



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

11282
7

ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN KALLMANN
Y EN EL GEN DEL RECEPTOR DE LA HORMONA
LIBERADORA DE GONADOTROPINAS EN
PACIENTES CON HIPOGONADISMO
HIPOGONADOTROPICO

296015
510962

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A :
DANIELA NORA SÖDERLUND SEOANE

TUTOR: DR. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN KALLMANN Y EN EL GEN
DEL RECEPTOR DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS EN
PACIENTES CON HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROPICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

DANIELA NORA SÖDERLUND SEOANE

TUTOR: DR JUAN PABLO MENDEZ BLANCO

MEXICO D.F.

2001

A GEORGINA

ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN KALLMANN Y EN EL GEN DEL RECEPTOR DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS EN PACIENTES CON HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROPICO

RESUMEN

Los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico se presentan con infantilismo sexual debido a una deficiencia en la síntesis de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y/o de las gonadotropinas. Estos sujetos se clasifican en hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático y síndrome de Kallmann (en el cual existen anosmia o hiposmia asociadas).

En esta tesis, investigamos la presencia de mutaciones en el gen KAL así como en el gen del receptor de GnRH en 3 familias con hipogonadismo hipogonadotrópico, en 14 sujetos con hipogonadismo hipogonadotrópico esporádico y en 12 pacientes con síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X.

A cada paciente se le extrajo DNA para la amplificación y secuenciación de todos los exones de ambos genes.

Se encontraron tres mutaciones en el gen KAL en 3 sujetos con síndrome de Kallmann. Asimismo, una de las 3 familias con hipogonadismo hipogonadotrópico presentó una mutación previamente no descrita en el gen del receptor de GnRH. En los demás sujetos se evidenció la asociación de diversos polimorfismos en el gen KAL.

La ausencia de alteraciones moleculares en la mayoría de nuestros sujetos confirma estudios previos en los cuales no se han encontrado mutaciones en un alto porcentaje de estos pacientes. La presencia de alteraciones en regiones reguladoras de los promotores, en regiones no traducidas, dentro de los intrones, o bien la existencia de otro(s) gen(es) participante(s) deberán considerarse como posibles explicaciones para la presencia de hipogonadismo en estos individuos.

MUTATIONAL STUDY OF THE KAL GENE AND THE GONADOTROPIN RELEASING HORMONE RECEPTOR GENE IN PATIENTS WITH HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM

ABSTRACT

Patients with hypogonadotropic hypogonadism present sexual infantilism due to impairment in the synthesis and/or release of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) and/or gonadotropins. These patients are classified in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome (where anosmia or hyposmia are associated).

In this thesis we investigated the presence of mutations in the KAL gene, as well as in the GnRH receptor gene in three families with hypogonadotropic hypogonadism, in 14 individuals with sporadic hypogonadotropic hypogonadism and in 12 patients with X-linked Kallmann syndrome.

DNA was extracted from blood leukocytes in all individuals and all exons of both genes were amplified and sequenced.

Three new mutations of the KAL gene were found in three patients with Kallmann syndrome. Likewise, one out of the three families with hypogonadotropic hypogonadism presented an undescribed mutation of the GnRH receptor gene. All the other individuals studied showed diverse polymorphisms of the KAL gene.

The absence of molecular defects in most of our patients confirms previous reports where no mutations have been found in the majority of these patients. The possibility of finding defects in the promoter regions, in untranslated regions, within the introns, or the participation of other(s) gene(s) should be considered.

INDICE

INTRODUCCION	1 - 17
Eje hipotálamo-hipófisis-gónada	1 - 6
Hipogonadismo hipogonadotrópico	6 - 7
Hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático	7 - 8
Síndrome de Kallmann	8 - 17
JUSTIFICACION	18
OBJETIVO. HIPOTESIS	19
PACIENTES Y METODOS	20 - 32
Criterios de inclusión y exclusión para sujetos y controles	20 - 21
Protocolo de estudio	22 - 26
Extracción de DNA genómico	27
Oligonucleótidos	28 - 29
Reacción en cadena de las polimerasas (PCR)	29
Purificación de los productos de PCR	30
Secuenciación	30 - 32
RESULTADOS	33 - 43
Gen KAL	33 - 41
Gen del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas	41 - 43
DISCUSION	44 - 50
AGRADECIMIENTOS	51
BIBLIOGRAFIA	52 - 68

INTRODUCCION

EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), un decapeptido sintetizado y secretado en el hipotálamo preóptico, es el responsable de la estimulación del gonadotropo (Matsuo *et al.*, 1971; Schally *et al.*, 1971). La síntesis y secreción de GnRH está regulada por la acción de varios neurotransmisores y neuroreguladores como por ejemplo: la acetilcolina, la noradrenalina y las endorfinas (Barraclough y Wise, 1982; Shivers *et al.*, 1983; García-Rubí *et al.*, 1992). Este péptido es secretado, siempre en forma pulsátil, por las terminales neuronales hacia una red capilar que rodea a la eminencia media; al alcanzar la circulación porta-hipofisiaria, es transportado hacia la hipófisis anterior donde estimula la síntesis y secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Bergland y Page, 1978).

