

ПЛЮСЫ И МИНУСЫ КОЛЬЦЕВЫХ РНК В КАЧЕСТВЕ ГУБОК ДЛЯ микроРНК

© 2021 г. М.А. Дук*, М.Г. Самсонова**

*Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе, 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26

**Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

E-mail: duk@mail.ioffe.ru

Поступила в редакцию 21.08.2020 г.

После доработки 21.08.2020 г.

Принята к публикации 04.09.2020 г.

Роли некодирующих РНК различных типов в клетке активно изучаются в последние годы. Одним из типов некодирующих РНК являются кольцевые РНК, которые ранее рассматривались как отходы процесса сплайсинга, однако на нынешний день у многих из них были обнаружены важные регуляторные функции, в том числе и работа в качестве губки для микроРНК. Нами проведено сравнение работы такой губки для микроРНК с работой классической ветви регуляции с помощью транскрипционного фактора с точки зрения эффективности, времени работы и шума. Показано, что кольцевая РНК с множеством сайтов связывания для микроРНК оказывается значительно эффективнее, чем транскрипционный фактор, и такой контур работает быстрее, однако это верно только в условиях неполного насыщения сайтов связывания молекулами микроРНК. Кроме того, шумовые характеристики контура значительно ухудшаются с ростом количества сайтов связывания. Показано также, что кольцевая РНК с одним сайтом связывания малоэффективна в качестве губки для микроРНК. Предполагается, что такой тип регуляции в клетке является скорее некоторым специфическим инструментом.

Ключевые слова: кольцевые РНК, микроРНК, губки для микроРНК, некодирующие РНК, шум.

DOI: 10.31857/S0006302921010026

В последние годы некодирующие РНК привлекают все большее внимание исследователей. Помимо активно изучающихся микроРНК, или микроРНК, большой интерес стали представлять кольцевые РНК, которые встречаются повсеместно [1–3] и имеют различные функции и происхождение.

Изначально обнаруживаемые в клетке кольцевые РНК принимали за продукт сплайсинга интронов, ошибочно соединившийся в кольцо и не играющий никакой значимой роли [4]. Однако вскоре стало понятно, что кольцевые РНК играют существенную роль в регуляции в клетке. У кольцевых РНК некоторых типов были обнаружены сайты связывания для микроРНК [3, 5, 6], в некоторых случаях количество сайтов связывания было более 70, как для ciRS-7, связывающей miR-7 [5], а микроРНК, которые связывались с этими сайтами кольцевых РНК, играют важнейшие регуляторные роли. Благодаря этому было выдвинуто предположение, что кольцевые РНК работают в качестве «губок» для микроРНК (miRNA sponging),

которые бы могли быстро связывать микроРНК и убирать их из системы.

Обнаружение все новых типов кольцевых РНК привело к пониманию, что кольцевые РНК – это множество типов РНК с различным происхождением и функциями. Так, кольцевые РНК могут образовываться в процессе сплайсинга из вырезанных интронов, но гораздо чаще – в результате неканонического обратного сплайсинга или бэксплайсинга, происходящего во время генерации пре-мРНК или уже на готовой пре-мРНК [1, 3, 7]. Процесс бэксплайсинга идет иначе, чем канонический сплайсинг: в процессе бэксплайсинга нижестоящий донор сплайсинга присоединяется к предшествующему акцептору сплайсинга, таким образом получается обратный порядок экзонов, см. рис. 1. Предполагается, что бэксплайсинг мешает процессу линейного сплайсинга, и таким образом производство кольцевых РНК может подавлять производство линейной мРНК [1, 8, 9].

Тем не менее бэксплайсинг происходит намного реже, чем линейный сплайсинг [4, 10], и

Сокращение: ТФ – транскрипционный фактор.

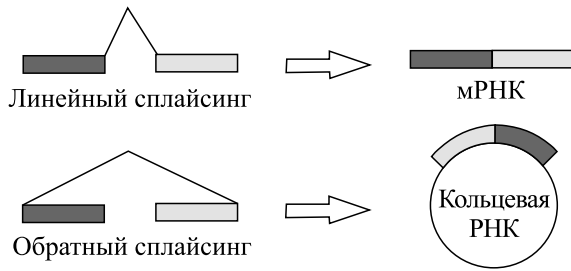


Рис. 1. Схематическое представление различия линейного сплайсинга и обратного сплайсинга (бэксплайсинга). В процессе линейного сплайсинга из пре-мРНК вырезаются интроны и итоговым продуктом является зрелая мРНК. В процессе обратного сплайсинга экзоны поменяли порядок и пре-мРНК превратилась в кольцевую РНК.

количество кольцевых РНК одного типа в клетке значительно меньше, чем количество мРНК, полученных с этого же гена.

Функции кольцевых РНК тоже различны, так, кроме функционирования в качестве губок для миРНК, называется участие в развитии некоторых болезней [1, 11], участие в противовирусном иммунитете [8], а также возможность кодировать небольшие белки [8]. Тем не менее большое количество обнаруженных кольцевых РНК, содержащих только один или два сайта связывания миРНК [1, 7], наводят на мысль, что функционирование кольцевых РНК в качестве губок для миРНК переоценено в литературе.

В данной работе представляется сравнение между контуром, в котором производство миРНК подавляется на транскрипционном уровне за счет репрессии белком-транскрипционным фактором, и контуром, в котором кольцевая РНК работает в качестве губки для миРНК. Показывается, что только кольцевая РНК с множественными сайтами связывания способна работать сопоставимо или эффективнее, чем транскрипционный фактор (ТФ), и только в условиях избыточности сайтов связывания.

Кроме того, были проанализированы шумовые характеристики, и показано, что хоть кольце-

вая РНК работает значительно быстрее, чем ТФ, внутренний шум у такого контура оказывается значительно больше.

