含有 3 个极度保守的组氨酸富集区。Fox 等提出, 这 3 个保守区可能参与酶活性中心位点的形成, 这一点已经在二价铁酶中得到验证^[23]。*D6D* 基因除了有这 3 个组氨酸富集区以外, 在其 *N* 末端的 1 个类似 Cyt b_5 的亚铁血红素结合区, 删除这段特殊序列区, 或者对关键氨基酸位点进行突变, 都会导致酶功能的紊乱^[24], 同时根据其基元序列, 发现 *D6D* 基因的保守基序以及 HPGG 血红素结合区氨基酸片段高度保守, 进一步证实 *D6D* 基因底物结合部位和酶催化活性中心的结构基础是 3 个组氨酸保守结构域和 1 个类似于细胞色素 b_5 的结构域。除此之外, $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶还有 2 个特殊的组氨酸 H53 和 H76, 它们在 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶中的位置和血红素上的 2 个组氨酸在细胞色素中位置一致; 推断这 2 个组氨酸与血红素的稳定性有关; 对 His53HPGG56 序列进行预测, 发现脂肪酸脱氢酶存在 β -折叠, 这样可以使 His53 更容易结合于血红素上而发挥 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶的活性^[20], 证明其三维结构中存在 β -折叠的重要性。本研究为进一步阐明蛋白质结构和功能相关性, 依据氨基酸的保守序列对结构蛋白和功能蛋白进行 3-D 同源建模^[25-26]。研究发现, *D6D* 基因保守结构域是以 α -螺旋和 β -转角相互作用形成的独立结构, 进一步折叠形成蛋白质的三级结构^[27], 是脂肪酸脱氢酶底物结合位点和催化位点功能域的基本单位; 千里光 *D6D* 基因所形成的高级结构相对较松散, 表明 *D6D* 基因在形成四级结构的过程中, 须要结合更大官能团的辅酶或辅基, 抑或可为辅酶或辅基提供多个结合位点; 意味着高等植物 *D6D* 基因在催化多不饱和脂肪酸的反应过程中, 有利于结合并且转运较大基团的反应底物。

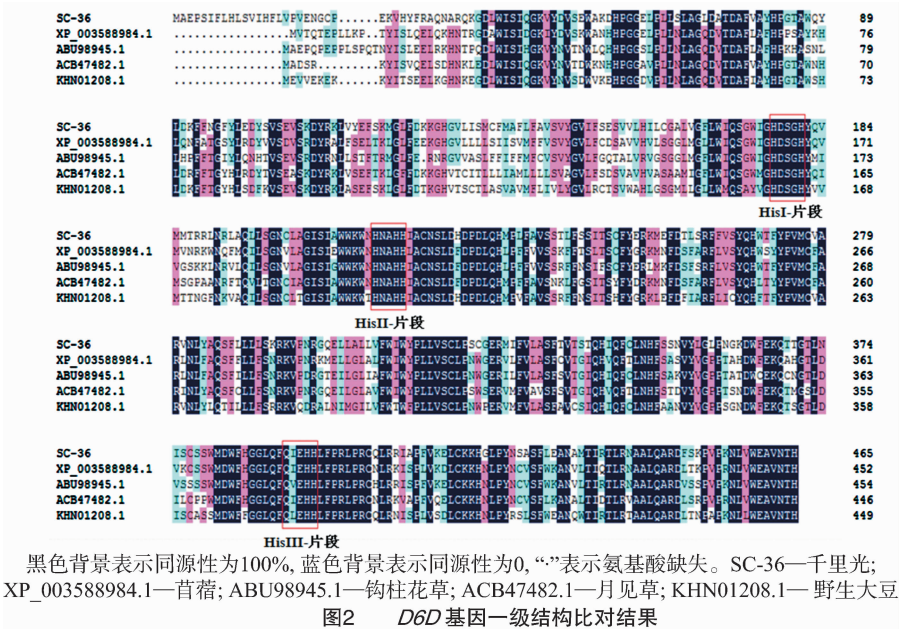
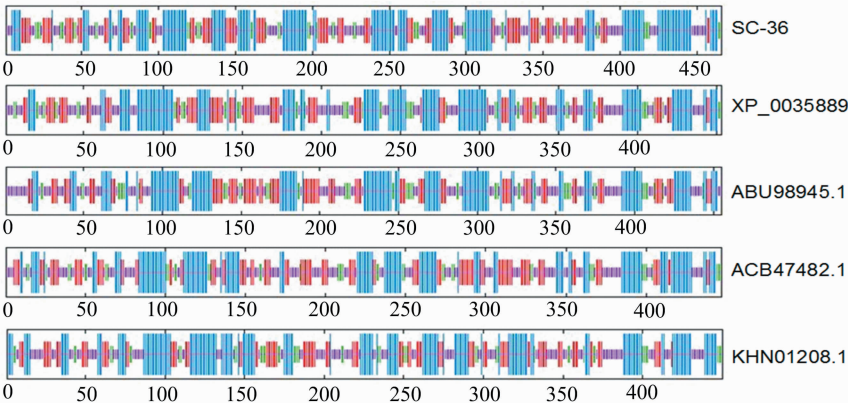


