

Профиль экспрессии длинных и коротких РНК в цитоплазме и ядрах растущих ооцитов домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*)

А.В. Красикова¹, А.В. Федоров^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

² Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Материнская РНК, накапливаемая в ооците во время созревания, необходима не только для формирования зиготы, но и для поддержания определенного числа клеточных делений до активации генома зародыша. Одним из существенных этапов исследования транскриптома ооцитов относятся адаптация методик экстракции РНК и характеристика профиля экспрессии РНК. Адекватной моделью для исследования динамики накопления РНК в ходе оогенеза представляются яичники domesticированных видов птиц. В настоящей работе оптимизированы методы экстракции РНК из цитоплазмы и нуклеоплазмы ооцитов домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*) и охарактеризованы изменения в профиле длинных и коротких РНК в ходе роста ооцита. Во фракциях РНК из цитоплазмы ооцитов курицы выявлено наличие 28S и 18S рибосомных РНК (рРНК), малых РНК и гетерогенных по размеру длинных РНК. В профиле тотальной РНК из ядер растущих ооцитов присутствуют преимущественно пики низкомолекулярной РНК, соответствующей по размеру транспортным, малым ядерным и коротким регуляторным РНК. В ядрах растущих ооцитов самок курицы зарегистрированы следовые количества или отсутствие 28S и 18S рРНК, что обусловлено инактивацией единственного ядрышкового организатора. В ооцитах домашней курицы выявлены три отличающиеся по размеру группы коротких (от 20 до 40 н.) РНК, которые могут соответствовать классам коротких регуляторных РНК. Показано накопление коротких РНК в цитоплазме ооцита курицы в ходе его роста. Предполагается, что запасаемые в цитоплазме ооцитов птиц короткие РНК могут использоваться на ранних стадиях эмбриогенеза для регуляции функций генома.

Ключевые слова: домашняя курица; короткие РНК; материнская РНК; некодирующие РНК; ооцит; оогенез; рибосомная РНК.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Красикова А.В., Федоров А.В. Профиль экспрессии длинных и коротких РНК в цитоплазме и ядрах растущих ооцитов домашней курицы (*Gallus gallus domesticus*). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):264-269.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Krasikova A.V., Fedorov A.V. Expression profiles of long and short RNAs in the cytoplasm and nuclei of growing chicken (*Gallus gallus domesticus*) oocytes. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):264-269.

УДК 577.214

Поступила в редакцию 12.01.2015 г.

Принята к публикации 28.04.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

Expression profiles of long and short RNAs in the cytoplasm and nuclei of growing chicken (*Gallus gallus domesticus*) oocytes

A.V. Krasikova¹, A.V. Fedorov^{1, 2}

¹ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

² Almazov Federal Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

Maternal RNAs accumulated during oocyte maturation are required not only for zygote formation but also for supporting the first embryonic cell divisions until embryo genome activation. Essential stages of transcriptome analysis include adaptation of RNA extraction procedures and characterization of the RNA expression profile. Ovaries of domestic birds represent an adequate model for exploration of RNA accumulation during oogenesis. In the present study, we optimized methods of RNA extraction from chicken (*Gallus gallus domesticus*) oocyte cytoplasm and nucleoplasm and characterized changes in profiles of long and short RNAs during oocyte growth. Cytoplasmic RNA fractions contained 28S and 18S ribosomal RNAs (rRNAs), small RNAs, and long RNAs heterogeneous in size. The profiles of total RNA from growing oocyte nuclei were dominated by low molecular weight RNAs corresponding in size to transport RNAs, small nuclear RNAs, and short regulatory RNAs. Importantly, oocyte nuclei from chicken egg-laying females demonstrated trace amounts or absence of 28S and 18S rRNA, which was due to inactivation of the only nucleolar organizer. Three groups of short RNAs differing in size (from 20 to 40 nucleotides) were recognized in chicken oocytes. They might correspond to short regulatory RNA classes. Furthermore, we demonstrated that short RNAs were accumulated in the cytoplasm during oocyte growth. We suggest that short RNAs accumulated in avian oocyte cytoplasm are involved in the regulation of genome functions at early embryogenesis stages.

Key words: domestic chicken; non-coding RNA; short RNA; maternal RNA; oocyte; oogenesis; ribosomal RNA.

