

Данные были представлены на конференции молодых ученых
“Актуальные проблемы биологии развития”
12–14 октября 2021 г., Москва,
Институт биологии развития РАН

ВЛИЯНИЕ ИНАКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ТАНДЕМНО ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ПЕРИЦЕНТРОМЕРНОЙ ДНК НА ФОРМИРОВАНИЕ БЕЗМЕМБРАННЫХ СТРУКТУР В СОЗРЕВАЮЩИХ ООЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. М. А. Добрынин^а, *, Н. М. Корчагина^б, ^с, Н. В. Пономарцев^а,
О. И. Подгорная^а, Н. И. Енукашвили^а, **

^аИнститут цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

^бБиологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, 199034 Россия

^сИнститут экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: dobrmak1555@mail.ru

**e-mail: n.enukashvily@incras.ru

Поступила в редакцию 20.11.2021 г.

После доработки 01.12.2021 г.

Принята к публикации 07.12.2021 г.

Перицентромерная тандемно повторяющаяся некодирующая ДНК (ТП ДНК) составляет примерно 10% генома человека. Перицентромерная ТП ДНК включает в себя классические сателлиты человека 1, 2, 3 (HS1, HS2, HS3), которые транскрибируются в соматических клетках. Ранее нами показано наличие транскриптов *HS2/HS3* в позднем оогенезе человека и определена их последовательность. Было высказано предположение, что найденные РНП могут быть местом пространственной секвестрации РНК и белков в созревающих ооцитах. Цель работы – разработка метода инактивации транскриптов *HS2/HS3* с помощью антисмысловых олигонуклеотидов для оценки ее влияния на размер и количество DDX4-содержащих РНП в созревающих ооцитах человека. Инактивация транскрипции *HS2/HS3* в созревающих ооцитах человека методом микроинъекции привела к достоверному уменьшению суммарного сигнала РНК *HS2/HS3*, выявляемого методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH). Одновременно с этим наблюдалось увеличение количества включений, окрашиваемых антителами к РНК-хеликазе DDX4. Возможно, при инактивации транскрипции *HS2/HS3* происходит диссоциация DDX4-содержащих РНП частиц. Подобные изменения РНП частиц могут играть критическую роль для развития ооцитов, быть причиной остановки созревания или возникновения патологических синдромов, в том числе связанных с проблемами оплодотворения.

Ключевые слова: оогенез, эмбриогенез, *HS2/HS3*, DDX4, зародышевые гранулы, безмембранные биомолекулярные конденсаты

DOI: 10.31857/S0475145022020057

ВВЕДЕНИЕ

Перицентромерная тандемно повторяющаяся некодирующая ДНК (ТП ДНК) составляет примерно 10% генома человека. Перицентромерная ТП ДНК включает в себя классические человеческие сателлиты 1, 2, 3 (HS1, HS2, HS3) (Richard et al., 2008), которые транскрибируются в соматических клетках (Enukashvily, Ponomartsev, 2013). Подобные транскрипты также обнаруживаются в

клетках эмбрионов до и после имплантации (Трофимова и др., 2018; Yandim, Karakulah, 2019). Ранее в нашей лаборатории впервые обнаружена транскрипция перицентромерной ТП ДНК *HS2/HS3* в позднем оогенезе человека – при переходе ооцитов от стадии зародышевого пузырька (germinal vesicle, GV) к стадии метафазы I мейоза (metaphase I, MI). Транскрибируемыми являлись обе цепи *HS2/HS3*. РНК *HS2/HS3* обнаружены в составе рибонуклеопротеиновых включений, содер-