МЕТОДЫ

Для оценки эффективности работы контура с кольцевой РНК для удаления миРНК из клетки сравнивается такая ветвь с классической ветвью регуляции, в которой ТФ репрессирует миРНК. Допустим, в системе производится пре-мРНК γ_1 , из нее после сплайсинга получается мРНК r , на основе этой мРНК строится белок – транскрипционный фактор q , который подавляет выработку миРНК m_1 в системе. Считаем, что мРНК используется несколько раз, т.е. не разрушается после производства белка на ее основе. Таким образом, в системе происходят реакции, показанные в табл. 1. Здесь скорость производства миРНК под действием транскрипционного фактора задается функцией Хилла: $k_m(q) = (k_m H^2)/(H^2 + q^2)$.

Уравнения для такой ветви регуляции будут иметь вид

$$d\gamma_1/dt = k_\gamma - g_\gamma \gamma_1 - k_r \gamma_1,$$

$$dr/dt = k_r \gamma_1 - g_r r,$$

$$dq/dt = k_q r - g_q q, \quad (1)$$

$$dm_1/dt = k_m H^2/(H^2 + q^2) - g_m m.$$

Рассмотрим теперь ветвь регуляции, представляющую собой связывание миРНК с помощью кольцевой РНК (miRNA sponging). В данном случае вырабатывается пре-мРНК γ_2 , на основе нее в результате обратного сплайсинга образуется кольцевая РНК c_0 , которая связывает миРНК m_2 в системе. Индексы 1 и 2 здесь даны пре-мРНК и миРНК исключительно для отличия рассматриваемых контуров друг от друга, характеристики же, такие как скорость производства и распада, полагаем в двух контурах одинаковыми для возможности сравнения контуров между собой. Реакции показаны в табл. 2. Здесь n – число сайтов

Таблица 1. Реакции в системе при регуляции с помощью транскрипционного фактора

	Производство	Распад
Пре-мРНК	$\emptyset \xrightarrow{k_\gamma} \gamma_1$	$\gamma_1 \xrightarrow{g_\gamma} \emptyset$
мРНК	$\gamma_1 \xrightarrow{k_r} r$	$r \xrightarrow{g_r} \emptyset$
ТФ	$r \xrightarrow{k_q} r + q$	$q \xrightarrow{g_q} \emptyset$
миРНК	$\emptyset \xrightarrow{k_m(q)} m_1$	$m_1 \xrightarrow{g_m} \emptyset$

Таблица 2. Реакции в системе при регуляции с помощью кольцевой РНК

	Производство/связывание	Распад	Расщепление комплексов
Пре-мРНК	$\emptyset \xrightarrow{k_\gamma} \gamma_1$	$\gamma_2 \xrightarrow{g_\gamma} \emptyset$	
мРНК	$\emptyset \xrightarrow{k_m} m_2$	$m_2 \xrightarrow{g_m} \emptyset$	
Кольцевая РНК	$\gamma_2 \xrightarrow{k_c} c_0$	$c_0 \xrightarrow{g_c} \emptyset$	
Комплекс-1	$c_0 + m_2 \xrightarrow{k_{cm}} c_1$	$c_1 \xrightarrow{g_c} \emptyset$	$c_1 \xrightarrow{g_{cm}} c_0 + m_2$
Комплекс-2 ...	$c_1 + m_2 \xrightarrow{k_{cm}} c_2$...	$c_2 \xrightarrow{g_c} \emptyset$...	$c_2 \xrightarrow{g_{cm}} c_1 + m_2$...
Комплекс- <i>n</i>	$c_{n-1} + m_2 \xrightarrow{k_{cm}} c_n$	$c_n \xrightarrow{g_c} \emptyset$	$c_n \xrightarrow{g_{cm}} c_{n-1} + m_2$

связывания, а индекс *у* с отражает количество уже занятых сайтов связывания.

Уравнения для такой ветви регуляции будут иметь следующий вид:

$$\begin{aligned}
 d\gamma_2/dt &= k_\gamma - g_\gamma\gamma_2 - k_c\gamma_2, \\
 dc_0/dt &= k_c\gamma_2 - g_cc_0 - k_{cm}c_0m_2 + g_{cm}c_1, \\
 dc_1/dt &= k_{cm}c_0m_2 - g_cc_1 - k_{cm}c_1m_2 - g_{cm}c_1 + g_{cm}c_2, \\
 dc_2/dt &= k_{cm}c_1m_2 - g_cc_2 - k_{cm}c_2m_2 - g_{cm}c_2 + g_{cm}c_3, \\
 &\dots \\
 dc_n/dt &= k_{cm}c_{n-1}m_2 - g_cc_n - g_{cm}c_n, \\
 dm_2/dt &= k_m - g_mm_2 - k_{cm}m_2 \sum_{i=0}^{n-1} c_i + g_{cm} \sum_{j=1}^n c_j.
 \end{aligned} \quad (2)$$

Вычисление коэффициентов модели производилось с учетом данных из литературы.

Средняя скорость работы полимеразы 3.79 kb/мин [12], средняя длина одного интрона в пре-мРНК 3.4 kb и их среднее количество 8 [13], таким образом, интроны занимают порядка 27.2 kb, на кодирующую часть гена у эукариот приходится порядка 1.3 kb [14], таким образом полагаем, что средняя длина пре-мРНК 28.5 kb, откуда получаем скорость производства пре-мРНК $k_\gamma = 0.13 \text{ мин}^{-1}$.

Среднее время распада мРНК у бактерий 5–10 мин [15], среднее время полураспада мРНК у млекопитающих — 50 мин (BNID:112681), вычисляя получаем скорость распада в среднем $g_r = 0.01 \text{ мин}^{-1}$.

Предполагаем, что скорость собственного распада пре-мРНК в п.о. такая же, как у мРНК, исходя из разницы длины мРНК и пре-мРНК, получаем скорость распада в молекулах в минуту: $g_\gamma = 0.0005 \text{ мин}^{-1}$.

Средняя длина белка около 500 а.а. (BNID:108984), а скорость трансляции — 5 а.а./с (BNID:104598, [16]), таким образом, вычисляем, что скорость производства белка $k_p = 0.6 \text{ мин}^{-1}$.

