

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00289

# ICSI精子遗传和表观遗传学缺陷

葛少钦<sup>1</sup>, 康现江<sup>2</sup>, 段斐<sup>1</sup>

1. 河北大学医学部, 保定 071000;
2. 河北大学生命科学学院, 保定 071000

**摘要:** 卵胞浆内精子注射(Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)技术可用于男性少精、弱精、精子畸形、无精子和常规体外受精周期失败等, 克服了精子数量不足甚至直接从附睾、睾丸获取精子来治疗不育。该技术直接将单个精子注射入卵子, 因违背自然受精的生物学法则而具有很大的遗传风险。文章对 ICSI 精子遗传缺陷和表观遗传缺陷及其相关疾病进行综述, 可进一步认识 ICSI 精子遗传与表观遗传缺陷导致后代遗传风险增加的分子的机理, 文章阐述了 ICSI 精子有待于通过 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化等表观遗传因子进行严格质量控制, 切实降低 ICSI 遗传及表观遗传缺陷风险的必要性。

**关键词:** ICSI; 精子; 遗传; 表观遗传; 风险

## The genetic and epigenetic defect from the sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

GE Shao-Qin<sup>1</sup>, KANG Xian-Jiang<sup>2</sup>, DUAN Fei<sup>1</sup>

1. Hebei University Health Science Center, Baoding 071000, China;
2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071000, China

**Abstract:** Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) can be applied to treat male infertility patients of oligospermia, asthenospermia, teratospermia, azoospermia and failure of the common in-vitro fertilization (IVF), which may overcome the sperm deficiency and even obtain sperms directly from percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) and testicular sperm extraction (TESE). As for direct injection of a single sperm into an egg, the ICSI disobeys the biological laws of natural insemination, thus leading to high genetic and epigenetic risk for patients owing to genetic and epigenetic defect of sperm. By reviewing the genetic and epigenetic defects of ICSI sperm, as well as related diseases, this article aims at understanding of the risks resulting from the genetic and epigenetic defects of ICSI sperm at a molecular mechanism level. The results show that the quality control of ICSI sperm via detecting its epigenetic factors, such as methylated DNA and acetylated histone, is essential for reducing the genetic and epigenetic risk from ICSI.

**Keywords:** intracytoplasmic sperm injection(ICSI); sperm; genetic; epigenetic; risk

大量研究发现, 普通人群中不孕夫妇数量正逐步增高<sup>[1]</sup>, 其中男性原因导致不育的比例占整个不育因素的 30%~50%<sup>[2]</sup>。按世界卫生组织所推荐的精

子质量标准<sup>[3]</sup>, 其中少精子症(精子计数 $<2\times 10^6/\text{mL}$ )和严重精子形态畸形症(严格正常形态 $<5\%$ )的男性不育患者, 精子透明带结合反应缺陷的发生率很高

收稿日期: 2009-08-16; 修回日期: 2009-10-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:30371115), 河北省卫生厅医学科学研究计划项目(编号:2009173), 河北省计生委科研计划项目(编号:2009-B16), 河北省教育厅自然科学基金计划项目(编号:2009105)和河北大学博士基金(编号:2007B06)资助

作者简介: 葛少钦(1967-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 动物分子与生化, 生殖生物学。E-mail: gesq67@sina.com; gesq67@163.com

(>70%), 这类患者用体外受精(*In-vitro* fertilization, IVF)治疗受精率会很低, 因此只能用卵胞浆内精子注射 (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 技术治疗<sup>[4]</sup>。

ICSI技术克服了精子数量不足或直接从附睾、睾丸获取精子来治疗不育, 是一种强迫性的受精行为, 不仅具有侵袭性、创伤性, 而且违背了自然受精的生物学法则, 具有很大的遗传风险<sup>[5]</sup>, 可能将染色体畸变、缺失或基因突变等遗传缺陷以及表观遗传缺陷传给下一代。

## 1 ICSI精子的遗传缺陷

多年来, 传统的精液常规分析一直是用于判断男性生育力的最基本临床指标。精液分析主要包括精子计数、存活率、活动率和精子形态。精子功能正常与否, 对临床选择 IVF 还是 ICSI 治疗不育症极为重要。因为 IVF 需要功能完全正常的精子才能受精, 而 ICSI 的受精只需要精子的正常核 DNA。