жащих РНК-хеликазы DDX5 и DDX4, локализованные вблизи митохондрий (Dobrynin et al., 2020). При анализе опубликованных транскриптомов ооцитов человека стадий GV, MI, MII нами выявлено и охарактеризовано четыре полиаденилированных транскрипта *HS2/HS3* (Dobrynin et al., 2020). Обнаруженные включения предположительно являются характерными для клеток зародышевой линии рибонуклеопротеинами (РНП), называемыми зародышевые гранулы (ЗГ) (Добрынин, Енукашвили, 2020). Данное предположение основывается на следующих фактах: а) в обнаруженных включениях обнаружен белок DDX4, который является маркерным белком ЗГ млекопитающих (Reunov, Reunova, 2015); б) выявленные нами РНП локализованы с митохондриями, что также характерно для ЗГ ооцитов млекопитающих (De Smedt et al., 2000). ЗГ млекопитающих — это биоконденсаты, которые образуются с помощью механизмов фазовых переходов типа “жидкость—жидкость”. Разделение фаз придает этим РНП свойства “капли в капле”, позволяя гранулам быстро конденсироваться и растворяться в зависимости от состава окружающей среды и обеспечивать их обмен компонентами. Присутствие в таких образованиях некодирующих транскриптов ТП ДНК показано впервые и их роль в формировании выявленных включений неясна.

Цель работы — разработка метода инактивации транскриптов *HS2/HS3* с помощью антисмысловых олигонуклеотидов для оценки влияния на размер и количество DDX4-содержащих РНП в созревающих ооцитах человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Этическое одобрение

Все ооциты получали от доноров согласно стандартам, изложенным в приказе Министерства здравоохранения Российской Федерации № 803н от 31.07.2021 г., и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (ВМА) (Хельсинкская декларация: этические принципы медицинских исследований с участием людей, включая поправки, внесенные 64-м совещанием ВМА в Форталезе, Бразилия, октябрь 2013 г.). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом сети клиник Ava-Peter-Scandinavia (№ 11/22-12-2016). Письменное информированное согласие было получено от каждого донора, включенного в исследование.

Олигонуклеотиды

На основе консенсусных последовательностей *HS2/HS3* были подобраны прямой и обратный олигонуклеотиды, инактивирующие РНК *HS2/HS3* и

содержащие 2'-О-метил-РНК модификацию по всей длине олигонуклеотидов: 5'-AAUGGAAUC-GAAUGGAAUC-3' и 5'-GAUUCGAUUCGAUUC-CAUU-3'. Модификация 2'-О-метил обеспечивает устойчивость РНК к воздействию нуклеаз и значительно повышает ее сродство к РНК-мишени (температура плавления, по сравнению с ДНК-РНК дуплексом, выше) (Lennox, Behlke, 2011).

Для FISH использовался олигонуклеотидный зонд DYZ1: 5'-TCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCC-3', меченый флуорохромом FITC по 5'-концу (Евроген, Россия) (Dobrynin et al., 2020).

Преовуляторные ооциты человека

Ооциты, находящиеся на одной из двух стадий: GV или MI ($n = 11$) были получены от здоровых доноров, включенных в программу донорства ооцитов, по стандартным протоколам стимулирования овуляции. Ооциты собирали иглой во время трансвагинальной пункции преовуляторных фолликулов под контролем сонографии. В ходе процедуры такие фолликулы отбирали по двум признакам: размеру (выше 17–18 мм) и наличию хорошо выраженной антральной полости. Помимо ооцитов, вступивших в метафазу II мейоза (МИ), аспиранты содержали ооциты на стадиях GV, MI. Качество обработанных гиалуронидазой ооцитов без кумюса оценивали с помощью стереомикроскопии. Ооциты были отсортированы на подходящие и неподходящие для программы донорства. Ооциты считались зрелыми и подходящими для донорства, если они достигли стадии МИ в соответствии с протоколом Стандартной Операционной Процедуры (СОП) клиник Ava-Peter-Scandinavia. Ооциты GV и MI без морфологических аномалий исключили из программы донорства яйцеклеток ввиду экономической нецелесообразности их банкирования, но не из-за аномалий развития. Их использовали в исследовании, если информированное согласие было подписано донором. Степень зрелости мейотических клеток оценивали, как описано в (Dobrynin et al., 2020).