Скорости распада белков в клетках человека очень различны, поэтому используем не среднее, а медианное значение, приведенное в BNID:112253 ([17]): $g_p = 0.034 \text{ ч}^{-1} \approx 0.0006 \text{ мин}^{-1}$.

И микроРНК, и кольцевые РНК считаются очень стабильными [2, 10], поэтому полагаем, что их скорость распада сопоставима со скоростью распада белков. Характерную скорость производства миРНК тоже сложно оценить, так как миРНК может образовываться как из вырезанных интронов пре-мРНК, так и транскрибироваться отдельным продуктом (около 80 нуклеотидов пре-миРНК переносится в цитоплазму и обрезаются до длины примерно 22 нуклеотида [18] в процессе сплайсинга). Для нашей задачи скорость производства миРНК выбираем так, чтобы количество молекул миРНК одного типа было порядка 10^3 , что соответствует данным по разным типам миРНК (BNID:101297–101299).

Скорость производства мРНК из пре-мРНК k_r , скорость производства кольцевой РНК k_c , а также константы связывания и развязывания комплексов молекул k_{cm} и g_{cm} также подбираем из расчета, чтобы итоговое количество молекул белка ТФ, мРНК и миРНК в стационарном состоя-

Таблица 3. Коэффициенты, использованные в расчетах

	Описание	Значение	Источник
k_γ	Скорость производства пре-мРНК	0.13 мин^{-1}	[12], [14]
k_c	Скорость производства кольцевой РНК	0.00483 мин^{-1}	*, [10]
k_r	Скорость производства мРНК	0.8 мин^{-1}	BNID:108248, 101729
k_m	Скорость производства миРНК	1 мин^{-1}	BNID:101297–01299
k_q	Скорость производства белка-ТФ	0.6 мин^{-1}	BNID:108984 [16]
g_γ	Скорость распада пре-мРНК	0.0005 мин^{-1}	[13–15]
g_c	Скорость распада кольцевой РНК	0.0006 мин^{-1}	*
g_r	Скорость распада мРНК	0.01 мин^{-1}	[15], BNID:112681
g_m	Скорость распада миРНК	0.0006 мин^{-1}	*
g_q	Скорость распада белка-ТФ	0.0006 мин^{-1}	[17]
k_{cm}	Связывание комплексов кольцевая+миРНК	1 мин^{-1}	*
g_{cm}	Развязывание комплексов кольцевая+миРНК	1 мин^{-1}	*
H	Коэффициент в функции Хилла	6000	*

Примечание. * – Подобранные коэффициенты.

нии по порядку соответствовало бы данным из литературы. Всего мРНК в клетке порядка 15000 и их около 20000 типов (BNID:108248), полагаем, мРНК одного типа в среднем будет порядка 10^0 , количество молекул белка одного типа порядка 10^3 – 10^4 (BNID:101729). Количество кольцевых РНК одного типа в клетке неизвестно, но бэксплайсинг, приводящий к появлению кольцевой РНК, случается значительно реже, чем прямой линейный сплайсинг [10], поэтому скорость производства кольцевой РНК должна быть значительно меньше чем скорость производства мРНК, что также учитывалось при подборе коэффициентов.

Коэффициент диссоциации H в функции Хилла для контура с ТФ был выбран равным половине характерного значения количества молекул белка ТФ.

Использованные коэффициенты представлены в табл. 3.

При исследовании внешнего шума рассматривалась величина $\sum_i |m^{\text{noise}} - m^{\text{stat}}|$, где m^{stat} – количество миРНК в квазистационарном состоянии. Вектор внешнего шума строился таким образом: $z(i) = \exp(-0.1) z(i-1) + \sqrt{1 - \exp(-0.2)} \xi$, где ξ – стандартный белый шум, построенный процедурой MATLAB. Вектор z является дискретной моделью процесса Орнштейна–Уленбека, являющегося стационарным марковским гауссовым

процессом. Компоненты полученного вектора z добавлялись к количеству молекул миРНК (m_1 или m_2) в каждый i -й момент времени, после чего численно решалась система уравнений (1) или (2) для следующего момента времени. Таким образом, был получен вектор количества миРНК в системе с внешним шумом m^{noise} . Количество молекул миРНК в начальный момент времени для $m^{\text{noise}}(t=0) = m^{\text{stat}}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Скорость производства кольцевой РНК неизвестна, известно лишь, что обратный сплайсинг случается значительно реже, чем прямой сплайсинг. Скорость производства была выбрана таким образом, чтобы кольцевая РНК с несколькими сайтами (в нашем случае для наглядности было выбрано семь сайтов) приводила бы к тому же стационарному значению количества микроРНК, что и рассматриваемая схема с ТФ.

На рис. 2 показано сравнение количества миРНК при различных способах регуляции – сравнение свободной выработки миРНК, регуляции с помощью ТФ и регуляции с помощью кольцевой РНК с одним сайтом связывания; сравнение свободной выработки миРНК, регуляции с помощью ТФ и регуляции с помощью кольцевой РНК с семью сайтами связывания, а также количество связанных комплексов в системе регуля-