多项研究结果显示, 染色体异常率与精子数下降有关, 11 家综合资料统计<sup>[6]</sup>, 9 766 例少精子或无精子的男性不育患者中, 5.8%有染色体异常, 4.2%有性染色体异常, 1.5%有精子顶体异常, 而正常生育组男性上述异常率分别为 0.38%、0.14%、0.25%。由于少弱畸精子症及非阻塞性无精子症的染色体异常比率升高, 不育症父亲可经ICSI治疗将异常染色体传给后代。资料表明, 患不育症父亲经ICSI出生的后代性染色体异倍体率较正常有轻微升高。美国和欧洲<sup>[6]</sup> 1 447 例经ICSI治疗妊娠的综合结果中, 用射出精子、附睾精子和睾丸精子ICSI后妊娠的自然流产率分别为 24.6%、31.3%、33.3%, 出生的 1 455 个孩子中, 有 32 个 (2.2%)患有严重先天畸形。严重少精子症和不明原因无精子症的一些不育男性可以伴有Y染色体长臂的微缺失, Cram等<sup>[7]</sup>分析了 29 例无精子症和严重少精子症不育患者和他们经ICSI出生的孩子, 发现有 2 例患者及其孩子有Y染色体微缺失, 表明ICSI将基因缺失精子注射到卵胞浆而传给了后代。非阻塞性无精子症伴有AZF/DAZ基因缺失的患者, 经过睾丸精子胞浆内注射可以同样受孕, 有正常的胚胎发育和足月妊娠, 但由于DAZ基因缺失, 患者的儿子有不育症的危险。Levron等<sup>[8]</sup>对非镶嵌型 47, XXY患者睾丸组织中的精子细胞进行FISH

分析发现绝大多数精子染色体核型正常。

总之, 原发性睾丸功能低下症中最常见的Klinefelter综合征(47, XXY)表现为严重少精或无精, 但其睾丸中产生的精子细胞可用ICSI技术使卵子受精; ICSI患者中约 3%是 46, XY/47, XXY 嵌合体<sup>[9]</sup>, 47, XYY男性尽管精子发生产生阻滞, 但可借助ICSI技术再生育; 易位畸变相互易位和罗伯逊易位两种, 在不育男性中的发生率为 8.9%, ICSI技术的应用会明显增加不平衡易位染色体异常婴儿的出生, 但平衡易位携带者患者可产生染色体正常的婴儿, 强调做胚胎植入前诊断或产前诊断; 特发性少精子症或无精子症中大约有 15%存在无精子因子 (Azoospermia factor, AZF)基因缺失<sup>[10]</sup>; Akin等<sup>[11]</sup>首先从分子水平证实雄激素受体(Androgen receptor, AR)基因异常可引起生精功能受损等。

这些不育男性可通过ICSI技术将异常基因传递给后代, 针对该情况, 推出了相应的遗传学检测手段, 如染色体核型分析、胚胎植入前的遗传学诊断、妊娠后的产前诊断、AZF微缺失筛查、FISH技术检测精子染色体数目异常、新生儿的遗传学筛查和随访等, 尽管能在一定程度上降低遗传病的遗传风险<sup>[12]</sup>, 但是如何确保所用精子无遗传缺陷, 提高生育安全, 尚有待深入研究。

## 2 ICSI精子的表观遗传缺陷

精子表观遗传修饰, 如DNA甲基化、基因组印记、组蛋白修饰、RNA沉默等, 对保证单倍体雄性配子细胞核正常并于卵胞浆内触发正常胚胎发育的级联事件是必需的<sup>[13]</sup>。精子发生过程中或胚胎植入前阶段发生不完全的表观遗传修饰会导致早期流产、胚胎发育和出生后遗传表型异常<sup>[14]</sup>。

