

DOI: 10.13376/j.cbls/2022142

文章编号: 1004-0374(2022)10-1284-05



谷峰, 湖南师范大学“潇湘学者”特聘教授, 2006年获得中国协和医科大学遗传学博士学位, 之后在美国康州大学健康中心和西雅图华盛顿大学医学院进行博士后训练, 2022年加入湖南师范大学。目前主要从事基因编辑基础和转化研究。近5年以通讯作者在 *Nature Communications*、*PLoS Biology*、*Nucleic Acids Research* (2篇)、*Molecular Therapy* (3篇)、*Journal of Biological Chemistry* (2篇)、*FASEB Journal* 等刊物发表文章。

线粒体基因组靶向编辑研究进展

王佳华¹, 谷峰^{1,2*}

(1 温州医科大学眼视光学院(生物医学工程学院)、附属眼视光医院眼视光学和视觉学国家重点实验室, 温州 325027; 2 湖南师范大学医学院, 长沙 410013)

摘要: 线粒体作为细胞中重要的细胞器, 其携带有自身的基因组。线粒体基因组发生突变后, 可能导致人类疾病。开发靶向线粒体基因组的新型基因编辑工具在疾病治疗和疾病模型构建中具有重要意义。该文总结了线粒体基因编辑领域的进展, 特别是近期以 DdCBE 和 TALED 为代表的重大进展; 同时, 也指出目前线粒体基因编辑工具仍然有一些缺点。该文拟为新型线粒体基因编辑工具的研发提供参考。

关键词: 线粒体疾病; 基因编辑; DddA 衍生的胞嘧啶碱基编辑器; 脱靶

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A

Progress of targeted gene editing for mitochondrial DNA

WANG Jia-Hua¹, GU Feng^{1,2*}

(1 State Key Laboratory of Ophthalmology, Optometry and Vision Science, School of Ophthalmology and Optometry, Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China; 2 School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410013, China)

Abstract: Mitochondria act as an important organelle in cells, which harbor their own genomes. Mutations in mitochondrial DNA cause human genetic diseases. The development of novel gene-editing tools that target the mitochondrial genome hold great promise for human gene therapy and disease model generation. In the present paper, we summarize the recent progress of mitochondrial gene editing, especially the major technological inventions represented by DdCBE and TALED. At present, there are still some limitations of mitochondrial gene editing tools. The present paper intends to provide more insights for the development of novel gene editing tools to manipulate mitochondrial DNA.

Key words: mitochondrial disease; gene editing; DdCBEs; off-target

收稿日期: 2022-07-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(82271910)

*通信作者: E-mail: fg@hunnu.edu.cn

线粒体被认为是真核哺乳动物细胞除核以外的唯一含 DNA 的细胞器, 为机体提供能量, 并且参与细胞凋亡、细胞信号转导、炎症反应、细胞增殖等多种生理生化过程。线粒体基因组突变引起的线粒体疾病的群体发病率大概为 1/5 000, 所以探索编辑线粒体基因组的方法十分有意义。基因编辑新工具的研发, 特别是 CRISPR/Cas9 技术为人类定点改造基因组提供了强大的动力。然而, 靶向哺乳动物线粒体基因组的基因编辑技术一直进展缓慢, 直到近期以双链 DNA 脱氨酶毒素 A (double-stranded DNA deaminase toxin A, DddA) 和 tRNA 腺嘌呤脱氨酶 (tRNA adenine deaminase, TadA) 为基础的 DdCBE (DddA-derived cytosine base editors, DdCBEs) 和 TALED (transcription-activator-like effector-linked deaminases) 基因编辑技术被报道。在本文中, 我们简单介绍线粒体概况, 重点对线粒体基因编辑的进展进行总结, 以期对线粒体疾病治疗提供线索。

1 线粒体生物学概况

关于线粒体的起源目前主要有 2 种学说: 内共生假说和细胞分化假说^[1-2]。内共生假说认为线粒体起源于被细胞吞噬的线粒体祖先——原线粒体, 即一种能进行三羧酸循环和电子传递的革兰氏阴性菌。而细胞分化假说则认为线粒体是由内质网膜或细胞膜等生物膜系统中的膜结构演变而来的。人类线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是一个多拷贝、环状、双链 DNA 分子, 长约 16.6 kb, 结构紧凑, 编码呼吸链复合体 I、III、IV 和腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 合成酶等 13 个必需的多肽 (亚基), 22 个转运 RNA (transfer ribonucleic acid, tRNAs) 和 2 个核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNAs)^[3]。线粒体基因表达受核 DNA (nuclear DNA, nDNA) 和 mtDNA 共同调控。目前, 在人类 mtDNA 中已发现 100 多个致病性点突变, 导致的线粒体疾病主要包括中枢神经系统和肌肉骨骼系统等疾病^[4]。