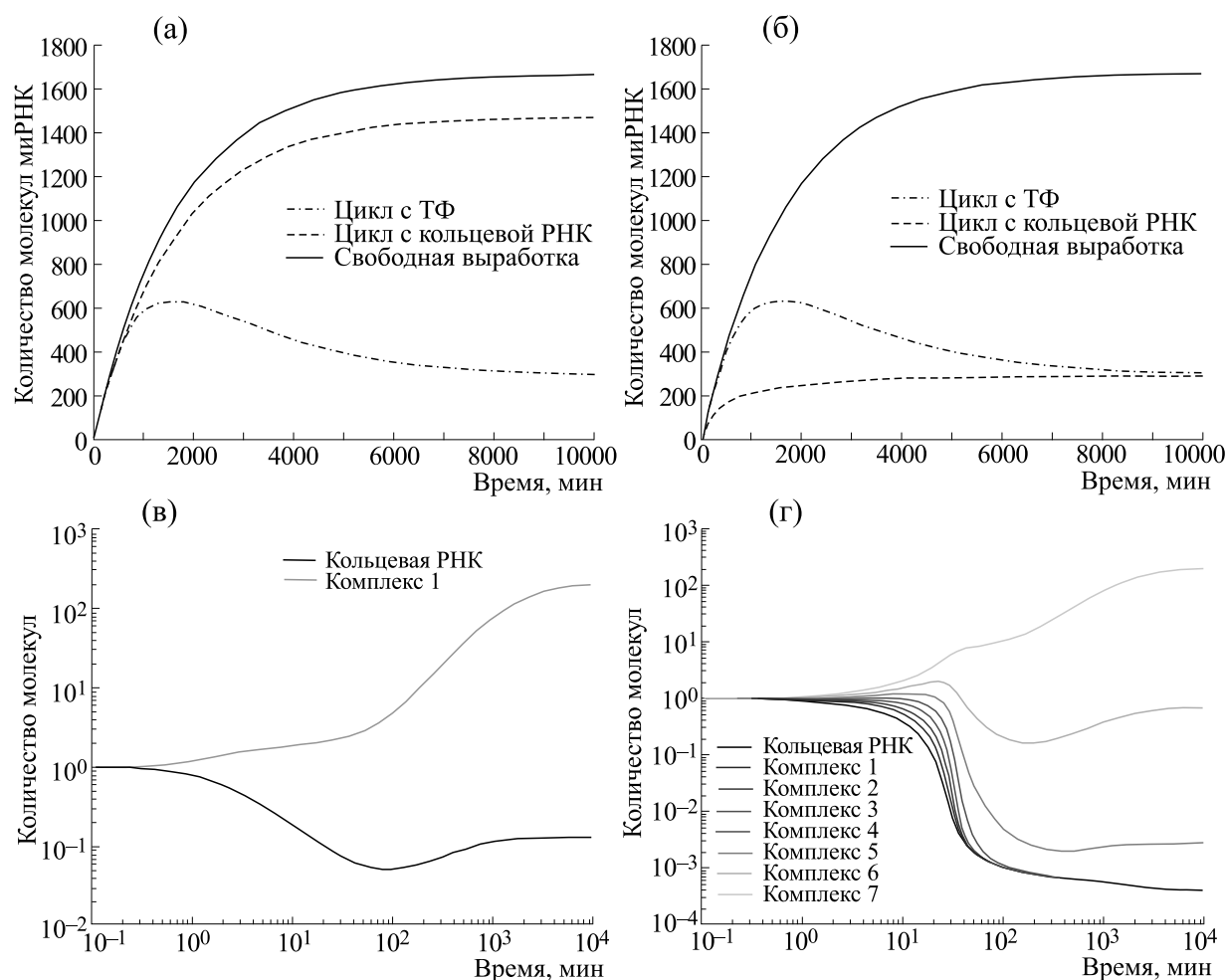


Рис. 2. (а) и (б) — Сравнение динамики количества микроРНК при свободной выработке, при регуляции с помощью ТФ и с помощью кольцевых РНК с одним и семью сайтами связывания соответственно; (в) и (г) — динамика количества кольцевой РНК и ее связанных комплексов во времени при наличии одного и семи сайтов связывания соответственно.

ции с помощью кольцевой РНК с одним или семью сайтами связывания.

Можно видеть, что одинаковая эффективность подавления миРНК в случае семи сайтов связывания достигается при примерно 200 молекулах кольцевой РНК против примерно 12000 молекул транскрипционного фактора. Таким образом, даже при очень низкой концентрации, которая была обнаружена у большинства типов кольцевых РНК [1, 2], кольцевые РНК могут работать достаточно эффективно при условии наличия множественных сайтов связывания, тогда как кольцевая РНК с одним сайтом связывания не обеспечивает достаточного уровня подавления своей мишени.

Также немаловажно, что контур с кольцевой РНК значительно быстрее приходит к стационарным значениям, тогда как в контуре с транскрипционным фактором наблюдается задержка. Из-за

этой задержки на рис. 2б можно видеть максимум в количестве миРНК в контуре с транскрипционным фактором, связанный с тем, что производство необходимого для регуляции количества белка ТФ требует больше времени, чем производство РНК. Иными словами, в случае существования в системе подходящей на роль губки для миРНК кольцевой РНК, она удаляет миРНК из системы быстро и эффективно в сравнении с классической ветвью регуляции транскрипционным фактором. Однако, несмотря на скорость работы и эффективность, подобные губки для миРНК обладают некоторыми существенными минусами, о которых будет написано ниже, и которые, возможно, и являются причинами не столь широкой их распространенности.

Тем не менее при сравнении ветвей регуляции важны также и шумовые характеристики этих контуров. На рис. 3 показаны результаты стохастического моделирования контуров в квазиста-