加拿大一项研究表明, 2007 年通过辅助生殖技术(Assisted reproductive technology, ART)受孕出生的孩子患有自然缺陷情况比自然出生的孩子几乎要多 60%, 其中一些缺陷与骨骼、肌肉和心脏相关, 而大多数缺陷是与肠胃有关<sup>[15]</sup>。与自然受孕相比, 采用辅助生殖技术出生的孩子有大约 50%更可能小于胎龄(Small for gestational age, SGA)出生, 并且约 30%~40%更有可能一出生就伴有先天缺陷<sup>[16]</sup>。随研究的进一步深入, 发现辅助生殖技术出生的孩子患有早产、出生重量低、性染色体异常、畸形或印记

紊乱疾病的风险增加, 其中表观遗传缺陷会导致一些疾病的发生<sup>[17]</sup>。

精子发生过程中至少某些阶段的表观遗传印记是必要的, 因为缺乏印记的雄配子基因组在成熟卵母细胞中不能获得所有的印记。应该强调的是, 向卵母细胞内注入无印记的未成熟雄性睾丸或附睾精子细胞核, 受精能预期发生但会导致胚胎致死, 其部分原因来自于不恰当的基因沉默或印记基因激活异常的胚胎外组织<sup>[18]</sup>。

雄性配子在精子形成过程中经历的另一种改变是细胞核蛋白(低双硫键蛋白)被鱼精蛋白(高双硫键蛋白)替代。卵胞浆注射早期单倍体雄性配子, 配子组蛋白在卵子细胞质中会影响其DNA, 致使圆形精子细胞核注射(Round spermatid nuclei injections, ROSNI)或圆形精子注射(Round spermatid injections, ROSI)后围绕圆形精子DNA的低双硫键组蛋白成为ICSI技术低效的一个因素。相反, 成熟精子ICSI之后, 其鱼精蛋白在卵浆中会保护精子DNA。对卵注射早期精子, 鱼精蛋白的缺乏会对注射精子DNA的存活产生不利影响<sup>[19]</sup>。

## 2.1 DNA甲基化与基因组印记

一些研究认为DNA异常甲基化形式与ICSI疾病之间存在因果关系<sup>[15]</sup>。DNA在不同甲基化域(Differentially methylated regions, DMRs)的甲基化是控制印记基因中等位基因特异性表达的调节机制之一。亲本甲基化印记在原始生殖细胞被擦除, 在精子发生和卵子发生期间又各自从新建立, 并保留到合子发育过程中。印记擦除、印记的从新建立和印记的保留错误都会导致印记基因缺陷(紊乱)<sup>[20]</sup>, 这些缺陷不影响DNA序列, 而主要表现为表观遗传修饰的改变<sup>[14]</sup>。

Kobayashi等<sup>[21]</sup>的研究显示, 不育男人的精子会含有不正确的印记基因, 具有将此缺陷基因遗传给子孙的更高风险。而且, 他们发现在射出的精子中, 错误印记发生在母本甲基化域比发生在父本甲基化域更常见。在几个母本甲基化位置如*PEG1*、*KCNQ1OT1*、*PLAGL1*、*PEG3*和*SNRPN*的印记错误可能是印记擦除错误的结果。这样, 患有精子减少症父亲的精子很可能会携带一个不正确的印记(在*KCNQ1OT1*和*PEG1*位置的超甲基化)传递给孩

子。通过对Prader-Willi综合征病人的研究, 认为携带印记错误的染色体总是从祖母那遗传而来<sup>[22]</sup>, 这充分说明其发生了印记擦除错误。

David<sup>[16]</sup>检测到的特殊印记异常是*KCNQ1OT1*基因座的父本拷贝超甲基化。该基因座超甲基化最能体现精子发生过程中先前印记擦除失败, 并可能与雄性不育相关。鉴于在该位置与之相对的母本印记改变(母本拷贝超甲基化)会引起过度发育综合征(Beckwith-Wiedemann syndrome, BWS), 推测*KCNQ1OT1*基因座父本拷贝基因超甲基化可能是SGA的原因。