2 基于线粒体移植治疗线粒体疾病

线粒体疾病是由于 mtDNA 或 nDNA 基因突变所导致, 因为 nDNA 突变与其他遗传病类似, 都是由于细胞核基因发生突变所导致, 在治疗方面方法也类似, 故本文描述的线粒体病治疗将局限于因 mtDNA 突变所导致的疾病。目前围绕线粒体疾病, 如果从基因水平进行干预, 那主要包括线粒体置换治疗和基因编辑。

线粒体置换治疗 (mitochondrial replacement therapy, MRT) 原理是把有线粒体疾病风险的卵母细胞 / 受精卵中的遗传物质转移到一个仅含细胞质 (拥有正常线粒体基因组) 细胞内。其中原核移植 (pronuclear transfer, PNT) 和母源纺锤体移植 (maternal spindle transfer, MST) 是线粒体置换治疗的主要内容。而由于极体仅保留极少细胞质, 关于极体转移 (polar body transfer, PBT) 理论上能够更好地避免残留的突变 mtDNA^[5-8]。

亚急性坏死性脑脊髓病又称 Leigh 综合征, 该疾病是由于 mtDNA 的基因突变导致氧化磷酸化的障碍, 从而影响 ATP 的产生, 使得脑干和基底神经节中的细胞由于长期缺乏能量而死亡, 同时也会造成心脏和骨骼肌等高耗能细胞的损伤, 患儿最终死于多器官衰竭^[9-10]。利用母源纺锤体移植, 世界上首位“三亲婴儿”诞生^[11]。但是该方法很难完全避免在移植过程中母源线粒体 DNA 进入供体卵细胞内。另外, 随着胚胎的进一步发育, 因为有缺陷的母源线粒体, 所以个体仍然有一定的疾病发生风险。另外, “三亲婴儿”也有一定的伦理问题^[12-13]。这些在一定程度上限制了线粒体置换治疗在临床中广泛开展。

值得一提的是, 近期一种利用强制性线粒体自噬清除线粒体置换过程中残留线粒体 DNA 的技术体系被报道^[14]。利用该体系, 可有效、安全地清除线粒体置换过程中来源于核供体胚胎中的线粒体及其 DNA, 经过优化后, 有望进一步提高临床上的线粒体置换效率, 从而为通过辅助生殖技术阻断遗传性线粒体疾病提供新的治疗策略。

3 基于TALEN和CRISPR/Cas编辑线粒体基因组

利用基因编辑方法对突变线粒体基因进行定点修复将可能部分避免以上问题。考虑到有些疾病中细胞部分 mtDNA 携带致病突变, 如果将这些带有突变的线粒体进行去除, 使细胞中带有突变的线粒体的百分比低于临床发病的阈值, 理论上可以达到治疗的目的。利用特定的人工核酸酶来特异地识别突变的线粒体基因组, 包括锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs) 和类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs)^[15-17]。如将靶向线粒体的 TALEN (mitochondrial-targeted TALEN, MitoTALEN) 包装于腺相关病毒 (adenovirus-associated virus, AAV), 同时将病毒感染携带 mtDNA

突变 (*m.5024C>T*) 的小鼠肌肉,发现骨骼肌和心肌中突变的 mtDNA 负荷明显降低,线粒体 tRNA^{Ala} 的表达水平恢复^[16]。类似的研究也实现了线粒体 tRNA^{Ala} 的稳态表达^[17]。该类方法对于去除突变的线粒体有一定的作用,但是因为其无法从根本上修复线粒体基因组,所以该方法在临床应用中有明显的限制。另外,线粒体中突变阈值可能并不是出现在每种线粒体遗传病。就笔者所知,如 Leber 遗传性视神经病 (Leber hereditary optic neuropathy, LHON),目前在患者血液中检测相关的突变基本是 100% 突变。