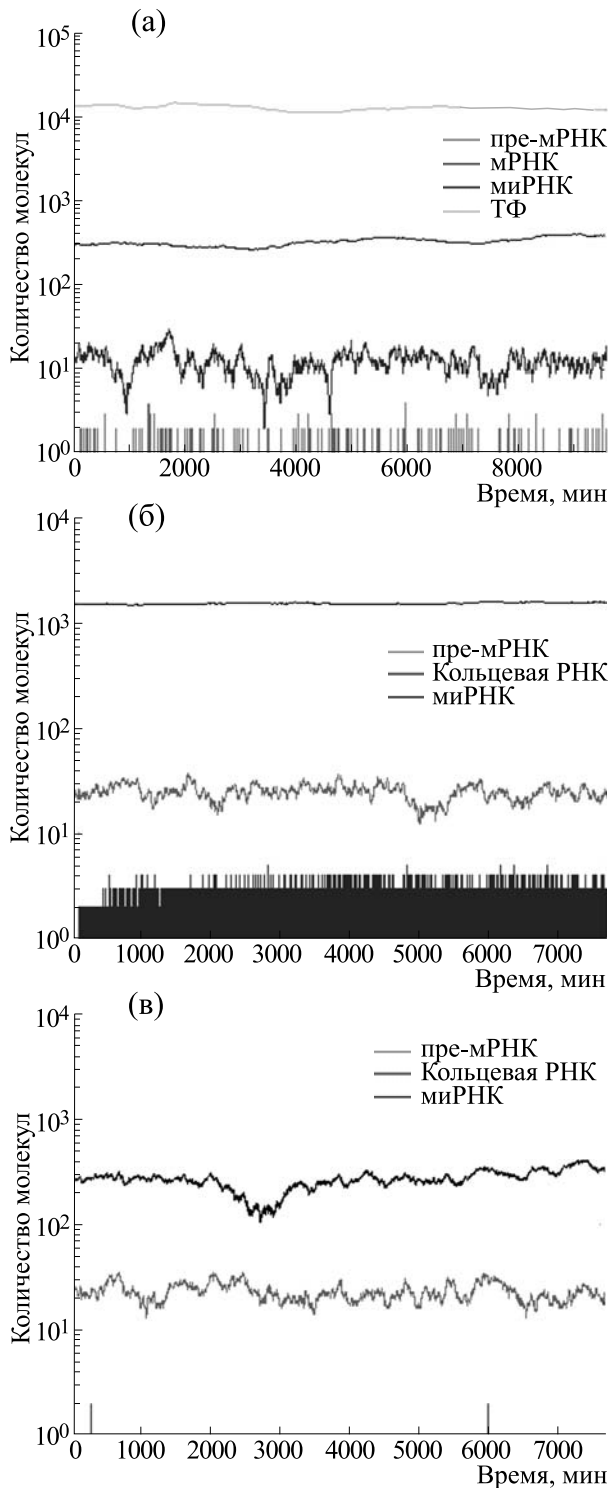


Рис. 3. Стохастическое моделирование контуров: (а) — регуляция с помощью транскрипционного фактора; (б) — регуляция с помощью кольцевой РНК, один сайт связывания; (в) — регуляция с помощью кольцевой РНК, семь сайтов связывания. На рисунках (б) и (в) показана только концентрация свободной кольцевой РНК, концентрации связанных комплексов не показаны.

ционарном состоянии с использованием метода Гиллесапи, описанного в работе [19]. Так как при увеличении числа сайтов вероятность связывания кольцевой РНК хотя бы с одной молекулой миРНК значительно возрастает, на рис. 3в для кольцевой РНК с семью сайтами связывания практически не встречается свободная кольцевая РНК, тогда как на рис. 3б с кольцевой РНК с одним сайтом связывания свободная кольцевая РНК встречается часто. Наличие такого количества свободной кольцевой РНК в контуре с одним сайтом связывания косвенно говорит о низкой эффективности такого регулятора в качестве губки для миРНК.

С другой стороны, при наличии множества сайтов связывания, к которым миРНК может как прикрепиться, так и отсоединиться, увеличивается вариабельность в количестве свободных и присоединенных к кольцевой молекуле молекул миРНК, что означает увеличение внутреннего шума, что можно наблюдать на рис. 3в в сравнении с рис. 3б. Не очень большой уровень внутреннего шума, наблюдаемый на рис. 3а для контура с ТФ, можно связать с меньшей чувствительностью количества белка-ТФ к колебаниям в пре-мРНК в сравнении с чувствительностью у количества кольцевой РНК.

На рис. 4 показано относительное количество миРНК в рассматриваемых контурах. Можно видеть, что шум в контуре с кольцевой РНК с одним сайтом связывания меньше, чем в контуре с ТФ, однако в контуре с кольцевой РНК с семью сайтами связывания шум гораздо больше, чем в контуре с ТФ. Таким образом, внутренний шум, связанный с прикреплением и отсоединением одной молекулы миРНК (что происходит в контуре, регулируемом кольцевой РНК с одним сайтом связывания) не достигает уровней, которые получают из-за сложения шума от производства мРНК, а потом белка при сложном создании регулятора в контуре с транскрипционным фактором, что, в частности, можно было наблюдать, например, в работах [20, 21], где сравнивалась регуляция белка-мишени с помощью ТФ и с помощью миРНК и делался вывод о лучшей работе регулятора-РНК в сравнении с регулятором-белком. Однако увеличение числа сайтов связывания значительно увеличило внутренний шум в контуре с кольцевой РНК. Учитывая тот факт, что подтвержденные в качестве губок для миРНК кольцевые РНК могут иметь до 70 сайтов связывания [5], внутренний шум при такой ветви регуляции будет очень заметным.

Также была исследована способность контуров подавлять внешний шум, который вносили в количество миРНК после прихода системы в стационарное состояние, после чего рассматривали величину $\sum |m^{\text{noise}} - m^{\text{stat}}|$, где m^{noise} — количество