После удаления дебриса и микроскопического исследования ооциты GV и MI помещали в 1 мкл среды для манипуляции SynVibro Flush (CooperSurgical, США) на предметное стекло и фиксировали в 40 мкл фиксатора (96° этанол/ледяная уксусная кислота в соотношении 3 : 1), охлажденно до -20°C . Препараты сушили на воздухе и хранили при комнатной температуре. Для каждого эксперимента использовали не менее трех ооцитов.

Флуоресцентная гибридизация in situ

Распределение транскриптов *HS2/HS3* и белка DDX4 в преовуляторных ооцитах человека на стадиях GV и MI исследовали с помощью метода FISH совместно с прямым иммуноцитохимическим окрашиванием (иммуно-ДНК-РНК-FISH) как описано в (Dobrynin et al., 2020).

В качестве негативного контроля для части ооцитов проводили предобработку РНКазой А. Для этого фиксированные препараты отмывали от фиксатора и инкубировали в растворе РНКазы А (200 мкг/мл) (Биолот, Россия) на 2× растворе цитрата натрия (SSC) (рН 7.0) в течение 1 ч при температуре 37°C. Затем препараты отмывали в 2× SSC 10 мин при комнатной температуре и использовали для иммуно-ДНК-РНК-FISH с *HS2/HS3* гибридизационным зондом. Отсутствие флуоресцентных сигналов в обработанных РНКазой А ооцитах рассматривали как подтверждение того, что наблюдаемые в необработанных ооцитах сигналы обусловлены взаимодействием зонда с РНК, а не с ДНК.

Чтобы оценить локализацию транскриптов *HS2/HS3* относительно маркера зародышевых гранул ооцитов – хеликазы DDX4 (методика описана выше), препараты ооцитов после ДНК-РНК-FISH выдерживали в 5% бычьем сывороточном альбумине в 1× фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 1 ч. Далее применяли мышинные моноклональные антитела (АТ) против DDX4 (1 : 200, Abcam, #ab196708), конъюгированные с Alexa 647. Затем препараты промывали в PBS, содержащем 0.02% Tween-20 (PBST), трижды, по 10 мин каждый. После этого препараты ополаскивали дистиллированной водой и помещали в среду, содержащую агент, предохраняющий от выгорания флуорохрома, и DAPI (ThermoFisher, США).

Микроинъекции

Для инактивации транскрипции *HS2/HS3* в GV/MI ооцитах человека были выполнены цитоплазматические микроинъекции с помощью микроманипулятора Interegra RI. Перед экспериментом ооциты были разделены на 3 группы ($n = 11$). В группе 1 (контроль, $n = 4$) в ооциты вводили физиологический раствор (127.5 фл). В группе 2 ($n = 3$) в каждый ооцит вводили 85 фл (8.5 фмоль) антисмысловых олигонуклеотидов. В группе 3 ($n = 4$) вводимый объем составлял 127.5 фл (12.75 фмоль) антисмысловых олигонуклеотидов. После инъекции ооциты помещали в питательную среду для инкубирования One step Media (Irvine Scientific) в CO₂-инкубатор, а через 48 ч фиксировали и исследовали по протоколам, описанным выше.

Микроскопирование

Для получения оптических срезов и трехмерного анализа препаратов использовали конфокальный микроскоп Olympus FV3000 (Olympus, Япония). Для детекции DAPI, FITC и Alexa 647, в качестве источника возбуждающих волн использовали светодиодные лазеры с длинами волн 405, 488, 640 нм соответственно. Сканирование вдоль Z-оси выполняли с шагом 0.8 мкм. Обработку изображений производили с помощью программного обеспечения конфокального микроскопа Olympus FV3000. Трехмерную реконструкцию на основе полученных оптических срезов производили с помощью встроенных функций программного обеспечения микроскопа Olympus FV3000. В каждом эксперименте анализировали изображения не менее 3 ооцитов.