Исследования спектра транскрибируемых последовательностей ДНК в разных тканях позвоночных, в том числе наиболее распространенных модельных организмов, далеки от завершения. Особенно мало внимания уделяется высокопроизводительному анализу транскриптома ооцита и РНК, передаваемой с цитоплазмой ооцита в эмбрионы (материнской РНК) (Fair et al., 2007; Huang, Wells, 2010). Высокопроизводительный анализ, с помощью которого можно не только изучать известные транскрипты, но и открывать новые РНК, подразумевает массовое параллельное секвенирование всего набора молекул РНК, синтезируемых в данном типе клеток или тканей. Актуальность исследования транскриптома ооцитов обусловлена ролью материнской РНК, передаваемой с цитоплазмой яйцеклетки, в ранних этапах развития эмбриона.

Следует отметить, что ооциты птиц представляют собой адекватную модель для исследования динамики накопления материнской РНК. Так, яичник яйцекладущей курицы (*Gallus gallus domesticus*) состоит из неиерархических фолликулов и созревающих преовуляторных фолликулов, классифицируемых в зависимости от размера (от стадии F6 к стадии F1). Эмбриональный геном курицы активируется, когда эмбрион содержит 30–50 клеток, через 24 ч после оплодотворения (Zagris et al., 1998). Таким образом, материнская РНК, накапливаемая в ооците курицы в ходе созревания, необходима не только для оплодотворения и формирования зиготы, но и для поддержания определенного числа делений эмбриональных клеток до активации генома самого зародыша.

Для изучения транскриптома ооцитов могут быть выбраны растущие ооциты домашней курицы. Выбор такого объекта исследования связан с завершением проекта по секвенированию генома курицы, средним размером генома (1,2 Gbp) и низким содержанием повторов в геноме, наличием подробных генетических карт хромосом этого вида и различных доступных молекулярно-генетических инструментов (таких как экспрессионные микрочипы, базы данных поли(А)- и коротких РНК различных тканей и разных стадий развития) (Froman et al., 2006; Cogburn et al., 2007; Nie et al., 2010).

В настоящей работе оптимизированы методы экстракции РНК из ооплазмы и нуклеоплазмы ооцитов курицы и охарактеризованы изменения в профиле длинных гетерогенных и коротких РНК в ходе роста ооцита.

Материалы и методы

Получение препаратов ядер и цитоплазмы ооцитов

Для получения фракций цитоплазмы и нуклеоплазмы ооцитов яйцекладущих самок домашней курицы (*G. g. domesticus*) был использован стандартный протокол (<http://projects.exeter.ac.uk/lampbrush/protocols.htm>). Ядра (зародышевые пузырьки) отделяли от остального содержимого ооцита и его оболочек микрохирургическим путем с помощью вольфрамовых игл в среде «5:1 + фосфаты» (83,0 mM KCl, 17,0 mM NaCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 3,5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂) при наблюдении под стереомикроскопом (Krasikova et al., 2012). Наиболее оптимальными

для изолирования ядер оказались белые неиерархические фолликулы. Выделяемые микрохирургически ядра и энуклеированные (лишенные ядер) ооциты без слоя фолликулярных клеток (т. е. цитоплазма ооцитов) незамедлительно помещали на лед и использовали для выделения РНК.

Выделение общей РНК из цитоплазмы и нуклеоплазмы ооцитов курицы

Были оптимизированы методы выделения РНК из различных тканей домашней курицы, включая печень и яичник, а также из изолированных ядер ооцитов и энуклеированных ооцитов разного размера. РНК выделяли с помощью реагента TRIzol (Invitrogen), согласно рекомендациям производителя, с некоторыми модификациями, а именно после лизиса в TRIzol экстракт дополнительно центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течение 10 мин, чтобы избавиться от нерастворимой фракции. РНК осаждали изопропанолом в течение 20 мин при –20 °С; для осаждения низкомолекулярных фракций РНК время центрифугирования увеличивали до 30 мин. Дополнительно для преципитации малых количеств РНК и коротких РНК в изопропанол использовали соосадитель – свободный от РНКаз гликоген (в концентрации 10 мкг/мл). Осадок РНК тщательно промывали (2 раза) в охлажденном 75 %-м этаноле, первый раз с разбиванием осадка на вортексе. Пробы РНК хранили под спиртом при температуре –80 °С.

Определение количества РНК, оценка присутствия примесей и анализ профиля общей РНК

Количество общей РНК и соотношения A260 : A280 и A260 : A230 определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Соотношение A260 : A280 в пробах РНК из цитоплазмы ооцитов курицы имело значение не менее 1,9, что свидетельствовало об отсутствии контаминации образцов белками. Соотношение A260 : A230 также позволило оценить загрязненность образцов и было выше значения 1,0 для проб РНК из цитоплазмы ооцитов курицы. Профиль РНК, а также степень ее деградации и отсутствие тотальной ДНК контролировали посредством электрофореза на микрофлюидном чипе с помощью биоанализатора Bioanalyzer 2100 (Agilent). Степень деградации РНК оценивали по индексу целостности РНК (RNA Integrity Number (RIN)), а также по отношению количеств 28S и 18S рРНК.