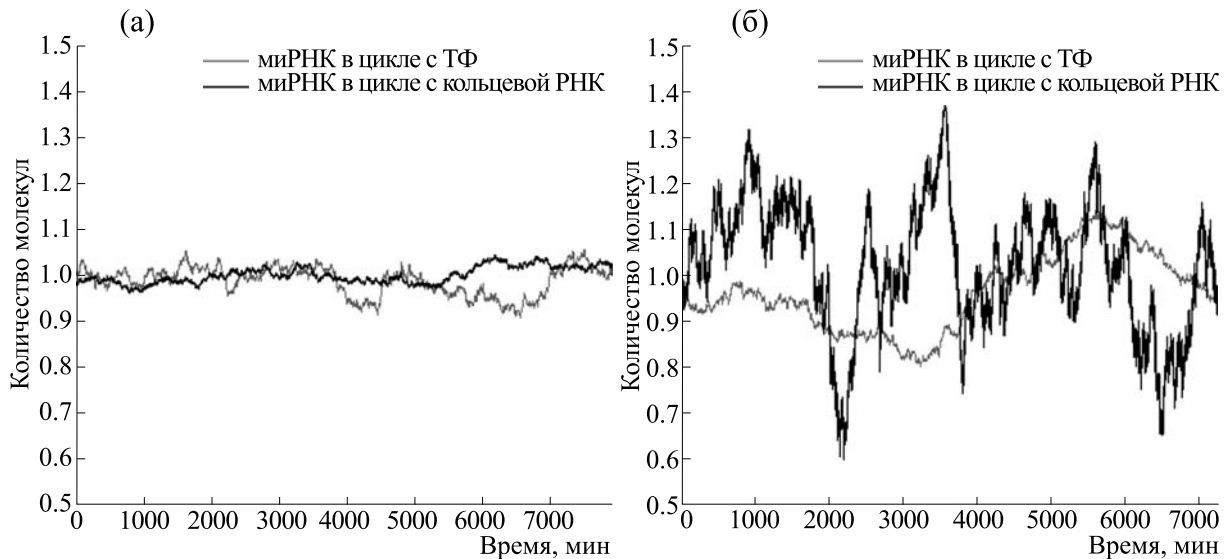


Рис. 4. Сравнение относительного количества миРНК $m/\langle m \rangle$ в системе с ТФ и с кольцевой РНК: (а) — с одним сайтом связывания, (б) — с семью сайтами связывания.

миРНК при наличии внешнего шума, а m^{stat} — стационарное количество миРНК. Вектор внешнего шума строили так же, как и ранее в работе [21]. В данном случае контур с кольцевой РНК с семью сайтами связывания немного лучше подавлял внешний шум. Примеры результатов для одного и того же вектора внешнего шума показаны в табл. 4. Лучшее подавление внешнего шума при отсутствии внутреннего шума обеспечивается за счет того, что контур с кольцевой РНК с семью сайтами работает быстрее, чем контур с транскрипционным фактором, система быстрее приходит к стационарному состоянию после каждого единичного внесения шума, соответственно суммарный итоговый шум в количестве миРНК оказывается меньше. Тем не менее эффективность подавления внешнего шума теряется, если рассматривать систему, содержащую и внешний и внутренний шум, о котором написано выше.

Интересно также посмотреть на эффективность кольцевой РНК при различных значениях коэффициентов. На рис. 5 показаны значения

стационарного количества миРНК в системе с транскрипционным фактором, а также в системе с кольцевой РНК с одним или с семью сайтами связывания.

Можно видеть, что при различных скоростях производства и распада микроРНК (k_m и g_m) и скоростях производства (k_γ и g_γ) пре-мРНК регулятора (ТФ или кольцевой РНК) контур с ТФ подавляет миРНК эффективнее, чем контур с кольцевой РНК с одним сайтом связывания. Однако для кольцевой РНК с семью сайтами связывания картина другая. РНК значительно эффективнее подавляет миРНК в условиях, когда не происходит полного насыщения молекулы кольцевой РНК молекулами миРНК, т.е. при малых скоростях производства миРНК или больших скоростях производства пре-мРНК кольцевой РНК (см. рис. 5а,б). Когда концентрация миРНК в системе оказывается достаточно большой, контур с кольцевой РНК с семью сайтами связывания начинает работать так же неэффективно, как контур с кольцевой РНК с одним сайтом связывания.

Таблица 4. Величина $\Sigma|m^{\text{noise}} - m^{\text{stat}}|$ в контуре с транскрипционным фактором и в контуре с кольцевой РНК с семью сайтами связывания при одних и тех же значениях внесенного в систему внешнего шума

Контур с транскрипционным фактором	Контур с кольцевой РНК
89.3375	86.9057
91.7398	89.2120
86.4638	83.6620
87.5369	84.2301

