Локалізація та транслокація зрілих мікроРНК

For citation: Zdorov'e Rebenka. 2021;16(7):498-507. doi: 10.22141/2224-0551.16.7.2021.244583

Резюме. У науковому огляді наведені шляхи ядерного імпорту та експорту мікроРНК у клітині. Авторами надана чітка та доступна схема транслокації мікроРНК у клітині. У статті відображено, що основним місцем локалізації в цитоплазмі клітини комплексу RISC і його компонентів, у тому числі і мікроРНК, є процесингові Р-тіліця. Автори наводять факт того, що і протеїни Argonaute — сигнатурні компоненти ефекторного комплексу інтерференції РНК RISC локалізуються в Р-тіліцях ссавців. Відомо, що протеїни родини каріоферинів опосередковують транслокацію міRISC в ядро клітини. Дані протеїни розпізнають послідовності ядерної локалізації в амінокислотних послідовностях протеїнів й активно транспортують дані протеїни через пори ядерної мембрани клітини. Підкреслено, що, крім неселективних механізмів ядерного імпорту мікроРНК, існують і транспортні механізми, які переносять певні мікроРНК через мембрану клітини. Наведені деякі мікроРНК, що переважно локалізуються в ядрі певного типу клітин. Науковці вважають, що значна частина мікроРНК ядра сконцентрована в полісомах. Експорт мікроРНК ядерного пулу в цитоплазму клітини відбувається за допомогою експортину-1. Таким чином, в цитоплазмі клітини накопичуються зрілі форми мікроРНК, частина з яких транслокується в ядро клітини або в екстрацелюлярний простір. Складання комплексу міRISC здійснюється в цитоплазмі клітини, і тільки після формування комплексу відбувається його імпорт в ядро клітини. Спектр екзосомасоційованих мікроРНК може бути високозначущим діагностичним критерієм для деяких нозологій, а екзосоми, що містять певні мікроРНК, можуть використовуватися для цілеспрямованої терапії конкретних захворювань. Для написання статті здійснювався пошук інформації з використанням баз даних Scopus, Web of Science, MedLine, PubMed, Google Scholar, EMBASE, Global Health, The Cochrane Library, CyberLeninka.

Ключові слова: мікроРНК; транслокація мікроРНК; Р-тіліця; локалізація мікроРНК; РНК-індукований сайленсинговий комплекс; огляд

Вступ

Зрілі форми мікроРНК накопичуються в цитоплазмі клітини, частина з яких транслокується в ядро клітини або в екстрацелюлярний простір. Частина ядерних мікроРНК реекспортується з ядра клітини в цитоплазму, де разом з іншими цитоплазматичними мікроРНК поступово піддається деградації [39].

Шляхи ядерного імпорту та експорту мікроРНК у клітині наведені на рис. 1.

Цитоплазматична локалізація зрілих мікроРНК

Основним місцем локалізації в цитоплазмі клітини комплексу RISC і його компонентів, у тому числі і мікроРНК, є процесингові Р-тіліця (processing

bodies — P-bodies) [39]. Дані цитоплазматичні утворення — Р-тіліця являють собою цитоплазматичні рибонуклеопротейідні гранули, які в основному складаються з трансляційних репресованих мРНК і протеїнів, що пов'язані з деградацією мРНК (рис. 2) [24, 36, 55].

Цікавим є те, що і протеїни Argonaute — сигнатурні компоненти ефекторного комплексу інтерференції РНК RISC локалізуються в Р-тіліцях ссавців. Репортерні мРНК, що пов'язані з міR, концентруються в Р-тіліцях мікроРНК-залежним способом [55].

Результати різних досліджень, що проведені з використанням різних біохімічних технологій, включаючи конфокальну імуофлуоресцентну мікроскопію, субклітинне фракціонування та імуопреципітацію, показали, що протеїн AGO2 і мікроРНК, крім Р-тіліць

і цитоплазми клітини, розташовуються в різних клітинних органелах, включаючи ендоплазматичний ретикулум (ЕПР), апарат Гольджі, мітохондрії, лізосоми й ендосоми. Вважають, що зародження комплексу RISC, завантаження, а також нарізка мРНК, найімовірніше, відбуваються на мембранах ЕПР. Згідно з результатами часового аналізу репортерних конструкцій, що експресуються в клітинах HEK-293, синтезовані *de novo* мРНК, що знаходяться в трансляційній репресії, колокалізуються як із полісомами, пов'язаними з ендоплазматичним ретикуломом, так і з комплексом miRISC. Колокалізація протеїнів AGO, мікроРНК і полісом свідчить про те, що miRISC безпосередньо діє на мРНК, що активно транскрибуються [38, 39]. Цілком імовірно, завантаження RISC і блокування мРНК переважно відбуваються на мембрані ЕПР [61], а в подальшому комплекс miRISC транспортується в Р-тіліця, де відбувається деградація мРНК-мішеней, або на ендосомній мембрані, де відбувається розвантаження miRISC [39].

Імпорт мікроРНК в ядро клітини

Деякі мікроРНК можуть переміщатися в ядро. Транслокацію miRISC в ядро клітини опосередковують протеїни родини каріоферинів, які розпізнають послідовності ядерної локалізації (nuclear localization sequences — NLS) в амінокислотних послідовностях протеїнів й активно транспортують дані протеїни через пори ядерної мембрани клітини. Інформація про субклітинну локалізацію РНК, у тому числі про мікроРНК, що локалізовані в ядрі, наведена в базі да-

них RNALocate (<http://www.rna-society.org/rnallocate/>) [77]. У переміщенні мікроРНК в ядро клітини бере участь кілька механізмів. Так, встановлено, що зрілі мікроРНК, пов'язані з протеїнами AGO2, можуть бути імпортовані за допомогою імпортину-8 в ядро клітини [72]; зрілі мікроРНК, пов'язані з протеїнами TNRC6, перетинають ядерну пору за допомогою імпортину-β [57]. Не виключено, що протеїни AGO2 і TNRC6A, колокалізуючись у Р-тіліцях, утворюють комплекс, здатний зв'язуватися з комплексом пір ядерної мембрани (nuclear pore complex — NPC) [43].