另外, 亲本等位基因共表达被认定为是一种丢失印记基因的情况, 与肿瘤发生相连锁<sup>[23, 24]</sup>。

近年来, 几种基因组范围的研究表明, 哺乳动物DNA甲基化情况具有组织特异性<sup>[25-29]</sup>。通过整体聚类分析(Global clustering analysis), 发现ES细胞(Embryonic stem cells)、EG细胞(Embryonic germ cells)和精子的甲基化形式惊人相似, 表明精子虽然属于高度特化的细胞类型, 但其启动子基因组表观遗传大多已经进行程序重排并且类似于可塑状态<sup>[30]</sup>。DNA甲基化可以作为评价精子质量的生物学标志<sup>[31]</sup>。

## 2.2 组蛋白修饰

组蛋白的氨基酸残基可以发生许多修饰, 包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化、ADP核糖基化等。这些修饰通过影响组蛋白与DNA以及组蛋白与组蛋白之间的相互作用, 来改变染色质的结构。不论在精子发生过程中还是在受精过程中, 组蛋白修饰对染色质重组起着至关重要的作用。

雄性配子在体内精子形成过程中经历细胞核组蛋白被鱼精蛋白替代, 精子细胞核染色体被鱼精蛋白紧密包裹。有趣的是, 人类精子中将近15%的DNA没有被鱼精蛋白凝缩并且还和组蛋白保持联合<sup>[32]</sup>, 组蛋白、鱼精蛋白分别和不同序列DNA特异性结合而各自分布<sup>[33]</sup>, 如图1。

很清楚, 人正常精子细胞核组蛋白与鱼精蛋白并非自由分布, 而是组织到特定区域, 精子染色质以非随机形式分布在组蛋白和鱼精蛋白之中<sup>[35]</sup>。15%组蛋白在核周使该部分染色质呈现一个紧密程度较低的排列状态, 这可能是受精后允许卵子对其机制进行干预的起始部位<sup>[36]</sup>。

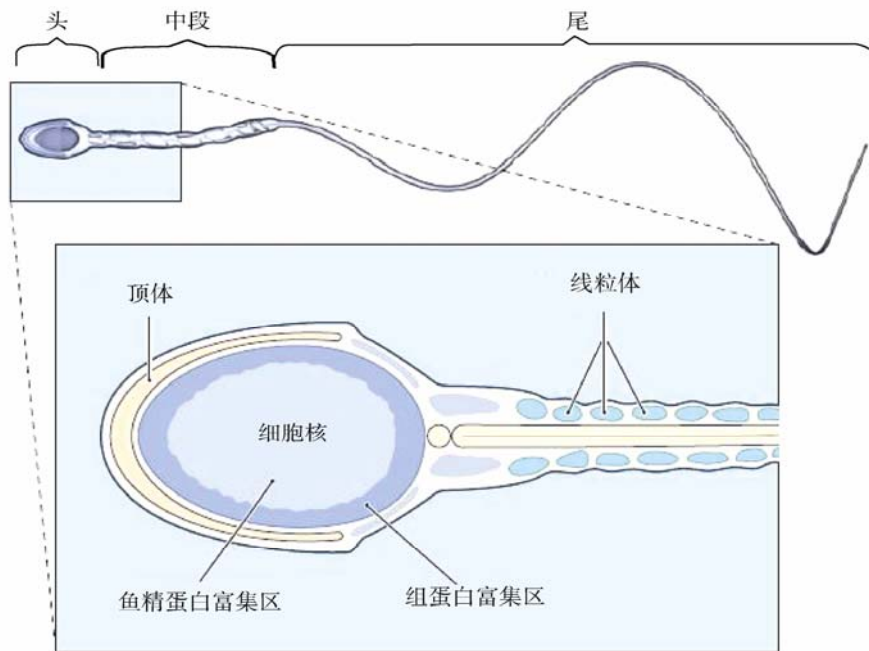


图 1 人精子细胞核组蛋白和鱼精蛋白的分布<sup>[34]</sup>

精子头部包括细胞核和顶体,在精子细胞核中,集中在核周的是组蛋白富集区,而中央是鱼精蛋白富集区。

细胞核周边端粒呈簇存在,是染色体末端防止染色体进行重排的帽子结构,使染色体末端不至于被误认为是DNA断裂<sup>[37]</sup>。它是精子细胞核结构中受精后形成雄性原核时期最早对卵细胞信号发生反应的结构之一<sup>[38]</sup>。精子细胞核组蛋白区域的DNA序列在受精和早期胚胎发育过程中具有特殊的作用<sup>[39]</sup>。精子细胞核的独特包装可能是雄性基因组在受精期间恰当卸去包装<sup>[35,40]</sup>进行去浓缩和重组<sup>[41]</sup>所必需的。