以 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins) 为代表的基因编辑技术引发了一场生物技术革命。CRISPR-Cas9 通过人工设计的单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 来识别目的基因序列,并引导 Cas9 蛋白对 DNA 双链进行切割导致 DNA 双链断裂 (DNA double-strand break, DSB),之后细胞内修复机制启动并导致基因敲除或敲入等,最终实现基因组 DNA 靶向编辑的目的^[18-19]。虽然 CRISPR-Cas9 技术在核基因组编辑方面取得了重大的突破,但是其在线粒体基因组编辑方面仍然具有挑战。本团队对此作出了一些尝试:将线粒体靶向的信号肽与来自金黄色葡萄球菌的 Cas9 (mito-SaCas9) 融合,发现 mito-SaCas9 诱导的线粒体双链断裂修复途径,在线粒体微同源区域进行切割后可以重组,重组子可以稳定遗传给子代细胞。通过联合使用多重 sgRNA 和双链断裂修复的小分子抑制剂,可以显著提高编辑效率,这为线粒体疾病的治疗提供了新思路^[20]。另外,该研究也提示,线粒体基因组经过切割后,仍然可能存活下来,不是传统理论认为的线粒体切割编辑后,带有编辑产物的线粒体无法存活。但是,由于 sgRNA 不能被高效导入线粒体中,这使 CRISPR/Cas 技术无法有效地用于线粒体基因组编辑^[21]。因此,新的 mtDNA 编辑工具的开发成为基础研究和临床治疗的重大需求。

4 基于 DdCBE 编辑线粒体基因组

双链 DNA 脱氨酶毒素 A (DddA) 被发现可以用于编辑线粒体基因。DddA 可以催化双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 中的 C 转为 T。为了避免 DddA 的毒性,将 DddA 分割为 DddAtox-N 和 DddAtox-C。同时,利用转录激活因子类效应因子 (transcription activator-like effectors, TALE) 来识别靶

序列,引入尿嘧啶糖基化酶抑制剂 (uracil glycosylase inhibitor, UGI) 提高编辑效率,这样产生了无 RNA 的 DddA 衍生的胞嘧啶碱基编辑器 (RNA-free DddA-derived cytosine base editors, DdCBEs)。对 mtDNA 上的 5 个基因进行了单碱基编辑,结果显示编辑效率为 4.6%~49%。另外,通过 DdCBE 成功构建了携带 mtDNA 致病点突变的细胞模型 (*MT-ND4, m.11922 G>A*),并证明细胞模型能够产生对应的疾病表型^[22]。

围绕 DdCBEs 效率的验证和优化研究,有多个相关工作进行了报道。这些包括将 DdCBE 信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 注入人受精卵、2-细胞、4-细胞和 8-细胞时期的胚胎中,证实 DdCBE 可以诱导人类胚胎线粒体 DNA 中产生点突变,并且在 8 细胞时期的胚胎中效率最高^[23]。将其 mRNA 注射到人类 3PN (3 pronucleus) 胚胎细胞质中,可编辑 mtDNA 上两个致病性突变位点 *ND1* 和 *TRNK* (具体突变为 *G3733A*、*G8363A*)。其编辑效率分别为 3.67%~37.54%、21.56%~44.54%,且旁观者突变 (bystander mutations) 均较低^[24]。利用 AAV 进行在体递送 DdCBE (靶向 *ND3*) 到成年小鼠和新生小鼠心脏组织线粒体中,其对 C₁₂ 和 C₁₃ 的编辑效率分别为 1%~2%、10%~20%^[25]。为了模拟人 mtDNA 致病突变 (*G8363A*、*G3733A* 和 *G13513A*),研究者设计了针对斑马鱼的 DdCBE 载体,并在 HEK-293FT 细胞中进行了 DdCBE 筛选。通过在斑马鱼受精卵上注射 MTS-DdCBE 对应的 mRNA,成功构建了携带目标突变的个体,突变率可达 88.32%。另外,这些突变可以通过雌鱼传递给子代^[26]。在植物线粒体和叶绿体研究中,利用 DdCBE 在生菜或油菜愈伤组织中进行测试,发现碱基编辑的诱导效率在线粒体中可达 25%,在叶绿体中可达 38%。此外,研究者还通过向生菜原生质体递送 DdCBE 对应的 mRNA 来实现叶绿体基因组碱基编辑,以避免 DdCBE 质粒引起的脱靶突变。通过编辑生菜叶绿体 16S rRNA 基因,使得生菜愈伤组织和植株对链霉素和壮观霉素产生抗性,这些愈伤和植株的编辑效率可达 99%^[27]。

对于 DdCBE 的优化,通过噬菌体辅助连续进化 (phage-assisted continuous evolution, PACE) 和噬菌体辅助非连续进化 (phage-assisted non-continuous evolution, PANCE) 技术进行了定向进化。早期的 DdCBE 有严格的序列偏好,导致 DdCBE 主要限于对 TC 位点的编辑,定向进化获得的 DddA6 和 DddA11

的 DdCBE 对 TC 位点的 mtDNA 碱基编辑效率平均提高了约 4.3 倍。其中 DddA11 对靶序列编辑更加广泛, 能对 TC、AC、CC 位点进行更高效的编辑。此外, 将进化的碱基编辑器的线粒体信号肽替换为细胞核信号肽后, 改造的编辑器能对细胞核 DNA 进行高效的碱基编辑^[28]。