Крім неселективних механізмів ядерного імпорту мікроРНК, існують і транспортні механізми, які переносять певні мікроРНК через мембрану клітини [25]. Так, показано, що гексануклеотидний елемент (AGUGUU) на 3'-кінці молекули miR-29b відповідає за його селективну ядерну локалізацію в клітинах HeLa. Дійсно, транслокація даного мотиву на інші малі РНК дозволяє їм акумулюватися в ядрі клітини [22].

Ядерна локалізація мікроРНК

Результати наукових досліджень останнього часу показали, що комплекси miRISC, їх компоненти та партнери (AGO, DICER, TRBP, TNRC6) наявні в ядрах клітин ссавців [15]. Keith T. Gagnon і співавтори [15] продемонстрували, що близько 75 % спектра зрілих клітинних мікроРНК можуть бути наявні як в ядрі, так і в цитоплазмі клітини. Однак загалом представництво практично будь-яких мікроРНК у цитоплазмі в два-чотири рази перевищує таке в ядрі клітини. Виняток становлять miR-25 і miR-92a, які переважно акумулю-

Рисунок 1. Транслокація мікроРНК у клітині

ються в ядрі клітини. Деякі мікроРНК переважно локалізуються в ядрі певного типу клітин (miR-29b, miR-1, miR-15, miR-32 і інші) (табл. 1) [50].

Значна частина мікроРНК ядра сконцентрована в полісомах [47]. Pablo Reyes-Gutierrez і співавтори [49] припускають, що мікроРНК зв'язуються з деякими мішенями мРНК у полісом перед їх експортом у цитоплазму.

Експорт мікроРНК з ядра клітини

МікроРНК ядерного пулу реекспортується в цитоплазму клітини за допомогою експортину-1 [33, 43, 45].

Екстрацелюлярні мікроРНК

Сьогодні встановлена наявність мікроРНК як в екстрацелюлярному просторі, так і практично у всіх відомих рідинах організму, включаючи сироватку крові, слюзи, сину, сечу, грудне молоко, амніотичну, спинномозкову рідину, сперму. Було показано, що завдяки асоціації з різними носіями дані позаклітинні (так звані циркулюючі) мікроРНК є надзвичайно стабільними структурами [38, 39]. Екстрацелюлярні мікроРНК переважно асоційовані з екстрацелюлярними везикулами (extracellular vesicles — EV). Необхідно відзначити, що мікроРНК можуть переноситися з клітин-донорів

у клітини-реципієнти не тільки за допомогою екзосом, ектосом, апоптотичних тілець, але і ліпопротеїнів високої та низької щільності і таких рибонуклеопротеїнів, як нуклеофосмін-1 та AGO2 [64]. МікроРНК діють не тільки в клітині продуцента, а і, вивільняючи з клітини-продуцента в люміні EV, вони досягають інших клітин (клітини-реципієнти) організму і регулюють у них активність трансляції таргетних мРНК або взаємодіють із певними рецепторами [7, 54]. Гепатоцити, зірчасті клітини печінки (hepatic stellate cell — HSC), стовбурові клітини печінки людини, печінкові дендритні клітини, епітеліальні клітини печінки і жовчовивідних шляхів (включаючи холангіоцити) здатні вивільняти і поглинати EV [40].

Екстрацелюлярні везикули різного походження характеризуються особливостями розподілу в різних тканинах організму. Так, 44,9 % еритроцитарних EV поглинаються клітинами печінки, 22,5 % — клітинами шкіри, 9,7 % — міоцитами, 3,4 % — клітинами селезінки, 2,7 % — клітинами нирок і 1,8 % — клітинами легенів [73], тоді як EV меланоми поглинаються переважно клітинами легенів і селезінки [62]. Біорозподіл EV залежить від спектра адгезивних лігандів (інтегринів, молекул адгезії та ін.), що представлені на їх поверхні. Так, встановлено, що $\alpha 2,3$ -пов'язані сіалові кислоти поверхні EV зв'язуються з CD169 (сіалоадгезином SIGLEC1) макрофагів селезінки і лімфовузлів [56]; β -галактозида ретикулоцитарних EV взаємодіють із галектином-5 макрофагів [3], лектини С-типу EV розпізнаються лектиновими рецепторами дендритних клітин [19].

Екстрацелюлярні везикули, що містять мікроРНК

Основними носіями циркулюючих мікроРНК є EV, які вивільняються з клітин-продуцентів. МікроРНК, використовуючи EV, транспортуються в клітини-реципієнти. Позаклітинно розташовані мікроРНК викликають клітинні ефекти, безпосередньо взаємодіючи з мембранними рецепторами клітин-мішеней або змінюють активність трансляції генів-мішеней в клітинах-реципієнтах, які поглинають мікроРНК і EV, що несуть мікроРНК [18].

Екстрацелюлярні везикули виявляються в усіх рідинах організму: крові, сироватці, грудному молоці, слині, сечі та ін. [4, 18]. Вміст циркулюючих EV залежить від співвідношення між активністю вивільнення і

Рисунок 2. Молекулярна організація Р-тілець [36]

Примітки: А. Взаємодія між протеїнами Р-тілець. Критично важливі для складання Р-тілець компоненти забарвлені в чорний колір. Компоненти, що безпосередньо взаємодіють із мРНК, забарвлені в сірий колір. Безперервні чорні лінії відображають прямі білково-білкові взаємодії; пунктирні чорні лінії — непряму або передбачувану взаємодію; сірі лінії — виянок одночасного співіснування в Р-тілці. В. Просторове розташування протеїнів і мРНК у процесі міжмолекулярних взаємодій.