Загрязненность геномной ДНК в пробах РНК из цитоплазмы и ядер ооцитов оказалась пренебрежимо малой, что было подтверждено данными профиля хроматограмм. В связи с этим очистку получаемых проб от загрязнений геномной ДНК не осуществляли.

Анализ профиля низкомолекулярной РНК

Образцы РНК разделяли в 10 %-м ПАА-геле с помощью вертикального электрофореза и окрашивали бромистым этидием, детекцию связавшегося с НК красителя проводили с помощью системы гель-детекции GDS-800 (UVP, США) на трансиллюминаторе в УФ-свете. Полученные электрофореграммы денситометрировали с использованием программы GelQuantNET (<http://biochemlabsolutions.com/GelQuantNET.html>).

Результаты и обсуждение

Количество общей РНК в ооцитах курицы

Общую РНК выделяли из различных тканей и ооцитов *G. g. domesticus* с помощью модифицированного протокола, позволяющего получать препараты, содержащие как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные транскрипты. Использование в качестве соосаждителя гликогена существенно повышало количество выделяемой из цитоплазмы ооцитов РНК. Применяемый модифицированный протокол позволяет получить около 1 мкг тотальной РНК на ооцит и около 1 нг РНК на изолированное ядро (усредненные значения), что дает соотношение 1000 : 1. В сравнении с этими значениями количество РНК, получаемой при стандартной процедуре экстракции РНК из ооцитов шпорцевой лягушки (*Xenopus tropicalis*), было несколько выше – 1 мкг РНК на ооцит и 2 нг РНК на изолированное ядро (соотношение 500 : 1) (Gardner et al., 2012; Simeoni et al., 2012). Это связано с меньшими размерами ядер ооцитов на стадии наиболее высокой транскрипционной активности в яичнике домашней курицы.

Профиль высокомолекулярной РНК в ооцитах курицы

С помощью электрофореза на микрофлюидном чипе сравнили профили общей РНК из цитоплазмы и ядер растущих ооцитов *G. g. domesticus* (рис. 1). В цитоплазме ооцитов наблюдали пики рибосомных РНК, малых РНК и различных гетерогенных по размеру транскриптов (рис. 1, б). Присутствие в цитоплазме ооцитов 28S и 18S рРНК позволяет оценить степень деградации РНК в образцах. Для препаратов РНК из цитоплазмы RIN составлял не менее 5,0 ед. (до 8,3 ед.), а отношение концентраций 28S : 18S рРНК было не менее 1,0 (рис. 1, б).

Как показал детальный анализ фракций РНК из растущих ооцитов курицы разного размера, в ходе роста ооцита в цитоплазме накапливаются рРНК. Известно при этом, что уровень экспрессии 18S и 28S рРНК в ооците значительно уменьшается с момента овуляции (Elis et al., 2008). Гетерогенные РНК наблюдались во всем спектре анализируемого диапазона размеров РНК (рис. 1, б).

Профиль тотальной РНК из микрохирургически изолированных ядер растущих ооцитов домашней курицы значительно отличался. Основные максимумы соответствовали низкомолекулярной РНК, в том числе транспортным РНК и малым ядерным РНК (рис. 1, в). При этом не наблюдали больших количеств гетерогенной по размеру РНК, которая могла бы соответствовать синтезируемым на стадии хромосом типа ламповых щеток различным видам транскриптов.

Важно отметить, что в образце тотальной РНК из ядер ооцитов практически полностью отсутствовали 28S и 18S рибосомные РНК, что не позволяло оценить сохранность РНК с помощью вычисления RIN или по расчету отношения количеств 28S : 18S рРНК (рис. 1, в). Полученные данные на биохимическом уровне подтверждают установленную ранее инактивацию единственного ядрышкового организатора на хромосоме GGA16 в оогенезе половозрелых самок курицы (Greenfield, 1966; Gaginskaia, Chin, 1980; Hutchison, 1987). Следовые количества 28S и 18S

рРНК являются, скорее, примесью РНК из цитоплазмы, чем ядерными транскриптами. Поскольку для выделения РНК из ядер и цитоплазмы применяли одни и те же реактивы и протокол, при этом сохранность РНК из цитоплазмы хорошая, то есть все основания полагать, что РНК из ядер ооцитов также не деградировала.