细胞核的核组蛋白成分在受精后能作为组蛋白替代鱼精蛋白的模板,这能够通过染色质重塑子和诸如H4K8ac和H4K12ac乙酰化组蛋白的结合所引起,H4K8ac和H4K12ac出现在受精之前的细胞核<sup>[42]</sup>。精子染色质内与DNA结合的鱼精蛋白被来自卵细胞的组蛋白或乙酰化组蛋白代替,染色质便完成了由精子型向体细胞型的转化。研究人精子细胞核周乙酰化H4蛋白在不同形态精子细胞核的存在状态,有利于揭示畸形精子的发生和精子遗传疾病的发病机理。

最近,已经得到了许多精子表观遗传对复杂疾病影响的证据,其中DNA甲基化与组蛋白修饰共同发挥作用,二者或其中之一功能异常都会导致减少受精、妨碍胚胎发生、降低胚胎植入和妊娠率<sup>[43]</sup>。

研究表观遗传因子与不育或胚胎发生的关系还

处于起步阶段,表观遗传异常的临床影响还有待于更进一步研究。通过对遗传和表观遗传缺陷的遗传风险进行检测与评价,以提供比较安全的不育治疗方案。

### 3 问题与展望

伴随不孕夫妇的逐步增多,通过辅助生殖技术ICSI来治疗男性不育已在全世界广泛应用,使不育男性成为生物学父亲成为了现实。然而,在大多数不育雄性中,其不育病因是不知道的(如原发性的),用该治疗男性不育有可能将遗传和表观遗传疾病传给下一代。这是大多数生殖学家推荐在应用ICSI技术前进行临床和实验室评估的原因。

把不育雄性的遗传与表观遗传缺陷与其精液质量和生殖潜力联系起来,分离出高质量核DNA精子的方法是学者们始终关注的焦点。Marchesi等<sup>[41]</sup>强调,必须收集数据以建立起传统的精液分析参数与精子完整DNA之间的明确关系,尽管这些资料在临床实践中会暂时表现为有争议和无用的,但等到诊断和治疗精子DNA的新技术建立起来,这些资料就可以应用于临床之中。Sun等<sup>[44]</sup>认为一个人凭直觉会期待从精子大小反应出内在染色体的改变,这表明人们期望看到精子形态和遗传异常之间存在的关系。



我们实验室正试图建立精子细胞核 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化的表观遗传评价指标,并且与目前临床常规精液分析指标建立对应关系,从表观遗传因子水平对不同形态精子进行评价,切实控制 ICSI 精子质量,降低 ICSI 技术对后代造成的遗传与表观遗传疾病风险。

另外,还要评价采用 ICSI 技术时向胚胎或后代传递遗传和表观遗传缺陷的可能性。对于雄性 XY 型胚胎,已证明其在胎儿或新生儿时期主要的遗传或表观遗传缺陷会剧烈地表现出来<sup>[45]</sup>,但雄性 XY 型胚胎较次要的遗传缺陷可能不直接影响胚胎的早期发育而对新生儿生殖潜力损害严重。

作为普遍应用和具有显著成效的生殖技术,ICSI 的发展强调了从两个方向进行彻底评估和实验室检查的必要性<sup>[13]</sup>:第一个方向是对 ICSI 技术出生的孩子进行随访;第二个是分析研究雄性不育的遗传原因。两方面的结果都会得出发病机理和雄性不育或原发性睾丸损伤在后代雄配子染色体异常中产生的作用。生殖学家和遗传学家的通力合作,综合考虑生殖技术程序中的遗传评价,严格控制 ICSI 精子质量,对降低现代辅助生殖技术 ICSI 应用的遗传风险很有必要。