швидкістю їх деградації. Період напіврозпаду штучно введених у кровоносне русло очищених екзогенних EV дуже короткий і становить приблизно 10 хвилин [74].

Спільною рисою для всіх EV є ліпідна бішарова мембрана, що оточує конкретні біомолекули (рис. 3) [37].

У EV містяться транскрипти різних РНК: мРНК, довгі нкРНК і малі нкРНК, у тому числі і мікроРНК. Згідно з даними дослідження спектра РНК, які локалізуються в екзосомах різних клітин, у людських тучних (МС/9) клітинах міститься близько 1300 [66], в ендотеліальних клітинах — практично 1992 [12], і в кардіоміоцитах — приблизно 1520 різних РНК-транскриптів, включаючи мікроРНК [70].

Felix Royo та співавтори [52] продемонстрували, що EV, що вивільняються первинними гепатоцитами, містять транскрипти більше ніж 1300 різних РНК, а EV, що вивільняються гепатоцитоподібними клітинами MLP29 печінки плода, містять транскрипти 6500 різних РНК. Позаклітинні везикули, що секретуються гепатоцитами та знаходяться в різному стані, містять різні спектри РНК. Позаклітинні везикули активованих гепатоцитів можуть бути залучені в активацію зірчастих клітин печінки. Вивільнені гепатоцитом EV є метаболічно активними агентами, які беруть участь у регуляції оксидативного стресу і функціональної активності ендотелію [51].

Приклади РНК-транскриптів, що асоційовані з EV, наведені в табл. 2.

Профілі вмісту мікроРНК в EV дозволяють визначати клітинне походження EV [75].

Серед EV залежно від походження розрізняють: екзосоми, що являють собою натуральні позаклітинні круглі везикули ендосомного походження з діаметром від 30 до 150 нм; ектосоми (мікропухирці), які є везикулами, що утворені клітинною мембраною з діаметром в 100–500 нм; апоптотичні тільца з діаметром в 100–5000 нм (рис. 4). Особливо, через патогенетичне значення в розвитку неоплазм, виділяють онкосоми — везикули, що містять онкогенні протеїни [6, 42].

Екзосоми являють собою невеликі мембранні везикули ендоситарного походження. Щільність екзосом варіює від 1,10 до 1,21 г/мл, і загальновизнаними маркерами екзосом є наявність протеїнів Alix, TSG101 (tumorigen susceptibility 101), тетраспанінів і шаперонів. Ектосоми — це великі EV цитоплазматичного походження, маркерами яких є селектини, ліганд CD40. Апоптотичні тільца є фрагментами апоптичних клітин. Характерною рисою ектосом й апоптотичних тілец є високий вміст фосфатидилсерину в зовнішньому ліпідному шарі мембрани [74]. Дані, що містять відомості про ідентифіковані класи EV, включаючи екзосоми, ектосоми, апоптотичні тільца, великі щільні

Таблиця 1. МікроРНК, що локалізовані переважно в ядрі певних типів клітин [33]

Тип клітин	МікроРНК
L6 міобласти щура	miR-1, miR-21, miR-206, miR-351, miR-494, miR-664
5–8F клітини карциноми носоглотки людини (human nasopharyngeal carcinoma — NPC)	miR-339
HCT116 клітини колоректальної карциноми людини	miR-16, miR-19b, miR-29b, miR-29c, miR-195, miR-200b, miR-222
Клітини моноцитарної лейкемії людини (THP-1)	miR-15b, miR-16, miR-374b
C57BL/6 J клітини печінки миші	miR-30e, miR-122, miR-690, miR-709, miR-805
Первинні коркові нейрони щура	miR-25, miR-27a, miR-92a, miR-92b, miR-126, miR-133b, miR-143, miR-328a, miR-365
Клітини HeLa	miR191, miR-484, miR-574-3p, miR-193b
Мієлоїдні клітини миші (промієлоцити, мієлоцити і гранулоцити)	miR-135a, miR-467a, miR-690, miR-706, miR-709, miR-142-3p

Таблиця 2. РНК-транскрипти, що асоційовані з EV [26]

Блок-кодуєчі РНК	
мРНК	NEFL, APP, SNCA, DJ-1/PARK7, Fractalkine/CX3CL1, PCA3, TMPRSS2: ERG, Tau/MAPT
Некодуєчі РНК	
МікроРНК	miR-409-3p, miR-1, let-7g-3p, miR-10a-5p, miR-16-2, miR-19b-3p, miR-21, miR-29c, miR-132-5p, miR-136-3p, miR-141, miR-153, miR-182, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205, miR-214, miR-331-5p, miR-485-5p
Довгі нкРНК	RP11-462G22.1, PCA3, ENST00000501280, uc010bys.1, uc001agn.1, ENST00000499690, ENST00000453968, G36642, AK055500, HIT000070262, ENST00000452932
цРНК	Circ-CDYL, Circ-CAMSAP1, Circ-EZH2, Circ-FOXK2, Circ-XP01, Circ-KLDHC10

ядерні везикули, мікрочастинки та проливаючі мікропухирці, наведені на ресурсах Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org>), EVpedia (www.evpedia.info) і ExoCarta (www.exocarta.org).