Обработка данных конфокальной микроскопии

Анализ флуоресцентных сигналов проводился с помощью программы ImageJ (NIH, США). Перед обработкой изображения проводилась его калибровка – рассчитывалось соотношение между физическим размером изображения в сантиметрах и числом пикселей в изображении. Перед измерениями все изображения, содержащие флуоресценцию только одного канала (FITC для *HS2/HS3*, Alexa 647 для DDX4) обрабатывались с помощью инструмента Subtract и инструмента Unsharp mask. После этого изображения переводились в цветовой режим оттенка серого (256 оттенков, формат 8-бит). Перед преобразованием в бинарное черно-белое изображение устанавливался порог интенсивности серого цвета с помощью инструмента Threshold, ниже которого серый сигнал считался равным белому, а выше – черному цвету. Далее изображение переводилось в бинарное, которое обрабатывалось с помощью бинарного инструмента Watershed, разделяющего соприкасающиеся объекты. В разделе Set Measurements проводилась настройка условий и набора данных для будущего обсчета. Зона обсчета ограничивалась с помощью инструмента Freehand Selections. Далее с помощью инструмента Analyze Particles проводился обсчет флуоресцентных сигналов. Минимальный размер сигналов, отбираемых для обсчета был установлен на уровне 7 пикселей. В качестве величины, используемой для квантификации флуоресцентного сигнала, был выбран показатель “среднее значение серого” (C3C, mean) – сумма значений всех пикселей серого цвета в выделенной области, деленная на количество пикселей. Данная величина находится в прямой пропорциональной зависимости от количества флуоресцентно-меченных макромолекул и дает представление об интенсивности флуорес-