## 参考文献(References):

- [1] Marchesi DE, Feng HL. Sperm DNA integrity from sperm to egg. *J Androl*, 2007, 28(4): 481–489. [\[DOI\]](#)
- [2] 朱健生, 季钢, 张玲, 洪名云, 王朝红, 姚桂东. 卵胞浆内单精子显微注射技术在男性不育症中的临床应用. *中国优生与遗传杂志*, 2008, 16(9): 106–107.
- [3] World Health Organization. WHO laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge, Cambridge University Press, 1999.
- [4] 刘德一, Gordon Baker HW. 精子功能检测与男性不育诊治的新进展. *中华男科学杂志*, 2007, 13(2): 99–109.
- [5] 杨建华. 辅助生殖技术中应注意的几个问题. *中国男科学杂志*, 2004, 18(5): 68–69.
- [6] Johnson MD. Genetic risk of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril*, 1998, 70(3): 397–411. [\[DOI\]](#)
- [7] Cram DS, Ma K, Bhasin S, Arias J, Pandjaitan M, Chu B, Audrins P, Saunders D, Quinn F, Dekretser D, McLachlan R. Y chromosome analysis of infertile men and their sons conceived through intracytoplasmic sperm injection: vertical transmission of deletions and rarity of de novo deletions. *Fertil Steril*, 2000, 74(5): 909–915. [\[DOI\]](#)
- [8] Levron J, Aviram-Goldring A, Madar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. Sperm chromosome analysis and outcome of IVF in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril*, 2000, 74(5): 925–929. [\[DOI\]](#)
- [9] Harari O, Bourne H, Baker G, Gronow M, Johnston I. High fertilization rate with intracytoplasmic sperm injection in mosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril*, 1995, 63(1): 182–184.
- [10] Berta PH. Chromosome Y et sterilité masculine. *Andrologie*, 1999, 9(3): 333–341. [\[DOI\]](#)
- [11] Akin JW, Behzadian A, Tho SPT, McDonough PG. Evidence for a partial deletion in the androgen receptor gene in a phenotypic male with azoospermia. *Am J Obstet Gynecol*, 1991, 165(6): 1891–1894.
- [12] 李娟, 王克华, 张琦, 董云玲, 孟祥阁. ICSI 技术治疗男性不育的遗传学风险. *国外医学计划生育学分册*, 2002, 21(1): 8–10.
- [13] Georgiou I, Syrrou M, Pardalidis N, Karakitsios K, Mantzavinos T, Giotitsas N, Loutradis D, Dimitriadis F, Saito M, Miyagawa I, Tzoumis P, Sylakos A, Kanakas N, Moustakareas T, Baltogiannis D, Touloupides S, Giannakis D, Fatouros M, Sofikitis N. Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl*. 2006, 8 (6): 643–673. [\[DOI\]](#)
- [14] 杨滨, 夏欣一, 黄宇烽, 许晓风. 精子的表观遗传学研究进展. *中华男科学杂志*, 2007, 13(12): 1125–1129.
- [15] Nair P. As IVF becomes more common, some concerns remain. *Nat Med*, 2008, 14(11): 1171. [\[DOI\]](#)
- [16] Amor DJ. Genomic imprinting, small babies and assisted reproduction. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(1): 1–2. [\[DOI\]](#)
- [17] Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum Reprod Update*, 2005, 11(5): 473–482. [\[DOI\]](#)
- [18] Ferguson-Smith AC, Surani MA. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science*, 2001, 293(5532): 1086–1089. [\[DOI\]](#)
- [19] Sofikitis N, Miyagawa I, Yamamoto Y, Loutradis D, Loutradis D, Mantzavinos T, Tarlatzis V. Micro- and macro-consequences of ooplasmic injections of early haploid male gametes. *Hum Reprod Update*, 1998, 4(3): 197–212. [\[DOI\]](#)
- [20] De Rycke M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum Reprod*. 2002, 17(10): 2487–2494. [\[DOI\]](#)