Протягом тривалого часу EV розглядалися як «смітєві мішки», які «викидаються» клітинами в позаклітинний простір. У 1998 році дослідники, що працювали під керівництвом Sebastian Amigorena, припустили, що EV відіграють роль «листонош» міжклітинної ко-

мунікації між клітинами імунної системи. Сьогодні вважають, що EV функціонують як основний морфологічний компонент механізмів, що забезпечують дистанційні міжклітинні комунікації, транспортуючи від однієї клітини до інших клітин різні молекулярні месенджери (нуклеїнові кислоти, протеїни і ліпіди) [74, 60]. Широкий і змінний спектр протеїнового та нуклеїнового вмісту EV дозволяє розглядати їх як векторні сигналоми [74].

Рисунок 3. Позаклітинні везикули [37]

Примітка: EV містять кілька типів молекул: протеїни, ліпіди, ДНК, мРНК, довгі нкРНК і малі нкРНК, у тому числі і мікроРНК, деякі з яких специфічні для певних типів клітин.

Рисунок 4. Класифікація екстрацелюлярних везикул залежно від механізму генерації [14]

Примітка: екзосоми генеруються у внутрішньоклітинному просторі з мультивезикулярних тіл. Ектосоми формуються з цитоплазматичної мембрани клітини. Апоптотичні везикули вивільняються при фрагментації клітин під час апоптотичної загибелі клітин.

Екзосомі беруть участь у комунікації між клітинами різного типу. Зокрема, гепатоцити не тільки секретують екзосомі, але також можуть сприймати екзосомі, що вивільнені клітинами інших тканин або органів, і реагувати як на мікроРНК, так і на інші нуклеїнові кислоти і протеїни, що містяться в них [71]. Продемонстровано, що екзосомі, що вивільнені з мезенхімальних стовбурових клітин (mesenchymal stem cell — MSC), мають протизапальну [44], антифібротичну [32], регенеративну дію в тканинах печінки [63].

Екзосомі

Термін «екзосома» був запропонований доктором Роуз Джонстоун (Rose Johnstone) для пояснення секреції везикул при трансформації ретикулоцитів у зрілі еритроцити. Дані невеликі везикули відрізнялися наявністю рецептора трансферину. Оскільки процес везикулярної секреції був аналогічний «зворотному ендоцитозу», дрібні пресовані везикули отримали назву «екзосома» [23]. Сьогодні встановлено, що екзосомі секретують різні типи клітин, включаючи гепатоцити [10], стовбурові клітини [13], макрофаги [78], тучні клітини [69], Т-клітини [34], клітинні лінії В-лімфоцитів [41], дендритні клітини [30], тромбоцити [20], епітеліальні клітини [59], клітини гладких м'язів [48], астроцити [35], нейрони [46] і пухлинні клітини [53, 65], у тому числі і печінки [31].

Утворення та вивільнення екзосом являють собою індукбельні процеси, які керуються кількома сигнальними механізмами. Секреція екзосом ін-

дується порушенням: 1) пуринового рецептора P2X моноцитів і нейтрофілів молекулами АТФ; 2) тромбінового рецептора тромбоцитів тромбіном; 3) рецепторів TLR-4 імуніцитів бактеріальним ліпополісахаридом [5].

Формування екзосом починається з впинання кла-тринасоційованих мікродоменів цитоплазматичної мембрани клітини. У подальшому цитоплазматичні поглиблення перетворюються в ранні ендосоми. Повторне впинання мембрани ранніх ендосом всередину призводить до утворення інтралюмінальних везикул (intraluminal vesicle — ILV). Формування ILV здійснюється за допомогою ендосомального комплексу сортування (endosomal sorting complex required for transport — ESCRT). Мембрани ранніх ендосом відрізняються високим вмістом фосфатидилінозитол-3-фосфату (phosphatidylinositol 3-phosphate — PIP3), що індукє рекрутинг комплексів ESCRT I і ESCRT II. Дані комплекси, використовуючи протеїн Alix, що одночасно зв'язується з компонентом TSG101 комплексу ESCRT I і протеїном 4A мультивезикулярного тільца (charged multivesicular body protein 4A — CHMP4), привертають комплекс сортування ESCRT III. Комплекси ESCRT I і ESCRT II сприяють первинному впинанню мембран всередину ранніх ендосом, а ESCRT III завершує брунькування ILV. Інтралюмінальні везикули акумулюються всередині ендосом, де дозрівають і формують мультивезикулярні тільца (multi-vesicular bodies — MVB), так звані пізні ендосоми. Мультивезикулярні тільца зливаються або з лізосоною, що призводить до деградації їх вмісту, або з цитоплазматичною мембраною, в результаті чого ILV вивільняються в екстрацелюлярний простір і стають екзосомами (рис. 5) [1, 29, 76].

Екзосоми містять безліч різноманітних ендосомаасоційованих протеїнів (включаючи Rab ГТФази, SNARE, анексини і флотилін). Також екзосоми збагачені трансмембранними або ліпідасоційованими екстрацелюлярними протеїнами, цитокінами, холестерином, сфінгомієліном і гексозилцерамідами. Найбільш поширеними екзосомальними білками є анексини,

тетраспаніни (CD9, CD63, CD81, CD82) і білки теплового шоку (Hsp60, Hsp70 і Hsp90) [9, 60]. Екзосоми містять ДНК, мРНК, мікроРНК та інші малі нкРНК [4].