Профиль размеров РНК из ядер ооцитов домашней курицы отличается от такового у шпорцевой лягушки. Действительно, в ядрах ооцитов лягушки были обнаружены вновь синтезируемые 18S и 28S рРНК, что связано с активностью в ядре ооцита амплифицированных ядрышек (Anderson, Smith, 1978). Отметим, что сходные отличия в профиле высокомолекулярной РНК наблюдали в семенниках и сперме мыши (Kawano et al., 2012). Если в профиле общей РНК из семенников присутствовали выраженные пики 28S и 18S рРНК, то в профиле общей РНК из спермы почти отсутствовали длинные РНК, включая рибосомные РНК.

В связи с накоплением рРНК в цитоплазме (но не в ядрах растущих ооцитов) можно с уверенностью утверждать, что в оогенезе курицы и, вероятно, других видов птиц рРНК поступает из окружающих ооцит клеток фолликулярного эпителия. Эти данные находятся в соответствии с высказанными ранее предположениями о роли фолликулярного эпителия в снабжении ооцита курицы различными видами РНК (Gaginskaia, Chin, 1980) и сведениями о наличии в фолликулярных клетках в яичниках птиц одного или нескольких ядрышек (Gilbert et al., 1983; Krasikova et al., 2012).

Профиль низкомолекулярной РНК в ооцитах курицы

Профиль экспрессии коротких РНК в ходе роста ооцитов *G. g. domesticus* сравнивали с профилем экспрессии коротких РНК в клетках соматических тканей. На рис. 2 приведена характерная картина профиля экспрессии малых (размером больше 60 н.) и коротких (от 20 до 60 н.) РНК в разных тканях (печень и яичник) и на разных этапах созревания ооцита у курицы.

Согласно полученным результатам, короткие РНК в цитоплазме растущих ооцитов курицы представлены в виде трех хорошо отличимых зон (рис. 2). Количественный анализ показал, что в клетках печени общее количество коротких РНК было в 3,8 раза меньше, чем в яичниках, и в 6,2 раз меньше, чем в цитоплазме созревающих ооцитов (рис. 3, а). Ранее при анализе общей РНК из печени, легких, семенников и яичника курицы с помощью электрофоретического разделения в 15 %-м ПАА-геле короткие РНК размером от 20 до 30 н. были обнаружены только в семенниках (Yang et al., 2012).

Важно отметить, что цитоплазма маленьких желтых фолликулов обогащена короткими РНК, по сравнению с цитоплазмой неиерархических фолликулов. При этом количество коротких РНК в ооплазме резко увеличивалось (почти в 15 раз) в ходе созревания ооцита (от 1 до 4 мм в диаметре) (рис. 3, б), что может свидетельствовать о специфичном накоплении и запасании коротких регуляторных РНК.

Наиболее быстро мигрирующая (нижняя) зона в продуктах электрофоретического разделения низкомо-