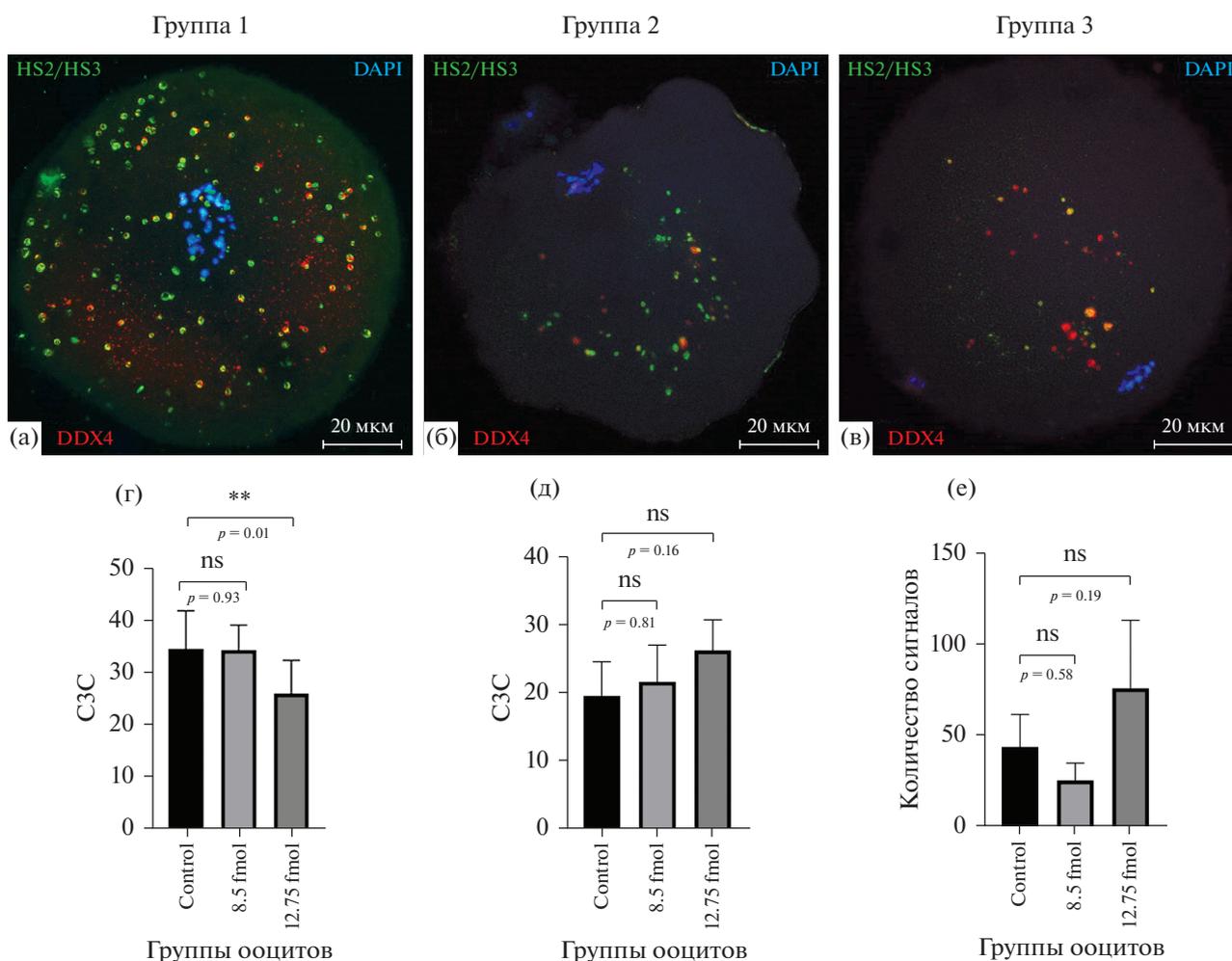


Рис. 1. Пространственное распределение РНК HS2/HS3 (зеленый) и РНК-хеликазы DDX4 (красный) (а–в) в GV и MI ооцитах человека после инъекций физиологического раствора (а), 8.5 фмоль (б) и 12.75 фмоль антисмысловых нуклеотидов (в). Хроматин окрашен DAPI (синий). Масштабная линейка: 20 мкм. Результаты количественного обсчета изображений представлены на графиках (г–е): СЗС для конфокальных изображений после HS2/HS3 РНК FISH (г), после иммуноокрашивания АТ против DDX4 (д). Данные по числу флуоресцентных сигналов на клетку после окрашивания АТ к DDX4 представлены на (е).

пенции. При исследовании флуоресценции АТ против DDX4 также использовались данные о количестве отдельных сигналов (count). Результаты обсчета выводились в виде таблицы результатов.

Статистический анализ

Эксперименты проводились не менее чем в 3 биологических и 5 технических повторностях. Статистическая обработка данных обсчета СЗС проводилась с использованием программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Был выполнен односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) для попарного сравнения средних значений трех несогласованных групп. Использование *t*-критерия было исключено из-за малого размера выборок. Для таких выборок ANOVA является одним

из рекомендованных методов статистического анализа, благодаря устойчивости его результатов к изменению размеров выборок (Blanca et al., 2017). Статистическая значимость обозначена ** при *p*-value < 0.01 и ns при *p* > 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследований установили, что инъекционные манипуляции с ооцитами не приводили к достоверному увеличению числа дегенерировавших ооцитов ни в одной из групп по сравнению с внутрилабораторными контрольными значениями гибели ооцитов при инъекционных манипуляциях. Данные внутрилабораторные нормы были установлены клиникой, в которой проводились мик-

роинъекции в рамках данного исследования, на основании собственного и мирового опыта.

В ооцитах 3-й группы, получивших 12.75 фмоль 2-О'Мет ДНК, наблюдалось достоверное ($p = 0.01$) снижение СЗС до 25.68 ± 1.777 по сравнению с группой 1 (35.50 ± 2.938). В группе с дозой 8.5 фмоль данный показатель (34.47 ± 1.984) не изменялся достоверно по сравнению с контрольной группой (рис. 1а–1г).