Ектосоми

Термін «ектосома» вперше був запропонований Christoph Hess та співавторами [21] в 1999 році. Ектосоми формуються за рахунок випинання цитоплазматичної мембрани в позаклітинний простір із наступним брунькуванням і вивільненням везикули. Основними механізмами формування ектосом є перерозподіл фосфоліпідів у цитоплазматичній мембрані та скорочення цитоскелета клітини. Асиметричний розподіл фосфоліпідів у цитоплазматичній мембрані регулюється амінофосфоліпідними транслоказами: фліпази переносять фосфоліпіди із зовнішнього на внутрішній, а флопази — від внутрішнього на зовнішній ліпідний шар мембрани. Формування везикул індукється екстерналізацією фосфатидилсерину — його транслокацією на зовнішній ліпідний шар мембрани цитоплазми. Збільшення концентрації фосфатидилсерину на зовнішній стороні мембрани викликає випинання мембрани в міжклітинний простір і, отже, утворення бульбашок. Процес брунькування везикули завершується скороченням актино-міозинових цитоскелетних структур [1].

Ектосоми, аналогічно екзосомам, несуть у собі велику кількість молекул ДНК, мРНК, малих нкРНК, в тому числі і мікроРНК. У той же час на ектосомах представлені глікопротеїни і відсутні рецептори трансферину, тоді як на екзосомах відсутні глікопротеїни і високо представлені рецептори трансферину (рис. 6) [11, 67].

Спектр мікроРНК в екстрацелюлярних везикулах

Екзосомальні мікроРНК вільні від протеїнів Ago2 [2]. Derrick J. Gibbins та співавтори [17] не виявили в екзосомах ні протеїнів Ago, ні мРНК, які є мішенями мікроРНК. Залишається не поясненим механізм вивільнення мікроРНК із комплексу miRISC та їх транслокації в пізні ендосоми (а саме MVB) до вивільнення екзосоми [75].

З огляду на те, що спектр мікроРНК в EV відрізняється від цитоплазматичного спектра мікроРНК, вважають, що існують кілька механізмів завантаження конкретних мікроРНК в EV, які функціонують, використовуючи специфічні мотиви мікроРНК, особливості послідовностей хвоста молекули мікроРНК, цераміди [26].

Так, встановлено, що перенос мікроРНК в екзосоми може відбуватися за допомогою сумоїльованого гетерогенного ядерного рибонуклеопротеїну A2B1 (hnRNPA2B1), що розпізнає специфічний мотив EXOmotif (тетрануклеотид

Рисунок 5. Генерація екзосом [1]

Рисунок 6. Архітектура екзосоми і ектосоми [42]
Примітка: будова екзосом й ектосом переважно відрізняється особливостями мембрани і спектром мембраноасоційованих протеїнів. Так, мембрани екзосом збагачені трансмембранними тетраспанінами, які відіграють критичну роль у взаємодії з мембранними й екстрацелюлярними протеїнами. У той же час мембрана ектосом асоційована з різноманітними рецепторами, глікопротеїнами і металопротеїназами, а молекула міжклітинної адгезії ICAM-1, мабуть, наявна виключно на мембрані екзосом. У центрі люмена обох типів EV містяться всі три типи нуклеїнової кислоти.

GGAG) у послідовності мікроРНК і контролює завантаження даних мікроРНК в EV. Продemonстровано, що концентрації деяких мікроРНК, які несуть EXOmotif (miR-575, miR-451, miR-125a-3p, miR-198, miR-601 і miR-877), значно вищі в EV, особливо в екзосомах, ніж у цитоплазмі клітини, і в той же час рівень вмісту інших мікроРНК, які не мають EXOmotif (miR-17, miR-29a, let-7a, miR-142-3p, miR-181a, і miR-18a), більш високий у цитоплазмі клітини [68].

МікроРНК із 3'-термінальними аденозиновими залишками переважно залишаються у внутрішньому континуумі клітини, а мікроРНК із 3'-термінальними уридиновими залишками в основному транслюкуються в EV [27].

Установлено, що гальмування синтезу кераміду в клітинах HEK293 супроводжується вірогідним зменшенням вмісту ендогенної miR-16 й екзогенної miR-146a в ізольованих екзосомах [28].

Порушення вивільнення з клітин екзосом, які містять мікроРНК, може призвести до таких змін спектра мікроРНК, які спричиняють розвиток патологічного процесу [79].

Необхідно відзначити, що збагачення EV мРНК може мати високоселективний характер. Так, припускають, що консенсусна послідовність у 3'UTR ділянці низки мРНК функціонує як послідовність zipcode

(zipcode), яка націлює мРНК на EV, подібно EXOmotif мікроРНК. Даний zipкод складається з 25-нуклеотидної послідовності, що містить короткий домен CTGCC у структурі стеблової петлі, що містить сайт зв'язування з miR-1 289 [8, 16].

Висновки

Таким чином, в цитоплазмі клітини накопичуються зрілі форми мікроРНК, частина з яких транслокується в ядро клітини або в екстрацелюлярний простір. Складання комплексу miRISC здійснюється в цитоплазмі клітини, і тільки після формування комплексу відбувається його імпорт в ядро клітини. Спектр екзосом-асоційованих мікроРНК може бути високозначущим діагностичним критерієм для деяких нозологій, а екзосоми, що містять певні мікроРНК, можуть використовуватися для цілеспрямованої терапії конкретних захворювань.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів та особистої фінансової зацікавленості при підготовці даної статті.