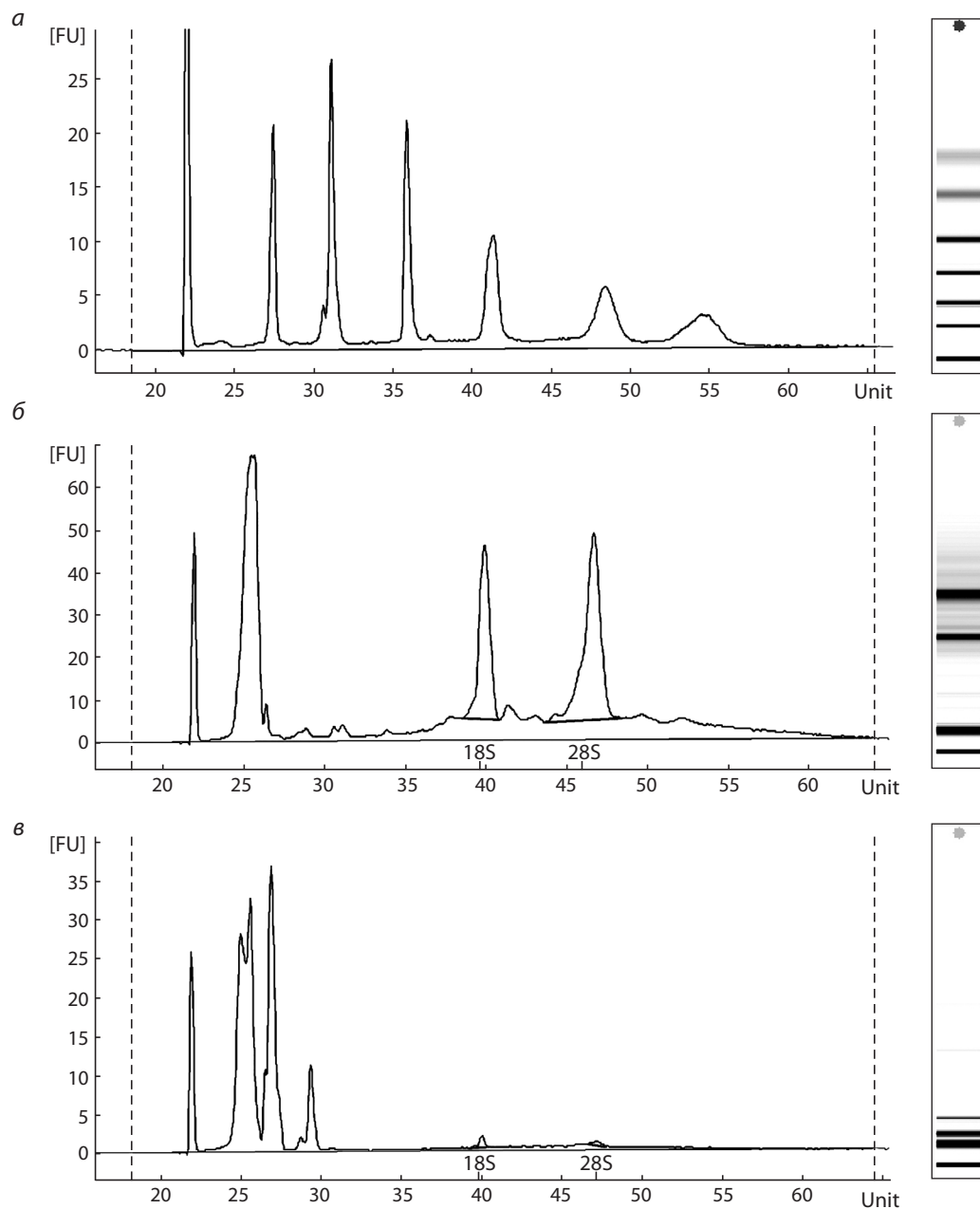


Рис. 1. Сравнение профилей РНК из цитоплазмы и микрохирургически изолированных ядер растущих ооцитов курицы.

Контрольная лесенка маркеров размера ДНК со следующими пиками: 25, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 6000 н. (а); хроматограммы и псевдоэлектрофореграммы электрофореза на микрофлюидном чипе 9 нг общей РНК из цитоплазмы (б) и 2,6 нг общей РНК из ядер (в). По оси Y приведены интенсивности сигнала от молекул РНК (FU – относительная интенсивность флуоресценции), по оси X – длина молекул РНК (Unit – относительное время миграции). Отмечены положения пиков 18S и 28S рРНК. В образце РНК из цитоплазмы значение RIN составляло 8,3 ед., а отношение 28S/18S рРНК равно 1,4.

лекулярной РНК может соответствовать miРНК. Это предположение подтверждается анализом зрелых miРНК домашней курицы в базе данных коротких РНК (miRBase, <http://www.mirbase.org/cgi-bin/>). Так, среди имеющихся на момент анализа в базе данных miРНК курицы 499 последовательностей зрелые miРНК имеют размер 18–25 н., наиболее часто встречаются miРНК размером 20–21 н. Интересно отметить, что большая часть генов miРНК (312 генов, 63 %) в геноме курицы сосредоточена на 10 наиболее крупных хромосомах (макрохромосомах), хотя

именно они считались обедненными генами при анализе распределения белок-кодирующих последовательностей (Родионов, 1996).

Присутствующие во фракции РНК, изолированной из ооцитов курицы, короткие РНК в наименее быстро мигрирующей (верхней) зоне по размеру соответствуют РИWI-взаимодействующим РНК (piРНК) и обогащены в созревающих ооцитах (2–4 мм в диаметре). Такого рода короткие некодирующие РНК являются потенциальными претендентами на роль piРНК в транскриптоме ооцитов