关于 DdCBE 脱靶, 利用 GOT1 (genome-wide off-target analysis by two-cell embryo injection) 系统和全基因组测序分析 (whole-genome sequencing, WGS) 来评估 DdCBE 对 mtDNA 和核 DNA 修饰的脱靶效应, 发现靶向编辑的两个不同位点 (*G12918A*、*C12336T*) 的 DdCBE, 在线粒体上其脱靶编辑小于 5%, 但在核基因组上分别产生了 1 500 个和 1 000 个单核苷酸突变体 (single-nucleotide variant, SNV)。在核基因组和 mtDNA 上, 脱靶编辑都呈现紧挨 T 的 C 碱基编辑效率高的现象。这些结果提示, 线粒体靶向序列 (mitochondrial targeting sequence, MTS) 不能阻止 DdCBE 进入细胞核, 编辑过程中导致严重的脱靶效应^[29]。另外, 利用 Detect-seq (dU-detection enabled by C to T transition during sequencing) 技术对人类 HEK-239T 细胞系核基因组脱靶编辑进行了全面评估: 发现了 TAS 依赖型 (TALE array sequence (TAS)-dependent) 和 TAS 非依赖型 (TAS-independent) 的脱靶; 发现 DdCBE 碱基编辑工具与维持基因组三维结构的重要蛋白 CTCF (CCCTC binding factor) 有相互作用。该研究也提示 DdCBE 线粒体碱基编辑器在核基因组中诱导大量的脱靶编辑^[30]。基于该问题, 利用多种方法对其进行了优化, 包括使用核输出信号 (nuclear export-signal, NES) 使 DdCBE 不定位在细胞核中; 使用核定位的 DddIA 抑制核内 DdCBE 的核基因组编辑活性; 寻找低核基因组编辑活性的 DdCBE 突变体。这些提示, DdCBE 医学应用仍然存在一定的安全隐患。

以上碱基编辑研究都是 C 到 T 碱基转换的编辑, 最近有报道新型线粒体基因编辑工具转录激活因子样效应物相关脱氨酶 (TALED), 在线粒体基因组精准编辑工具 DdCBE 的基础上, 进一步结合 tRNA 腺嘌呤脱氨酶 (TadA) 的研究成果, 实现了人类 mtDNA 中 A 到 G 碱基的转换^[31]。研究者设计了 Split TALED (sTALED)、Monomeric TALED (mTALED) 和 Dimeric TALED (dTALED) 三种不同的 TALED, 可以对 mtDNA 不同位点进行灵活的编辑。TALED 技术的发明大大扩展了 mtDNA 碱基编辑的范围。与 DdCBE 不同, TALED 不依赖于 5'-TC 位点且没

有明显的细胞和 mtDNA (nDNA) 基因组毒性。考虑到线粒体致病点突变 G>A 比较常见, TALEDs 有望成为修复这类突变的强有力的工具, 为线粒体基因功能解析和基因治疗应用奠定基础。

5 线粒体基因组编辑的展望

因为点突变作为最重要的线粒体基因组突变类型, 所以利用高编辑活性和高特异性的碱基编辑工具将能够实现直接特异修复线粒体基因组突变的目的, 这样以 DdCBE 和 TALED 为代表的新型碱基编辑工具在线粒体疾病治疗领域将发挥重要的作用。目前活性和脱靶问题仍然是线粒体基因组编辑从实验室走向临床的重要影响因素。特别是活性问题, 因为如果没有足够的活性, 基于编辑工具来建立动物疾病模型仍然与患者的遗传突变情况有很大的差异, 而合适动物疾病模型的缺乏是线粒体疾病研究的重要瓶颈问题之一。高效靶向递送系统也是基因治疗中必须考虑的问题。目前基于 TALE 来靶向线粒体基因组, 仍然存在使用起来繁琐等缺点, 因为其原理是工程化的蛋白质和靶 DNA 的识别。这和 CRISPR/Cas 基于 RNA-DNA 识别原理不同。作为基因编辑工具, 不管是临床治疗还是基础研究, 操作简便、高效、高保真是基因编辑工具的“生命力”。另外, 线粒体基因组插入/缺失突变和碱基颠换突变对应的修复也是临床重大需求, 开发类似 prime editor 的技术用于该类突变的修复^[32], 对于完善基因编辑工具箱也是十分必要的。线粒体的 DNA 复制、修复的基础生物学相关机制的阐明, 对于开发相关的工具也是非常重要。总之, 随着基因编辑工具的不断改造与优化, 特别是如果能够解决 CRISPR/Cas 进入线粒体等重要瓶颈问题, 相信基因编辑作为新型分子治疗方法将在人类线粒体遗传病治疗上谱写新的篇章。