References

1. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 2013 May;113(1):1-11. doi:10.1007/s11060-013-1084-8.
2. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 22;108(12):5003-8. doi:10.1073/pnas.1019055108.
3. Barrès C, Blanc L, Bette-Bobillo P, et al. Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood.* 2010 Jan 21;115(3):696-705. doi:10.1182/blood-2009-07-231449.
4. Bayraktar R, Van Roosbroeck K, Calin GA. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Mol Oncol.* 2017 Dec;11(12):1673-1686. doi:10.1002/1878-0261.12144.
5. Bhatnagar S, Schorey JS. Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J Biol Chem.* 2007 Aug 31;282(35):25779-89. doi:10.1074/jbc.M702277200.
6. Bhome R, Del Vecchio F, Lee GH, et al. Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. *Cancer Lett.* 2018 Apr 28;420:228-235. doi:10.1016/j.canlet.2018.02.002.
7. Blandford SN, Galloway DA, Moore CS. The roles of extracellular vesicle microRNAs in the central nervous system. *Glia.* 2018 Nov;66(11):2267-2278. doi:10.1002/glia.23445.
8. Bolukbasi MF, Mizrak A, Ozdener GB, et al. miR-1289 and "Zipcode"-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2012 Feb 7;1(2):e10. doi:10.1038/mtna.2011.2.
9. Carretero-González A, Otero I, Carril-Ajuria L, de Velasco G, Manso L. Exosomes: Definition, Role in Tumor Development and Clinical Implications. *Cancer Microenviron.* 2018 Jun;11(1):13-21. doi:10.1007/s12307-018-0211-7.
10. Chen L, Chen R, Kemper S, Cong M, You H, Brigstock DR. Therapeutic effects of serum extracellular vesicles in liver fibrosis. *J Extracell Vesicles.* 2018 Apr 17;7(1):1461505. doi:10.1080/20013078.2018.1461505.

11. da Silveira JC, de Ávila ACFCM, Garrett HL, Bruemmer JE, Winger QA, Bouma GJ. Cell-secreted vesicles containing microRNAs as regulators of gamete maturation. *J Endocrinol.* 2018 Jan;236(1):R15-R27. doi:10.1530/JOE-17-0200.
12. de Jong OG, Verhaar MC, Chen Y, et al. Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J Extracell Vesicles.* 2012 Apr 16;1. doi:10.3402/jev.v1i0.18396.
13. Deng H, Sun C, Sun Y, et al. Lipid, Protein, and MicroRNA Composition Within Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Cell Re-program.* 2018 Jun;20(3):178-186. doi:10.1089/cell.2017.0047.
14. Devhare PB, Ray RB. Extracellular vesicles: Novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis. *Mol Aspects Med.* 2018 Apr;60:115-122. doi:10.1016/j.mam.2017.11.001.
15. Gagnon KT, Li L, Chu Y, Janowski BA, Corey DR. RNAi factors are present and active in human cell nuclei. *Cell Rep.* 2014 Jan 16;6(1):211-21. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.013.
16. Gallagher C, Ramos A. Joining the dots - protein-RNA interactions mediating local mRNA translation in neurons. *FEBS Lett.* 2018 Sep;592(17):2932-2947. doi:10.1002/1873-3468.13121.
17. Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol.* 2009 Sep;11(9):1143-9. doi:10.1038/ncb1929.
18. Groot M, Lee H. Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases. *Cells.* 2020 Apr 22;9(4):1044. doi:10.3390/cells9041044.
19. Hao S, Bai O, Li F, Yuan J, Laferte S, Xiang J. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity. *Immunology.* 2007 Jan;120(1):90-102. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02483.x.
20. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost.* 2015 Dec;13(12):2141-51. doi:10.1111/jth.13147.
21. Hess C, Sadallah S, Hefti A, Landmann R, Schifferli JA. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol.* 1999 Oct 15;163(8):4564-73.
22. Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science.* 2007 Jan 5;315(5808):97-100. doi:10.1126/science.1136235.
23. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987 Jul 5;262(19):9412-20.
24. Kamenska A, Simpson C, Vindry C, et al. The DDX6-4E-T interaction mediates translational repression and P-body assembly. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jul 27;44(13):6318-34. doi:10.1093/nar/gkw565.
25. Katahira J, Yoneda Y. Nucleocytoplasmic transport of microRNAs and related small RNAs. *Traffic.* 2011 Nov;12(11):1468-74. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01211.x.
26. Kim KM, Abdelmohsen K, Mustapic M, Kapogiannis D, Gorospe M. RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017 Jul;8(4):10.1002/wrna.1413. doi:10.1002/wrna.1413.
27. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, et al. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* 2014 Sep 25;8(6):1649-1658. doi:10.1016/j.celrep.2014.08.027.
28. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem.* 2010 Jun 4;285(23):17442-52. doi:10.1074/jbc.M110.107821.
29. LeBleu VS, Kalluri R. Exosomes as a Multicomponent Biomarker Platform in Cancer. *Trends Cancer.* 2020 Sep;6(9):767-774. doi:10.1016/j.trecan.2020.03.007.
30. Leone DA, Rees AJ, Kain R. Dendritic cells and routing cargo into exosomes. *Immunol Cell Biol.* 2018 May 24. doi:10.1111/imcb.12170.
31. Li S, Yao J, Xie M, Liu Y, Zheng M. Exosomal miRNAs in hepatocellular carcinoma development and clinical responses. *J Hematol Oncol.* 2018 Apr 11;11(1):54. doi:10.1186/s13045-018-0579-3.
32. Li T, Yan Y, Wang B, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev.* 2013 Mar 15;22(6):845-54. doi:10.1089/scd.2012.0395.
33. Liu H, Lei C, He Q, Pan Z, Xiao D, Tao Y. Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer. *Mol Cancer.* 2018 Feb 22;17(1):64. doi:10.1186/s12943-018-0765-5.
34. Lu J, Wu J, Tian J, Wang S. Role of T cell-derived exosomes in immunoregulation. *Immunol Res.* 2018 Jun;66(3):313-322. doi:10.1007/s12026-018-9000-0.
35. Luarte A, Cisternas P, Caviedes A, et al. Astrocytes at the Hub of the Stress Response: Potential Modulation of Neurogenesis by miRNAs in Astrocyte-Derived Exosomes. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1719050. doi:10.1155/2017/1719050.
36. Luo Y, Na Z, Slavoff SA. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry.* 2018 May 1;57(17):2424-2431. doi:10.1021/acs.biochem.7b01162.
37. Maji S, Matsuda A, Yan IK, Parasramka M, Patel T. Extracellular vesicles in liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017 Mar 1;312(3):G194-G200. doi:10.1152/ajpgi.00216.2016.
38. Makarova J, Turchinovich A, Shkurnikov M, Tonevitsky A. Extracellular miRNAs and Cell-Cell Communication: Problems and Prospects. *Trends Biochem Sci.* 2021 Aug;46(8):640-651. doi:10.1016/j.tibs.2021.01.007.
39. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, et al. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem.* 2016 Nov;51(3-4):33-49. doi:10.1016/j.proghi.2016.06.001.
40. Masyuk AI, Masyuk TV, Larusso NF. Exosomes in the pathogenesis, diagnostics and therapeutics of liver diseases. *J Hepatol.* 2013 Sep;59(3):621-5. doi:10.1016/j.jhep.2013.03.028.
41. McLellan AD. Exosome release by primary B cells. *Crit Rev Immunol.* 2009;29(3):203-17. doi:10.1615/critrevimmunol.v29.i3.20.
42. Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr Biol.* 2018 Apr 23;28(8):R435-R444. doi:10.1016/j.cub.2018.01.059.
43. Nishi K, Nishi A, Nagasawa T, Ui-Tei K. Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. *RNA.* 2013 Jan;19(1):17-35. doi:10.1261/rna.034769.112.
44. Nong K, Wang W, Niu X, et al. Hepatoprotective effect of exosomes from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Cytother-apy.* 2016 Dec;18(12):1548-1559. doi:10.1016/j.jcyt.2016.08.002.
45. Paris Z. Nuclear tRNA export in trypanosomes: a journey full of twists and turns guided by tRNA modifications. *Parasitology.* 2021 Sep;148(10):1219-1222. doi:10.1017/S0031182021000482.
46. Polanco JC, Li C, Durisic N, Sullivan R, Götz J. Exosomes taken up by neurons hijack the endosomal pathway to spread to interconnected neurons. *Acta Neuropathol Commun.* 2018 Feb 15;6(1):10. doi:10.1186/s40478-018-0514-4.