La acción ejercida por la GnRH sobre la hipófisis anterior conduce a la síntesis y secreción de las gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH). Esta se inicia con la unión, por parte de la hormona, a su receptor específico localizado en la membrana citoplasmática del gonadotropo (Hazum y Conn, 1988), el cual se encuentra acoplado a proteínas G. Los receptores de esta familia se componen de una sola cadena polipeptídica y poseen siete asas hidrofóbicas, correspondientes a los siete dominios transmembranales, unidos por asas intra y extracelulares (Kakar *et al.*, 1992). Luego de la unión de la GnRH con su receptor las subunidades β y γ se separan de la subunidad α de la proteína G (q/11) y esta última activa a la fosfolipasa C (PLC) o a la adenil ciclasa (Stanislaus *et al.*, 1997; Cornea *et al.*, 1998; Grosse *et al.*, 2000). La activación de la PLC mediada por las proteínas G, da como resultado la hidrólisis del inositol 4,5-bisfosfato con la consecuente generación de inositol 1.4.5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (Snyder y Bleasdale, 1982; Huckle y Conn, 1988; Hawes y Conn, 1993). El DAG permanece unido a la membrana, en tanto que el IP₃ es soluble en el citoplasma y se une a su receptor en el retículo endoplásmico induciendo la liberación de calcio

de los depósitos intracelulares. Esto, junto con el calcio que ingresa a la célula por medio de los canales de membrana, resulta en un incremento de las concentraciones de calcio intracelular (Conn *et al.*, 1981; Chang *et al.*, 1988; Naor *et al.*, 1988; Naor *et al.*, 1998). El calcio interacciona con la fosfocinasa C (PKC) facilitando su transporte y adhesión a la membrana, donde la PKC se asocia al DAG para convertir a la PKC a su estado activado. La activación por el receptor de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) produce ácido araquidónico (Chang *et al.*, 1987; Liu y Jackson, 1989) y la de la fosfolipasa D da como resultado la formación de ácido fosfatídico (Zheng *et al.*, 1994). El incremento en la concentración de la adenil ciclasa por las proteínas G induce la producción de AMPc con la subsecuente activación de la proteincinasa A (PKA) (Turgeon y Waring, 1986; Bourne y Baldwin, 1987; Stanislaus *et al.*, 1997). Estas acciones inducen, en conjunto, tanto la síntesis como la liberación de las gonadotropinas hipofisarias (Catt y Stojilkovic, 1989; Conn *et al.*, 1995).

Las neuronas productoras de GnRH se originan a partir de la placa olfatoria, fuera del sistema nervioso central (SNC) (Wray *et al.*, 1989; Norgren y Lehman, 1991). Dicha placa es un adelgazamiento del ectodermo a partir del cual el epitelio se diferencia en neuronas olfatorias y neuronas productoras de GnRH. La mayoría de las neuronas productoras de GnRH se detectan a lo largo del trayecto del nervio olfatorio y una vez dentro del SNC se dispersan y alcanzan el bulbo olfatorio, el núcleo accumbens, el área preóptica y la región medio septal (Sullivan y Silverman, 1993), así como su destino final en el área preóptica del hipotálamo (Wray *et al.*, 1989; Wray, 2001).

Las gonadotropinas hipofisarias, junto con la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la tirotrópina, son glicoproteínas estructuralmente similares formadas por dos subunidades denominadas subunidad alfa y subunidad beta, unidas por fuerzas no covalentes. La alfa es idéntica entre estas glicoproteínas y está conformada siempre por la misma secuencia de aminoácidos (Fiddes y Talmadge, 1984; Gordon *et al.*, 1988), mientras que la beta es única para cada una de ellas y les confiere su especificidad biológica (Fiddes y

Talmadge, 1984; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). La actividad biológica de las glicoproteínas hipofisarias sólo se observa si ambas subunidades se encuentran unidas (Tsatsoulis *et al.*, 1991).