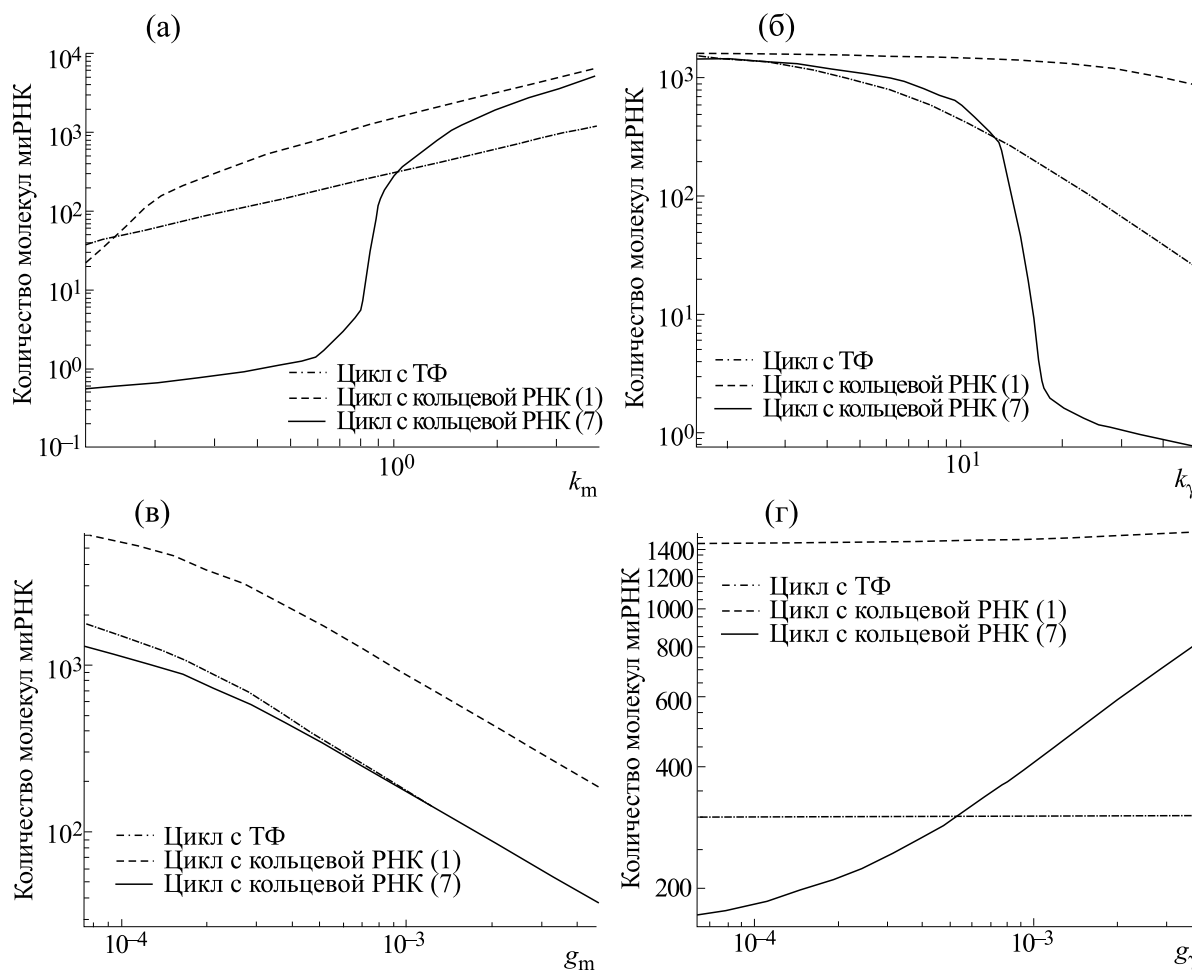


Рис. 5. Сравнение стационарного количества миРНК в системе с ТФ и с кольцевой РНК с одним и семью сайтами связывания: (а) — при разных значениях скорости производства миРНК k_m , (б) — при разных значениях скорости производства пре-миРНК регулятора k_γ , (в) — при разных скоростях распада миРНК g_m , (г) — при разных скоростях распада пре-миРНК регулятора g_γ .

Важно отметить, что переход от эффективного режима работы к неэффективному режиму оказывается достаточно резким при изменении скоростей производства субстрата или мишени.

Интересно отметить, что при уменьшении скорости распада миРНК g_m не наблюдается заметных различий в количестве миРНК в контурах (см. рис. 5в). Это связано с тем, что стабильность миРНК очень высока, т.е. характерная скорость распада миРНК, используемая нами, очень мала, и дальнейшее ее уменьшение слабо влияет на наблюдаемую картину. Однако скорость распада пре-миРНК кольцевой РНК g_γ заметно влияет на контур с кольцевой РНК с семью сайтами связывания, так как нехватка пре-миРНК для создания кольцевой РНК увеличивает вероятность, что все сайты связывания уже выработанных кольцевых РНК будут заняты, что уменьшает эффектив-

ность такого контура, приближая ее к эффективности контура с одним сайтом связывания (см. рис. 5г).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы было найдено много кольцевых РНК, содержащих малое количество сайтов связывания для миРНК. Несмотря на то что некоторые коэффициенты модели были подобраны исходя из общих представлений биохимии процессов, в нашей статье можно видеть, что кольцевая РНК с одним сайтом связывания не может достичь уровня эффективности классической регуляции с помощью транскрипционного фактора. Учитывая вероятность отсоединения миРНК от кольцевой РНК, при наличии только одного сайта связывания кольцевая РНК очень часто оказывается свободной, что можно увидеть при стоха-

стическом моделировании (см. рис. 3) и что косвенно указывает на то, что такая кольцевая РНК неэффективна в качестве губки для миРНК.

Исходя из этого факта, можно предположить, что скорее миРНК регулирует такую кольцевую РНК, а не наоборот, сама же кольцевая РНК с малым количеством сайтов связывания миРНК одного типа выполняет в клетке иные функции.

Тем не менее кольцевая РНК с множественными сайтами связывания значительно эффективнее понижает количество активных миРНК в системе, чем транскрипционный фактор. В нашем случае для наглядного сравнения была выбрана кольцевая РНК только с семью сайтами связывания. Для уменьшения количества миРНК до одинакового уровня понадобилось 200 молекул такой кольцевой РНК против 12000 молекул транскрипционного фактора, что говорит о высокой эффективности такой губки для миРНК. Учитывая тот факт, что у кольцевых РНК, подтвержденных в качестве губок для миРНК, обнаруживается 30–70 сайтов связывания, даже очень низкие уровни выработки кольцевых РНК могут быть достаточными для эффективной регуляции.

Еще одним несомненным плюсом в регуляции миРНК с помощью кольцевой РНК со множественными сайтами связывания, кроме ее эффективности, является скорость работы такого контура. Если для понижения количества миРНК с помощью транскрипционного фактора требуется время на сборку белка и на достижение необходимого количества регулятора, кольцевая РНК со множественными сайтами связывания начинает работать сразу, не позволяя количеству миРНК значительно возрасти.

С другой стороны, шумовые характеристики у контура с кольцевой РНК очень плохие по сравнению с контуром с транскрипционным фактором, и внутренний шум нарастает с увеличением количества сайтов связывания, поэтому контуры, регулируемые транскрипционным фактором, более эффективны в деле тонкой настройки, тогда как контуры с кольцевой РНК с множественными сайтами связывания работают по принципу: «быстро, но не точно». Несмотря на то что контур с кольцевой РНК немного лучше подавляет внешний шум, чем контур с транскрипционным фактором, этот эффект оказывается незаметным при рассмотрении одновременно внешнего и внутреннего шума за счет большой величины последнего. Большой внутренний шум, связанный с таким способом регуляции, возможно, является одной из причин слабой его распространенности в сравнении с другими способами регуляции в клетке.