47. Politz JC, Hogan EM, Pederson T. MicroRNAs with a nucleolar location. *RNA*. 2009 Sep;15(9):1705-15. doi:10.1261/rna.1470409.
48. Qiu H, Shi S, Wang S, Peng H, Ding SJ, Wang L. Proteomic Profiling Exosomes from Vascular Smooth Muscle Cell. *Proteomics Clin Appl*. 2018 Sep;12(5):e1700097. doi:10.1002/prca.201700097.
49. Reyes-Gutierrez P, Ritland Politz JC, Pederson T. A mRNA and cognate microRNAs localize in the nucleolus. *Nucleus*. 2014;5(6):636-42. doi:10.4161/19491034.2014.990864.
50. Roberts T.C. The MicroRNA Biology of the Mammalian Nucleus. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 Aug 19;3:e188. doi:10.1038/mtna.2014.40.
51. Royo F, Moreno L, Mleczko J, et al. Hepatocyte-secreted extracellular vesicles modify blood metabolome and endothelial function by an arginase-dependent mechanism. *Sci Rep*. 2017 Feb 17;7:42798. doi:10.1038/srep42798.
52. Royo F, Schlangen K, Palomo L, et al. Transcriptome of extracellular vesicles released by hepatocytes. *PLoS One*. 2013 Jul 11;8(7):e68693. doi:10.1371/journal.pone.0068693.
53. Ruivo CF, Adem B, Silva M, Melo SA. The Biology of Cancer Exosomes: Insights and New Perspectives. *Cancer Res*. 2017 Dec 1;77(23):6480-6488. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0994.
54. Salehi M, Sharifi M. Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. *J Cell Physiol*. 2018 Sep;233(9):6370-6380. doi:10.1002/jcp.26481.
55. Sankaranarayanan M, Emenecker RJ, Jahnel M, et al. The arrested state of processing bodies supports mRNA regulation in early development. *bioRxiv*. 2021;03(16):435709. doi:10.1101/2021.03.16.435709.
56. Saunderson SC, Dunn AC, Crocker PR, McLellan AD. CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood*. 2014 Jan 9;123(2):208-16. doi:10.1182/blood-2013-03-489732.
57. Schraivogel D, Schindler SG, Danner J, et al. Importin-8 facilitates nuclear import of human GW proteins and balances cytoplasmic gene silencing protein levels. *Nucleic Acids Res*. 2015 Sep 3;43(15):7447-61. doi:10.1093/nar/gkv705.
58. Shapouri F, Saeidi S, de Iongh RU, et al. Tob1 is expressed in developing and adult gonads and is associated with the P-body marker, Dcp2. *Cell Tissue Res*. 2016 May;364(2):443-51. doi:10.1007/s00441-015-2328-z.
59. Smythies LE, Smythies JR. Exosomes in the gut. *Front Immunol*. 2014 Mar 17;5:104. doi:10.3389/fimmu.2014.00104.
60. Stahl PD, Raposo G. Exosomes and extracellular vesicles: the path forward. *Essays Biochem*. 2018 May 15;62(2):119-124. doi:10.1042/EBC20170088.
61. Stalder L, Heusermann W, Sokol L, et al. The rough endoplasmic reticulum is a central nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing. *EMBO J*. 2013 Apr 17;32(8):1115-27. doi:10.1038/emboj.2013.52.
62. Takahashi Y, Nishikawa M, Shinotsuka H, et al. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *J Biotechnol*. 2013 May 20;165(2):77-84. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.03.013.
63. Tan CY, Lai RC, Wong W, Dan YY, Lim SK, Ho HK. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem Cell Res Ther*. 2014 Jun 10;5(3):76. doi:10.1186/scrt465.
64. Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*. 2016 Mar 10;164(6):1226-1232. doi:10.1016/j.cell.2016.01.043.
65. Tucci M, Mannavola F, Passarelli A, Stucci LS, Cives M, Silvestris F. Exosomes in melanoma: a role in tumor progression, metastasis and impaired immune system activity. *Oncotarget*. 2018 Apr 17;9(29):20826-20837. doi:10.18632/oncotarget.24846.
66. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654-9. doi:10.1038/ncb1596.
67. Varela-Eirin M, Varela-Vazquez A, Rodríguez-Candela Mateos M, et al. Recruitment of RNA molecules by connexin RNA-binding motifs: Implication in RNA and DNA transport through microvesicles and exosomes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017 Apr;1864(4):728-736. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.02.001.
68. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*. 2013;4:2980. doi:10.1038/ncomms3980.
69. Vukman KV, Försönits A, Oszvald Á, Tóth EÁ, Buzás EI. Mast cell secretome: Soluble and vesicular components. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Jul;67:65-73. doi:10.1016/j.semcdb.2017.02.002.
70. Waldenström A, Genneböck N, Hellman U, Ronquist G. Cardiac myocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One*. 2012;7(4):e34653. doi:10.1371/journal.pone.0034653.
71. Wang S, Wang JQ, Lv XW. Exosomal miRNAs as biomarkers in the diagnosis of liver disease. *Biomark Med*. 2017 May;11(6):491-501. doi:10.2217/bmm-2017-0011.
72. Wei Y, Li L, Wang D, Zhang CY, Zen K. Importin 8 regulates the transport of mature microRNAs into the cell nucleus. *J Biol Chem*. 2014 Apr 11;289(15):10270-10275. doi:10.1074/jbc.C113.541417.
73. Willekens FL, Werre JM, Kruijt JK, et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):2141-5. doi:10.1182/blood-2004-04-1578.
74. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015 May 14;4:27066. doi:10.3402/jev.v4.27066.
75. Yu X, Odenthal M, Fries JW. Exosomes as miRNA Carriers: Formation-Function-Future. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 2;17(12):2028. doi:10.3390/ijms17122028.
76. Zhang J, Li S, Li L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015 Feb;13(1):17-24. doi:10.1016/j.gpb.2015.02.001.
77. Zhang T, Tan P, Wang L, et al. RNALocate: a resource for RNA subcellular localizations. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D135-D138. doi:10.1093/nar/gkw728.
78. Zhang W, Jiang X, Bao J, Wang Y, Liu H, Tang L. Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Functions. *Front Immunol*. 2018 Feb 12;9:90. doi:10.3389/fimmu.2018.00090.
79. Zhu Q, Heon M, Zhao Z, He M. Microfluidic engineering of exosomes: editing cellular messages for precision therapeutics. *Lab Chip*. 2018 Jun 12;18(12):1690-1703. doi:10.1039/c8lc00246k.