图2 *D6D* 基因一级结构比对结果



SC-36—千里光; XP_003588984.1—苜蓿; ABU98945.1—钩柱花草; ACB47482.1—月见草; KHN01208.1—野生大豆

图3 *D6D* 基因二级结构分析

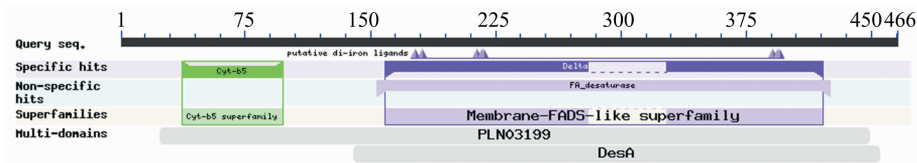


图4 千里光 *D6D* 基因的结构域

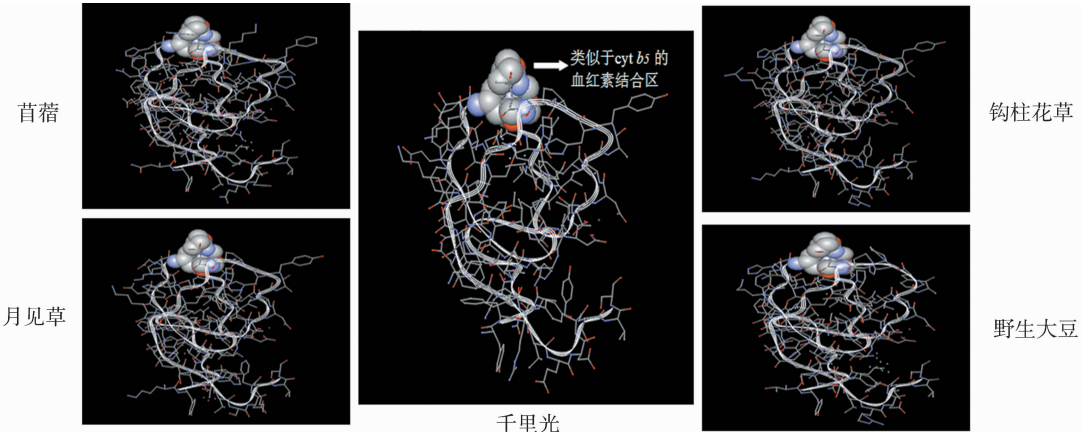


图5 *D6D* 基因三维结构预测

参考文献:

- [1] 李冠, 杜钰, 黄琼, 等. 脂肪酸脱氢酶研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2): 121–126.
- [2] Los D A, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1998, 1394(1): 3–15.
- [3] Shanklin J, Cahoon E B. Desaturation and related modification of fatty acids[J]. Annual Review of Plant Biology, 1998, 49: 611–641.
- [4] 张琦, 李明春, 孙红妍, 等. $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶的分子生物学研究进展[J]. 生物工程学报, 2004, 20(3): 319–324.
- [5] 黄胜和, 丁永红, 哈斯阿古拉. 植物 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶及其基因的研究进展[J]. 北方园艺, 2011(1): 216–219.
- [6] 全国中国草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 1390.
- [7] 孟凡君, 张雪君, 谢卫东. 中草药千里光研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(9): 156–160.
- [8] Reddy A S, Nuccio M L, Gross L M, et al. Isolation of a $\Delta 6$ -desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 22(2): 293–300.
- [9] 宋丽英. 黑茶藨子 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的克隆及功能研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.
- [10] 李明春, 刘莉, 张丽, 等. 深黄被孢霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的克隆及序列分析[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 44–50.
- [11] 李明春, 刘莉, 胡国武, 等. 高山被孢霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的克隆、结构分析及其功能的研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 220–227.
- [12] 黄胜和. 月见草 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的克隆与异源表达[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2009.
- [13] 杜钰. 假狼紫草 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因克隆研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2006.
- [14] 王德培. 雅致枝霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因及其启动子的克隆与功能分析[D]. 天津: 南开大学, 2006.
- [15] 赵芳. 卷枝毛霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因在大肠杆菌和烟草中的表达[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [16] 张琦, 李明春, 孙颖, 等. 少根根霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的克隆和表达[J]. 遗传学报, 2004, 31(7): 740–749.
- [17] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42: 252–258.
- [18] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195–201.
- [19] 白义春, 康相涛, 孙桂荣, 等. $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶研究进展[J]. 河南农业科学, 2008(2): 9–12.
- [20] 平军娇, 张珍, 蔡振锋, 等. 千里光全长 cDNA 文库的构建及分析[J]. 中草药, 2012, 43(3): 557–561.
- [21] Khuri S, Bakker F T, Dunwell J M. Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins[J]. Molecular Biology and Evolution, 2001, 18(4): 593–605.
- [22] 钱刚, 平军娇, 张珍, 等. 3 种棱型大麦中脱水素 6(DHN6)的性质、突变位点与蛋白质进化分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(3): 322–329.
- [23] Fox B G, Shanklin J, Ai J, et al. Resonance raman evidence for an Fe-O-Fe center in stearoyl-ACP desaturase. primary sequence identity with other diiron-oxo proteins[J]. Biochemistry, 1994, 33(43): 12776–12786.
- [24] Sayanova O, Shewry P R, Napier J A. Histidine-41 of the cytochrome b_5 domain of the borage $\Delta 6$ fatty acid desaturase is essential for enzyme activity[J]. Plant Physiology, 1999, 121(2): 641–646.
- [25] Gelly J C, Lin H Y, de Brevern A G, et al. Selective constraint on human pre-mRNA splicing by protein structural properties[J]. Genome Biology and Evolution, 2012, 4(9): 966–975.
- [26] Broeker N K, Gohlke U, Müller J J, et al. Single amino acid exchange in bacteriophage HK620 tailspike protein results in thousand-fold increase of its oligosaccharide affinity[J]. Glycobiology, 2013, 23(1): 59–68.
- [27] 纪兆林, 石刘飞, 李健, 等. 卷曲螺旋结构及其研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 6–11.