Таким образом, данный метод инактивации ТП ДНК приводит к статистически достоверной инактивации ~30% исследуемых транскриптов сателлитной ДНК. Инактивация транскриптов перичентромерных ТП ДНК человека на данный момент является технически сложной задачей. Это обусловлено несколькими факторами. Во-первых, на данный момент сложно подобрать инактивирующие олигонуклеотиды, т.к. сборка генома в области локализации перичентромерных ТП ДНК отсутствует. Инактивация же транскриптов в ооцитах представляет дополнительные трудности — из-за наличия сформированной *zona pellucida* невозможно использовать для трансфецирования липофильные реагенты. Блок транскрипции на завершающем этапе GV стадии развития ооцитов также снижает эффективность инактивации. В данном исследовании нам удалось добиться значимого снижения СЗС гибридационных сигналов в ДНК-РНК FISH и показать хорошую переносимость клетками данной процедуры. Для повышения эффективности инактивации планируется разработка протокола с использованием одновременно нескольких антисмысловых олигонуклеотидов.

Одновременно с этим, в ооцитах 3-й группы была обнаружена тенденция ($p = 0.16$) увеличения СЗС в канале, соответствующем сигналу, полученному при окрашивании АТ против DDX4 до 26.23 ± 2.223 по сравнению с группой 1 (19.57 ± 2.496). При этом в группе 2 данный показатель (21.63 ± 3.095) изменялся меньше по сравнению с контрольной группой (рис. 1а–1в, 1д).

При этом в ооцитах 3-й группы была обнаружена тенденция ($p = 0.19$) к увеличению числа отдельных сигналов до 76 ± 18.56 по сравнению с группой 1 (44 ± 8.994 сигналов). Тогда как в группе 2 данный показатель (26 ± 5.508 сигналов) изменялся меньше по сравнению с контрольной группой 1 (рис. 1а–1в, 1е). Малый размер выборки не позволил получить статистически достоверные данные. Работа по накоплению данных будет продолжена в будущем.

Таким образом, при снижении количества транскриптов *HS2/HS3* в ооците, количество включений, окрашиваемых антителами к DDX4, увеличилось без снижения СЗС.

Возможно, при инактивации транскрипции *HS2/HS3*, происходит диссоциация ранее обнаруженных DDX4-содержащих РНП частиц, так как выявлено увеличение количества отдельных сигналов, соответствующих DDX4. Предполагается, что обнаруженные РНП необходимы для депонирования материнских РНК и белков, используемых в процессах раннего эмбриогенеза до запуска собственного генома эмбриона. В связи с этим, диссоциация РНП частиц может играть критическую роль для развития ооцитов, быть причиной остановки созревания или возникновения патологических синдромов, в том числе связанных с проблемами оплодотворения.

Известно, что РНК могут являться активными участниками-регуляторами, а не пассивными элементами при образовании РНП гранул. *In vitro* небольшое количество РНК сначала способствует образованию капелек белка, а затем начинает растворять капли, как только концентрация РНК достигает порогового значения (Banerjee et al., 2017; Maharana et al., 2018). Длинные и трансляционно-репрессированные (экспонированные) транскрипты имеют тенденцию входить в состав РНП (Rangan et al., 2009; Hubstenberger et al., 2013; Namkoong et al., 2018). Эти РНК могут иметь больше конформационных состояний, чем трансляционно активные РНК (Ding et al., 2005), а также могут участвовать в большем количестве взаимодействий белок-РНК, РНК-РНК или участвовать в спаривании оснований (Jain, Vale, 2017; Rhine et al., 2020). Таким образом, структура РНК является одним из основных регуляторов разделения фаз различных РНП структур, а инактивация их транскрипции может приводить к дезорганизации РНП.

Известно, что РНК *HS2/HS3*, ранее выделенная из клеток HeLa, подвергшихся тепловому шоку (Valgardsdottir et al., 2005), необходима для сборки ядерных стресс телец — безмембранных РНП, связанных с ТП ДНК. Предполагается, что подобные *HS2/HS3* РНК обладают исключительной способностью действовать как молекулярные губки и секвестрировать регуляторные белки хроматина (Erukashvily et al., 2021). Поэтому инактивация транскрипции *HS2/HS3* может быть фактором, оказывающим негативное влияние на сборку РНП структур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что 2-О'Мет антисмысловые олигонуклеотиды могут инактивировать транскрипцию сателлитных *HS2/HS3* ДНК в позднем оогенезе человека при введении их в клетку путем микроинъекций. При инактивации транскриптов наблюдается