- [21] Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, Sasaki H, Yaegashi N, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(21): 2542–2551. [\[DOI\]](#)
- [22] Kanber D, Buiting K, Zeschnick M, Ludwig M, Horsthemke B. Low frequency of imprinting defects in ICSI children born small for gestational age. *Eur J Hum Genet*, 2009, 17(1): 22–29. [\[DOI\]](#)
- [23] Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, Wu Y, He X, Powe NR, Feinberg AP. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science*, 2003, 299(5613): 1753–1755. [\[DOI\]](#)
- [24] Jelinic P, Shaw P. Loss of imprinting and cancer. *J Pathol*, 2007, 211(3): 261–268. [\[DOI\]](#)
- [25] Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL, Lewin J, Tost J, Cox AV, Andrews TD, Howe KL, Otto T, Olek A, Fischer J, Gut IG, Berlin K, Beck S. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: A pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biol*, 2004, 2(12): 2170–2182.
- [26] Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox TV, Davies R, Down TA, Haefliger C, Horton R, Howe K, Jackson DK, Kunde J, Koenig C, Liddle J, Niblett D, Otto T, Pettett R, Seemann S, Thompson C, West T, Rogers J, Olek A, Berlin K, Beck S. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet*, 2006, 38(12): 1378–1385. [\[DOI\]](#)
- [27] Khulan B, Thompson RF, Ye K, Fazzari MJ, Suzuki M, Stasiek E, Figueroa ME, Glass JL, Chen Q, Montagna C, Hatchwell E, Selzer RR, Richmond TA, Green RD, Melnick A, Greally JM. Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: The HELP assay. *Genome Res*, 2006, 16(8): 1046–1055. [\[DOI\]](#)
- [28] Kitamura E, Igarashi J, Morohashi A, Hida N, Oinuma T, Nemoto N, Song F, Ghosh S, Held WA, Yoshida-Noro C, Nagase H. Analysis of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) in humans. *Genomics*, 2007, 89(3): 326–337. [\[DOI\]](#)
- [29] Illingworth R, Kerr A, DeSousa D, Jørgensen H, Ellis P, Stalker J, Jackson D, Clee C, Plumb R, Rogers J, Humphray S, Cox T, Langford C, Bird A. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol*, 2008, 6(1): 0037–0051. [\[DOI\]](#)
- [30] Farthing CR, Ficiz G, Ng RK, Chan CF, Andrews S, Dean W, Hemberger M, Reik W. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet*, 2008, 4(6): 1–17. [\[DOI\]](#)
- [31] Benchaib M, Braun V, Ressenikof D, Lornage J, Durand P, Niveleau A, Guérin JF. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod*, 2005, 20(3): 768–773. [\[DOI\]](#)
- [32] Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisrachai P. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res*, 1978, 117(2): 347–356. [\[DOI\]](#)
- [33] Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*, 1987, 236(4804): 962–964. [\[DOI\]](#)
- [34] Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ*, 2006, 175(5): 495–500.
- [35] Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem*, 2003, 278(32): 29471–29477. [\[DOI\]](#)
- [36] Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Gierwerman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl*, 2006, 8(1): 11–29. [\[DOI\]](#)
- [37] Shafik A, Shafik AA, Shafik I, El Sibai O. Sperm DNA fragmentation. *Arch Androl*, 2006, 52(3): 197–208. [\[DOI\]](#)
- [38] Zalenskaya IA, Bradbury EM, Zalensky AO. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279(1): 213–218. [\[DOI\]](#)
- [39] Nazarov IB, Shlyakhtenko LS, Lyubchenko YL, Zalenskaya IA, Zalensky AO. Sperm chromatin released by nucleases. *Syst Biol Reprod Med*, 2008, 54(1): 37–46. [\[DOI\]](#)
- [40] Zalensky A, Zalenskaya I. Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(3): 609–611. [\[DOI\]](#)
- [41] Li Y, Lalancette C, Miller D, Krawetz SA. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl*, 2008, 10(4): 535–541. [\[DOI\]](#)
- [42] van der Heijden GW, Derijck AA, Ramos L, Giele M, van der Vlag J, de Boer P. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol*, 2006, 298(2): 458–469. [\[DOI\]](#)
- [43] Nanassy L, Carrell DT. Paternal effects on early embryogenesis. *JECAR*, 2008, 5(2): 1–9.
- [44] Sun F, Ko E, Martin RH. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4(1): 1. [\[DOI\]](#)
- [45] Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol*, 2002, 4 (Suppl.): 41–49.