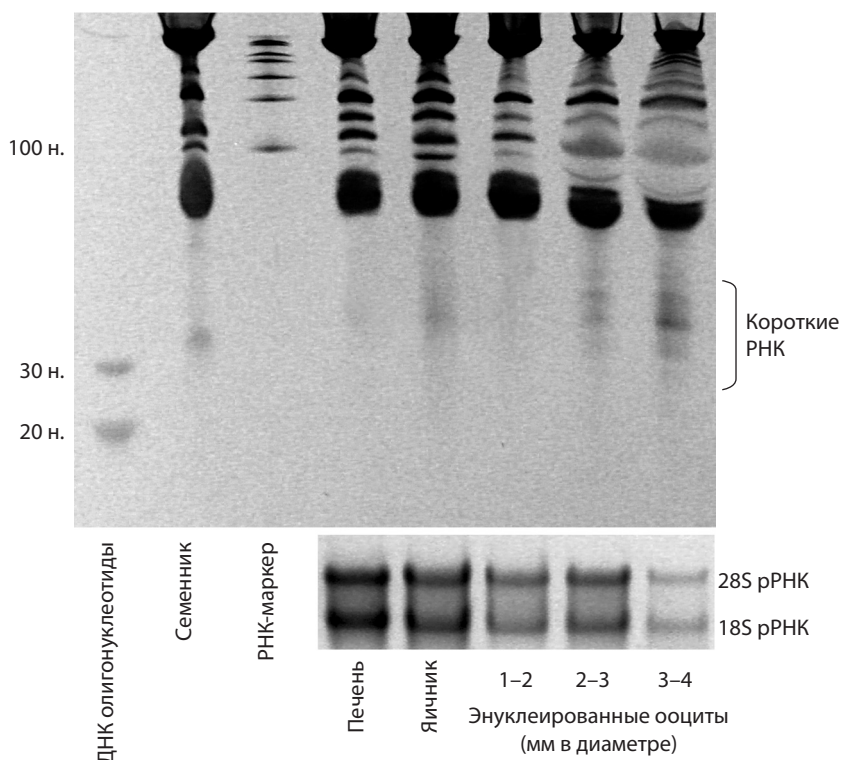


Рис. 2. Цитоплазма созревающих ооцитов курицы обогащена короткими РНК. Результат разделения коротких РНК из печени, яичника и энуклеированных ооцитов домашней курицы в 10 %-м ППА-геле (окрашивание бромистым этидием).

Верхняя панель: в качестве контроля нанесена общая РНК из семенников крыс линии Wistar массой 300 г, обогащенная короткими рiРНК (дорожка 2). В качестве маркеров молекулярного веса приведены олигонуклеотидные ДНК-маркеры (дорожка 1) и РНК-маркер (дорожка 3). В 15 %-м ППА-геле ДНК-олигонуклеотиды мигрируют на 10 % быстрее, чем РНК (Yang et al., 2012). Нижняя панель: представлен результат разделения в агарозном геле рибосомных РНК из тех же образцов.

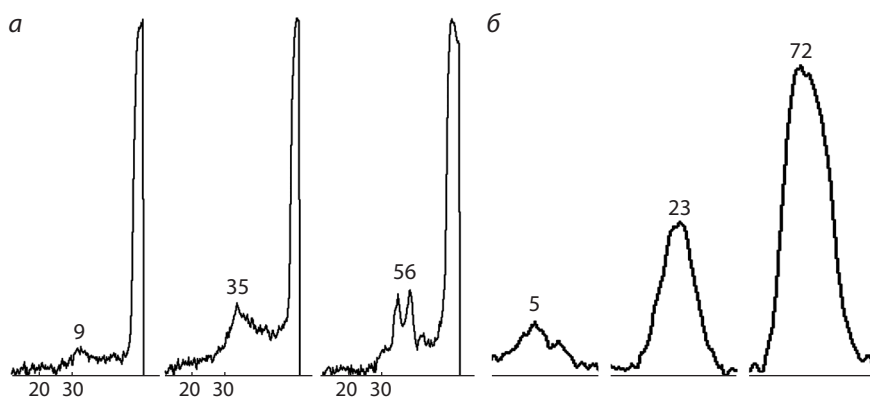


Рис. 3. Результаты денситометрии электрофореграмм препаратов РНК из разных тканей и ооцитов курицы после их разделения в ППА-геле.

а – профили экспрессии коротких РНК в разных тканях и в ооцитах курицы (слева направо): печень, яичник, энуклеированные ооциты. По оси *У* приведены интенсивности сигнала (в отн. ед.); по оси *Х* – длина молекул РНК относительно олигонуклеотидного ДНК-маркера (20 и 30 н.); *б* – количество коротких РНК на разных этапах созревания ооцитов курицы (слева направо): энуклеированные ооциты 1–2, 2–3, 3–4 мм в диаметре. По оси *У* приведены интенсивности сигнала (в отн. ед.).