[参 考 文 献]

- [1] Muñoz-Gómez SA, Wideman JG, Roger AJ, et al. The origin of mitochondrial cristae from *Alphaproteobacteria*. *Mol Biol Evol*, 2017, 34: 943-56
- [2] Gray MW. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4: a011403
- [3] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290: 457-65
- [4] Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol*, 2015, 77: 753-9
- [5] Hyslop LA, Blakeley P, Craven L, et al. Towards clinical

- application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease. *Nature*, 2016, 534: 383-6
- [6] Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature*, 2013, 493: 627-31
- [7] Paull D, Emmanuele V, Weiss KA, et al. Nuclear genome transfer in human oocytes eliminates mitochondrial DNA variants. *Nature*, 2013, 493: 632-7
- [8] Wang T, Sha H, Ji D, et al. Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases. *Cell*, 2014, 157: 1591-604
- [9] Baertling F, Rodenburg RJ, Schaper J, et al. A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2014, 85: 257-65
- [10] Lake NJ, Compton AG, Rahman S, et al. Leigh syndrome: one disorder, more than 75 monogenic causes. *Ann Neurol*, 2016, 79: 190-203
- [11] Zhang J, Liu H, Luo S, et al. Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reprod Biomed Online*, 2017, 34: 361-8
- [12] Ma H, Dyken CV, Darby H, et al. Germline transmission of donor, maternal and paternal mtDNA in primates. *Hum Reprod*, 2021, 36: 493-505
- [13] Yamada M, Akashi K, Ooka R, et al. Mitochondrial genetic drift after nuclear transfer in oocytes. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 5880
- [14] Fan XY, Guo L, Chen LN, et al. Reduction of mtDNA heteroplasmy in mitochondrial replacement therapy by inducing forced mitophagy. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6: 339-50
- [15] Reddy P, Ocampo A, Suzuki K, et al. Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. *Cell*, 2015, 161: 459-69
- [16] Bacman SR, Kauppila JHK, Pereira CV, et al. MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA^{Ala} levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nat Med*, 2018, 24: 1696-700
- [17] Gammage PA, Viscomi C, Simard ML, et al. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation *in vivo*. *Nat Med*, 2018, 24: 1691-5
- [18] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420-4
- [19] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551: 464-71
- [20] Wang B, Lv X, Wang Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis at microhomologous regions of human mitochondrial genome. *Sci China Life Sci*, 2021, 64: 1463-72
- [21] Gammage PA, Moraes CT, Minczuk M. Mitochondrial genome engineering: the revolution may not be CRISPR-ized. *Trends Genet*, 2018, 34: 101-10
- [22] Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature*, 2020, 583: 631-7
- [23] Wei Y, Xu C, Feng H, et al. Human cleaving embryos enable efficient mitochondrial base-editing with DdCBE. *Cell Discov*, 2022, 8: 7
- [24] Chen X, Liang D, Guo J, et al. DdCBE-mediated mitochondrial base editing in human 3PN embryos. *Cell Discov*, 2022, 8: 8
- [25] Silva-Pinheiro P, Nash PA, Haute LV, et al. *In vivo* mitochondrial base editing via adeno-associated viral delivery to mouse post-mitotic tissue. *Nat Commun*, 2022, 13: 750
- [26] Guo J, Zhang X, Chen X, et al. Precision modeling of mitochondrial diseases in zebrafish via DdCBE-mediated mtDNA base editing. *Cell Discov*, 2021, 7: 78
- [27] Kang BC, Bae SJ, Lee S, et al. Chloroplast and mitochondrial DNA editing in plants. *Nat Plants*, 2021, 7: 899-905
- [28] Mok BY, Kotrys AV, Raguram A, et al. CRISPR-free base editors with enhanced activity and expanded targeting scope in mitochondrial and nuclear DNA. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 1378-87
- [29] Wei Y, Li Z, Xu K, et al. Mitochondrial base editor DdCBE causes substantial DNA off-target editing in nuclear genome of embryos. *Cell Discov*, 2022, 8: 27
- [30] Lei Z, Meng H, Liu L, et al. Mitochondrial base editor induces substantial nuclear off-target mutations. *Nature*, 2022, 606: 804-11
- [31] Cho SI, Lee S, Mok YG, et al. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases. *Cell*, 2022, 185: 1764-76.e12
- [32] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149-57