снижение степени агрегации белка DDX4 содержащегося в составе РНП, что может свидетельствовать о диссоциации РНП.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021) и гранта РНФ (№ 19-74-20102) (сбор ооцитов, дизайн антисмысловых праймеров).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии какого-либо конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Разработка концепции исследования, планирование экспериментов: Н.И. Енукашвили, Н.М. Корчагина, М.А. Добрынин; проведение экспериментов: М.А. Добрынин, Н.В. Корчагина; методология: Н.М. Корчагина, Н.В. Пономарцев, Н.И. Енукашвили; визуализация: М.А. Добрынин; финансовое обеспечение: О.И. Подгорная, Н.И. Енукашвили; подготовка рукописи: М.А. Добрынин, Н.И. Енукашвили.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Добрынин М.А., Енукашвили Н.И.* Зародышевые гранулы в оогенезе животных // *Цитология*. 2020. Т. 62. № 12. С. 851–866.
- Трофимова И.Л., Енукашвили Н.И., Кузнецова Т.В., Баранов В.С.* Транскрипция сателлитной ДНК в эмбриогенезе человека: обзор литературы и собственные данные // *Медицинская генетика*. 2018. Т. 17. № 3. С. 3–7.
- Banerjee P.R., Milin A.N., Moosa M.M., Onuchic P.L., Deniz A.A.* Reentrant phase transition drives dynamic substructure formation in ribonucleoprotein droplets // *Angew. Chemie – Int. Ed.* 2017. V. 56. № 38. P. 11354–11359. <https://doi.org/10.1002/anie.201703191>
- Blanca M.J., Alarcón R., Arnau J., Bono R., Bendayan R.* Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? // *Psychothema*. 2017. V. 29. № 4. P. 552–557. <https://doi.org/10.7334/PSICOTHEMA2016.383>
- De Smedt V., Szöllösi D., Kloc M.* The Balbiani body: Asymmetry in the mammalian oocyte // *Genesis*. 2000. V. 26. № 3. P. 208. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1526-968x\(200003\)26:3<208::aid-gene6>3.3.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1526-968x(200003)26:3<208::aid-gene6>3.3.co;2-e)
- Ding Y., Chi Y.C., Lawrence C.E.* RNA secondary structure prediction by centroids in a Boltzmann weighted ensemble // *RNA*. 2005. V. 11. № 8. P. 1157–1166. <https://doi.org/10.1261/RNA.2500605>
- Dobrynin M.A., Korchagina N.M., Prjibelski A.D., Shafranskaya D., Ostromyshenskii D.I., Shunkina K., Stepanova I., Kotova A.V., Podgornaya O.I., Erukashvily N.I.* Human pericentromeric tandemly repeated DNA is transcribed at the end of oocyte maturation and is associated with membraneless mitochondria-associated structures // *Sci. Reports*. 2020. V. 10. № 1. P. 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76628-8>
- Erukashvily N.I., Dobrynin M.A., Chubar A.V.* RNA-seeded membraneless bodies: Role of tandemly repeated RNA // *In Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* Academic Press Inc. 2021. V. 126. P. 151–193. ISSN 1876-1623. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2020.12.007>
- Erukashvily N.I., Ponomartsev N.V.* Mammalian satellite DNA: a speaking dumb // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2013. V. 90. P. 31–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410523-2.00002-X>
- Hubstenberger A., Noble S.L., Cameron C., Evans T.C.* Translation repressors, an RNA helicase, and developmental cues control RNP phase transitions during early development // *Dev. Cell*. 2013. V. 27. № 2. P. 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.024>
- Jain A., Vale R.D.* RNA phase transitions in repeat expansion disorders // *Nat.* 2017. V. 546. № 7657. P. 243–247. <https://doi.org/10.1038/nature22386>
- Lennox K.A., Behlke M.A.* Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides // *Gene Ther.* 2011. V. 18. № 12. P. 1111–1120. <https://doi.org/10.1038/GT.2011.100>
- Maharana S., Wang J., Papadopoulos D.K., Richter D., Pozniakovskiy A., Poser I., Bickle M., Rizk S., Guillén-Boixet J., Franzmann T.M., Jahnel M., Marrone L., Chang Y.T., Sternecker J., Tomancak P., Hyman A.A., Alberti S.* RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins // *Science*. 2018. V. 360. № 6391. P. 918–921. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAR7366>
- Namkoong S., Ho A., Woo Y.M., Kwak H., Lee J.H.* Systematic characterization of stress-induced RNA granulation // *Mol. Cell*. 2018. V. 70. № 1. P. 175–187.e8. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2018.02.025>
- Rangan P., DeGennaro M., Jaime-Bustamante K., Coux R.-X., Martinho R., Lehmann R.* Temporal and spatial control of germ-plasm RNAs // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. № 1. P. 72–77. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2008.11.066>
- Reunov A.A., Reunova Y.A.* In mouse oocytes the mitochondrion-originated germinal body-like structures accumulate mouse Vasa homologue (MVH) protein // *Zygote*. 2015. V. 23. № 4. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000124>
- Rhine K., Vidaurre V., Myong S.* RNA droplets // *Annu. Rev. Biophys.* 2020. V. 49. P. 247. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-052118-115508>
- Richard G.-F., Kerrest A., Dujon B.* Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008. V. 72. № 4. P. 686–727. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00011-08>
- Valgardsdottir R., Chiodi I., Giordano M., Cobianchi F., Riva S., Biamonti G.* Structural and functional characterization of noncoding repetitive RNAs transcribed in stressed human cells // *Mol. Biol. Cell*. 2005. V. 16. № 6. P. 2597–2604. <https://doi.org/10.1091/MBE.E04-12-1078/ASSET/IMAGES/LARGE/ZMK0060571650005.JPEG>
- Yandlm C., Karakulah G.* Expression dynamics of repetitive DNA in early human embryonic development // *BMC Genomics*. 2019. V. 20. <https://doi.org/10.1186/S12864-019-5803-1>