домашней курицы и ранее не были охарактеризованы. рiРНК экспрессируются в половых клетках, участвуя в инактивации мобильных элементов генома и регуляции экспрессии специфичных для клеток яичника и/или семенников генов (Aravin, Hannon, 2008; Lau et al., 2009; Malone et al., 2009). У курицы рiРНК и рiРНК-подобные РНК были недавно охарактеризованы с помощью технологии секвенирования следующего поколения (NGS) в семенниках (Yang et al., 2012; Zhang et al., 2013) и в ранних эмбрионах (Shao et al., 2012), в том числе в клетках зародышевого пути (Rengaraj et al., 2014), но не в растущих ооцитах.

Обнаруженные нами в цитоплазме энуклеированных ооцитов курицы промежуточные по размеру короткие РНК (средняя зона среди коротких РНК) являются претендентами на эндогенные малые интерференционные РНК (endo-siРНК). Такие короткие РНК вряд ли могут представлять собой молекулы, участвующие в инактивации ретротранспозонов семейства LINE (CR1 в геноме курицы), поскольку большинство повторов этого семейства в геноме курицы представлены инактивированными копиями с усеченными или мутированными 5'UTR-промоторами, а контроль их экспрессии не зависит от пути интерференции РНК, инициируемой РНКазой III Dicer (Lee et al., 2009).

Мы предполагаем, что появление эндогенных siРНК в клетках *G. g. domesticus* может обеспечиваться процессингом двухцепочечных длинных или содержащих шпилечные структуры РНК – продуктов транскрипции LTR-ретротранспозонов и сателлитных повторов ДНК. Подобного рода короткие siРНК были охарактеризованы в ооцитах мыши (Watanabe et al., 2006). Ранее мы показали, что тандемно повторяющиеся последовательности активно транскрибируются на хромосомах типа ламповых щеток в ооцитах курицы, а транскрипция некоторых повторов ДНК (повторы CNM, PO41) осуществляется с обеих нитей, что может приводить к генерации комплементарной им двухцепочечной РНК (Krasikova et al., 2006; Deryusheva et al., 2007). Мы предполагаем, что синтезируемые

на стадии хромосом типа ламповых щеток в ооцитах птиц транскрипты тандемных и диспергированных повторов ДНК процессируются с образованием коротких регуляторных РНК (вероятно, siРНК и piРНК). Образующиеся короткие регуляторные РНК накапливаются в цитоплазме ооцита и, предположительно, могут быть использованы на ранних стадиях эмбриогенеза.

Основная функция подобных регуляторных РНК материнского происхождения – регуляция эмбрионального генома механизмом котранскрипционного сайленсинга. При этом короткие регуляторные РНК материнского происхождения могут принимать участие в образовании гетерохроматина в отсутствие собственных регуляторных транскриптов, синтезированных в эмбрионе. Действительно, короткие регуляторные РНК обнаружены на самых ранних стадиях эмбриогенеза домашней курицы (Shao et al., 2012). Таким образом, передаваемые с цитоплазмой ооцита птиц короткие регуляторные РНК могут служить своего рода эпигенетическими детерминантами, переносящими эпигенетическую информацию в ряду поколений.

Благодарности

Исследования проводились при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-14-00131. Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра «Хромас» Санкт-Петербургского государственного университета.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Родионов А.В. MICRO vs. MACRO: сравнительный анализ молекулярной и функциональной организации микро- и макро-хромосом птиц. *Генетика*. 1996;32(5):597-608.

Anderson D.M., Smith L.D. Patterns of synthesis and accumulation of heterogeneous RNA in lampbrush stage oocytes of *Xenopus laevis* (Daudin). *Dev Biol*. 1978;67(2):274-285.

Aravin A.A., Hannon G.J. Small RNA silencing pathways in germ and stem cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2008;73: 283-290.

Cogburn L.A., Porter T.E., Duclos M.J., Simon J., Burgess S.C., Zhu J.J., Cheng H.H., Dodgson J.B., Burnside J. Functional genomics of the chicken – a model organism. *Poult Sci*. 2007;86(10): 2059-2094.

Deryusheva S., Krasikova A., Kulikova T., Gaginskaya E. Tandem 41-bp repeats in chicken and Japanese quail genomes: FISH mapping and transcription analysis on lampbrush chromosomes. *Chromosome*. 2007;116(6):519-530.

Elis S., Batellier F., Couty I., Balzergue S., Martin-Magniette M.L., Monget P., Blesbois E., Govoroun M.S. Search for the genes involved in oocyte maturation and early embryo development in the hen. *BMC Genomics*. 2008;9:110.

Fair T., Carter F., Park S., Evans A.C., Lonergan P. Global gene expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. *Theriogenology*. 2007;68:S91-S97.