Отримано/Received 07.09.2021

Рецензовано/Revised 23.09.2021

Прийнято до друку/Accepted 06.10.2021 ■

Information about authors

A.E. Abaturov, MD, PhD, Professor, Head of the Department of pediatrics 1 and medical genetics, Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0001-6291-5386>.

V.L. Babych, PhD, Assistant at the Department of pediatrics 1 and medical genetics, Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0001-9261-9051>.

Conflicts of interests. Authors declare the absence of any conflicts of interests and their own financial interest that might be construed to influence the results or interpretation of their manuscript.

A.E. Abaturov, V.L. Babych

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine

Localization and translocation of mature miRNAs

Abstract. The scientific review shows the ways of nuclear import and export of miRNAs in the cell. The authors present a clear and accessible scheme of microRNA translocation in the cell. The article shows that the main site of localization in the cytoplasm of cells of the RISC complex and its components, including miRNAs, are processing P-cells. The authors cite the fact that Argonaute proteins — signature components of the effector complex of RISC RNA interference — are localized in mammalian P-bodies. It is shown that proteins of the karyopherin family mediate the translocation of miRISC into the cell nucleus. These proteins recognize nuclear localization sequences (NLS) in the amino acid sequences of proteins and actively transport these proteins through the pores of the cell's nuclear membrane. It is emphasized that in addition to non-selective mechanisms of nuclear import of miRNAs, there are transport mechanisms that carry certain miRNAs across the cell membrane. Some miRNAs are presented, which are mainly localized in the nucleus of a certain type of cell. Scientists believe that

much of the nucleus miRNA is concentrated in polysomes. Export of nuclear pool microRNA into the cytoplasm of the cell occurs with the help of export 1. Thus, in the cytoplasm of the cell, mature forms of microRNA accumulate, some of which are translocated to the cell nucleus or the extracellular space. Assembly of the miRISC complex is carried out in the cytoplasm of the cell, and only after the formation of the complex, it is imported into the cell nucleus. The spectrum of exosome-associated miRNAs can be a highly important diagnostic criterion for some nosologies, and exosomes containing certain miRNAs can be used for targeted therapy of specific diseases. To write the article, information was searched using databases Scopus, Web of Science, MedLine, PubMed, Google Scholar, EMBASE, Global Health, The Cochrane Library, CyberLeninka.

Keywords: microRNA; microRNA translocation; P-bodies; microRNA localization; RNA-induced silencing complex (RISC); review