Кроме того, кольцевая РНК с множественными сайтами связывания очень эффективно работает только в условиях неполного насыщения

сайтов связывания кольцевой РНК молекулами миРНК. В случае же насыщения, которое происходит при увеличении количества миРНК или уменьшении количества кольцевой РНК (например, в случае изменения скоростей производства k_m и k_{γ}), эффективность кольцевой РНК с множественными сайтами связывания оказывается сравнимой с эффективностью кольцевой РНК с одним сайтом связывания, причем переключение с эффективного режима на неэффективный режим происходит достаточно резко, см. рис. 5а,б. Также эффективность контура с кольцевой РНК оказывается чувствительной не только к скорости производства пре-миРНК k_{γ} , но и к ее скорости распада g_{γ} , при этом эффективность контура с транскрипционным фактором оказывается не настолько чувствительной к скорости распада пре-миРНК, что, вероятно, связано с достаточной стабильностью молекул белка.

Подводя итог, можно сказать, что только кольцевые РНК с достаточно большим количеством сайтов связывания могут рассматриваться в качестве губок для миРНК, однако работа таких губок для миРНК имеет свои особенности. С одной стороны, такие губки могут быть очень эффективны, но только в некоторых пределах значений коэффициентов производства и распада компонентов. В условиях, когда за счет изменения этих скоростей сайты связывания кольцевой РНК оказываются занятыми, эффективность работы такого контура резко падает. Немаловажно, что губки для миРНК работают быстро, но скорость их работы компенсируется наличием значительного внутреннего шума, таким образом — губки для миРНК есть скорее некоторый специфический инструмент в живых клетках, нежели наиболее эффективный способ уменьшить количество активных миРНК в системе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность С.А.Руколайне за консультации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование роли кольцевых РНК выполнено М.А. Дук в ФТИ им.А.Ф. Иоффе в рамках научной темы 0040-2019-0003 «Нелинейные процессы и механизмы переноса вещества в конденсированных средах и биоструктурах», верификация биологической значимости исследования выполнена М.Г. Самсоновой при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках реализации программы Научного центра мирового уровня по направлению «Передовые цифровые технологии» СПбПУ (соглашение № 075-15-2020-934).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Greene, A. M. Baird, L. Brady, et al., *Front. Mol. Biosci.* **4**, 38 (2017).
2. S. Guil and M. Esteller, *Trends Biochem. Sci.* **40** (5), 248 (2015).
3. L. M. Holdt, A. Kohlmaier, and D. Teupser, *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 1071 (2018).
4. J. Salzman, C. Gawad, P. L. Wang, et al., *PLoS One* **7** (2), e30733 (2012).
5. T. B. Hansen, J. Kjems, and C. K. Damgaard, *Cancer Res.* **73**, 5609 (2013).
6. I. Jost, L. A. Shalamova, G. K. Gerresheim, et al., *RNA Biol.* **15** (8), 1032 (2018). DOI: 10.1080/15476286.2018.1435248
7. S. Memczak, M. Jens, A. Elefsinioti, et al., *Nature* **495**, 333, (2013). DOI: 10.1038/nature11928
8. M. Wang, F. Yu, W. Wu, et al., *Int. J. Biol. Sci.* **13**, 1497 (2017). DOI: 10.7150/ijbs.22531
9. R. Ashwal-Fluss, M. Meyer, N. R. Pamudurti, et al., *Mol. Cell* **56** (1), 55 (2014).
10. L. L. Chen and L. Yang, *RNA Biol.* **12** (4), 381 (2015).
11. Y. Dong, D. He, Z. Peng, et al., *J. Hematol. Oncol.* **10**, Art. 2 (2017). DOI: 10.1186/s13045-016-0370-2
12. J. Singh and R. A. Padgett, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16** (11), 1128 (2009).
13. J. Hnilicová and D. Stanek, *Nucleus* **2** (3), 182 (2011).
14. L. Xu, H. Chen, X. Hu, et al., *Mol. Biol. Evol.* **23** (6), 1107 (2006).
15. Y. Taniguchi, P. J. Choi, G. W. Li, et al., *Science* **329** (5991), 533 (2010).
16. S. O. Olofsson, K. Boström, P. Carlsson, et al., *Am. Heart J.* **113** (2, Pt 2), 446 (1987).
17. M. K. Doherty, D. E. Hammond, M. J. Clague, et al., *J. Proteome Res.* **8** (1), 104 (2009).
18. T. C. Chang and J. T. Mendell, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **8**, 215 (2007).
19. D. T. Gillespie, *Phys. Rev. E* **54** (2), 2084 (1996).
20. M. Osella, C. Bosia, D. Cora, and M. Caselle, *PLoS Comput. Biol.* **7** (3), e1001101 (2010).
21. S. Tej, K. Gaurav, and S. Mukherji, *Phys. Biol.* **16** (4), 046008 (2019). DOI: 10.1088/1478-3975/ab1563
22. M. A. Duk, M. G. Samsonova, and A. M. Samsonov, *BMC Genomics* **15** (Suppl. 12), S9 (2014). DOI: 10.1186/1471-2164-15-S12-S9

Pros and Cons of Circular RNAs as miRNA Sponges

M.A. Duk* and M.G. Samsonova**

*Ioffe Institute, ul. Polytekhnicheskaya 26, St. Petersburg, 194021 Russia

**Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

In recent years, researchers have been challenged to study roles for non-coding RNA of various types in the cell. Circular RNAs (or circRNAs) are a type of non-coding RNAs previously considered junk by-products in splicing process. but to date, many of them are found to demonstrate important regulatory functions and also act as miRNA sponge. This study involved the comparison between the properties of miRNA sponge and the transcription factor associated with regulation of gene expression, assessing the efficiency, the time taken by the loop and noise characteristics. It was shown that circRNA with multiple binding sites for miRNA is much more effective than the transcription factor, and this loop works faster, however, this is only true when the binding sites are incompletely saturated with miRNA molecules. Moreover, the noise characteristics of the loop significantly are getting worse with an increase in the number of binding sites. It was also shown that circRNA with one binding site acts inefficiently as a sponge of miRNA. The results suggest that this type of regulation in the cell is rather a specific tool.

Keywords: circular RNAs, miRNA, miRNA sponge, non-coding RNA, noise