Froman D.P., Kirby J.D., Rhoads D.D. An expressed sequence tag analysis of the chicken reproductive tract transcriptome. *Poult. Sci*. 2006;85(8):1438-1441.

Gaginskaya E.R., Chin S.H. Peculiarities of oogenesis in the chicken. II Follicular period in oocyte development. *Ontogenes*. 1980;11:13-221.

Gardner E.J., Nizami Z.F., Talbot C.C. Jr., Gall J.G. Stable intronic sequence RNA (sisRNA), a new class of noncoding RNA from the oocyte nucleus of *Xenopus tropicalis*. *Genes Dev*. 2012;26(22):2550-2559.

Gilbert A.B., Perry M.M., Waddington D., Hardie M.A. Role of atresia in establishing the follicular hierarchy in the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J. Reprod Fertil*. 1983;69:221-227.

Greenfield M.L. The oocyte of the domestic chicken shortly after hatching, studied by electron microscopy. *J. Embryol. Exp. Morphol*. 1966;15:297-316.

Huang Z., Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Mol. Hum. Reprod*. 2010;16(10):715-725.

Hutchison N. Lampbrush chromosomes of the chicken, *Gallus domesticus*. *J. Cell Biol*. 1987;105:1493-1500.

Kawano M., Kawaji H., Grandjean V., Kiani J., Rassoulzadegan M. Novel small noncoding RNAs in mouse spermatozoa, zygotes and early embryos. *PLoS One*. 2012;7(9):e44542.

Krasikova A., Deryusheva S., Galkina S., Kurganova A., Evteev A., Gaginskaya E. On the positions of centromeres in chicken lampbrush chromosomes. *Chromosome Res*. 2006;14(7):777-789.

Krasikova A., Khodyuchenko T., Maslova A., Vasilevskaya E. Three-dimensional organisation of RNA-processing machinery in avian growing oocyte nucleus. *Chromosome Res*. 2012;20(8):979-994.

Lau N.C., Ohsumi T., Borowsky M., Kingston R.E., Blower M.D. Systematic and single cell analysis of *Xenopus* Piwi-interacting RNAs and Xiwi. *EMBO J*. 2009;28(19):2945-2958.

Lee S.H., Eldi P., Cho S.Y., Rangasamy D. Control of chicken CR1 retrotransposons is independent of Dicer-mediated RNA interference pathway. *BMC Biol*. 2009;7:53.

Malone C.D., Brennecke J., Dus M., Stark A., McCombie W.R., Sachidanandam R., Hannon G.J. Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell*. 2009;137(3):522-535.

Nie H., Crooijmans R.P., Bastiaansen J.W., Megens H.J., Groenen M.A. Regional regulation of transcription in the chicken genome. *BMC Genomics*. 2010;11:28.

Rengaraj D., Lee S.I., Park T.S., Lee H.J., Kim Y.M., Sohn Y.A., Jung M., Noh S.J., Jung H., Han J.Y. Small non-coding RNA profiling and the role of piRNA pathway genes in the protection of chicken primordial germ cells. *BMC Genomics*. 2014;15:757.

Shao P., Liao J.Y., Guan D.G., Yang J.H., Zheng L.L., Jing Q., Zhou H., Qu L.H. Drastic expression change of transposon-derived piRNA-like RNAs and microRNAs in early stages of chicken embryos implies a role in gastrulation. *RNA Biol*. 2012;9(2):212-227.

Simeoni I., Gilchrist M.J., Garrett N., Armisen J., Gurdon J.B. Widespread transcription in an amphibian oocyte relates to its reprogramming activity on transplanted somatic nuclei. *Stem Cells Dev*. 2012;21(2):181-190.

Watanabe T., Takeda A., Tsukiyama T., Mise K., Okuno T., Sasaki H., Minami N., Imai H. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev*. 2006;20(13):1732-1743.

Yang H., Wang X., Liu X., Liu X., Li L., Hu X., Li N. Cloning and expression analysis of piRNA-like RNAs: adult testis-specific small RNAs in chicken. *Mol. Cell Biochem*. 2012;360(1/2):347-352.

Zagris N., Kalantzis K., Guialis A. Activation of embryonic genome in chick. *Zygote*. 1998;6(3):227-231.

Zhang Y., Li J., Chen R., Dai A., Luan D., Ma T., Hua D., Chen G., Chang G. Cloning, characterization and widespread expression analysis of testicular piRNA-like chicken RNAs. *Mol. Biol. Rep*. 2013;40(4):2799-2807.