Influence of Inactivation of Tandemly Repeated Pericentromeric DNA Transcription on the Formation of Membraneless Structures at the End of Oocyte Maturation

M. A. Dobrynin^{1, *}, N. M. Korchagina^{2, 3}, N. V. Ponomartsev¹,
O. I. Podgornaya¹, and N. I. Erukashvily^{1, **}

¹ Institute of Cytology of RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

² Faculty of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

³ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia

*e-mails: dobrmak1555@mail.ru

**e-mails: n.erukashvily@incras.ru

Pericentromeric tandemly repeating noncoding DNA (TR DNA) makes up approximately 10% of the human genome. TR DNA includes classic human satellites 1, 2, 3 (*HS1*, *HS2*, *HS3*), which are transcribed in somatic cells. We have previously shown the presence of *HS2/HS3* transcripts in late human oogenesis and determined their sequence. It has been suggested that the RNPs may be the site of spatial sequestration of RNA and proteins in maturing oocytes. The aim of this work was to develop a method for the inactivation of *HS2/HS3* transcripts using microinjected oligonucleotides to assess its effect on the size and amount of DDX4-containing RNP in maturing human oocytes. Inactivation of *HS2/HS3* transcription in maturing human oocytes by microinjection led to a significant decrease in the total *HS2/HS3* RNA signal after FISH. At the same time, an increase in the number of inclusions stained with antibodies to RNA helicase DDX4 was observed. Possibly, upon inactivation of *HS2/HS3* transcription, dissociation of previously detected DDX4-containing RNP particles occurred. Such changes in the RNP of particles can play a critical role in the development of oocytes, be a reason for the arrest of maturation or the occurrence of pathological syndromes, including those associated with fertilization problems.

Keywords: oogenesis, embryogenesis, *HS2/HS3*, DDX4, germ granules, membraneless biomolecular condensates