El gonadotropo responde solamente al estímulo de tipo pulsátil de la GnRH, pues al exponer a la glándula continuamente a la acción de esta hormona se observa una falta de respuesta al estímulo, al presentarse el fenómeno de regulación decreciente o de desensibilización por parte de los receptores de la hormona (Conn y Crowley, 1991; 1994). Este fenómeno es secundario a ciertos cambios en la concentración y/o afinidad del receptor y tiene como función fisiológica el prevenir la sobre-estimulación de la célula (Ascoli, 1982). Asimismo, se ha observado que tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de GnRH modulan el tipo de respuesta hipofisaria, además de que la frecuencia en la pulsatilidad de GnRH es modificada de acuerdo con el ambiente endócrino existente, habiéndose demostrado, por ejemplo, que esta frecuencia presenta variaciones a lo largo del ciclo ovulatorio (Marshall *et al.*, 1991).

Por otra parte, en el humano el patrón de secreción de GnRH se modifica constantemente durante el desarrollo sexual. En la vida fetal, la GnRH es detectada a partir de las 4.5 semanas de vida, habiéndose demostrado la presencia de neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo a partir de la novena semana de gestación, aunque la conexión entre estas neuronas y el sistema portal se observa en la semana 16 (Grumbach y Kaplan, 1990). El hallazgo de gonadotropinas indetectables en suero e hipófisis de fetos anencefálicos (Kaplan y Grumbach, 1976), así como la habilidad de la GnRH para inducir la síntesis del mRNA de la subunidad β de la LH, sugiere que la regulación de las gonadotropinas se encuentra mediada por la GnRH durante la vida fetal (Castillo *et al.*, 1992).

En el período neonatal se evidencia claramente la secreción de GnRH debido a la persistencia en la secreción pulsátil de gonadotropinas (Waldhauser *et al.*, 1981), las cuales disminuyen a concentraciones prepuberales a los 6 meses de vida en los varones y en los primeros dos años de vida en las mujeres

(Forest, 1990). Los mecanismos por los cuales el generador de pulsos de GnRH se encuentra detenido durante la infancia no han sido perfectamente dilucidados, pero se ha propuesto que es un proceso que inhibe la liberación de GnRH más que la síntesis de la misma (Wiemann *et al.*, 1989). Aunque el proceso que dispara el inicio de la secreción de GnRH es poco claro, se han propuesto cambios en neurotransmisores como el ácido γ -aminobutírico (Teresawa, 1995; Teresawa y Fernández, 2001), la noradrenalina (Ramírez *et al.*, 1984), el neuropéptido Y (Kalra *et al.*, 1992) o el aspartato (Mahachoklertwattana *et al.*, 1994); así como factores gliales tales como el factor transformador del crecimiento α (Ojeda *et al.*, 1995) y/o señales metabólicas como la leptina (Ahima *et al.*, 1997; García-Mayor *et al.*, 1997) como candidatos potenciales.

Al inicio de la pubertad existe una reactivación del eje en las primeras horas del sueño, que se caracteriza por un marcado incremento en la amplitud de los pulsos de LH inducidos por GnRH, con pocos cambios en la frecuencia de los mismos (Boyar *et al.*, 1974; Wu *et al.*, 1996). Este incremento nocturno en la secreción de LH estimula la secreción de esteroides sexuales y de inhibina por las gónadas. Conforme el proceso puberal progresa, la secreción de gonadotropinas se presenta durante todo el día, pero el patrón de pulsatilidad difiere en ambos sexos. En el hombre, se han reportado variaciones en los intervalos entre los pulsos en relación con los cambios en los esteroides sexuales, observándose los pulsos de LH cada 2 horas aproximadamente (Santen y Bardin, 1973; Veldhuis *et al.*, 1986; Spratt *et al.*, 1988). En la mujer durante la fase folicular temprana los pulsos de GnRH se presentan cada 90 minutos, la frecuencia aumenta a un pulso cada 60 minutos en la fase folicular media y tardía, y en la fase lútea dicha frecuencia disminuye a un pulso cada 4-6 horas, disminuyéndose a un pulso cada 6-8 horas en la fase lútea tardía (Hall *et al.*, 1992).

Las gonadotropinas hipofisarias ejercen su acción sobre las gónadas (testículos u ovarios) al

estimular la síntesis de esteroides sexuales, así como la maduración de los gametos (Chappel *et al.*, 1983; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1985; 1995). En el varón, la LH induce la síntesis y secreción de andrógenos en las células de Leydig, siendo el principal de éstos la testosterona; en la mujer, la LH estimula la esteroidogénesis ovárica (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1985; Veldhuis, 1991; Richards, 1994). En los testículos, el sitio primario de acción de la FSH es el epitelio de los túbulos seminíferos en donde se une a la cara basal de las células de Sertoli con la consecuente estimulación de la espermatogénesis, de la síntesis de la inhibina, la activina y de la proteína fijadora de andrógenos (Moore *et al.*, 1994). En el ovario, la FSH se une a sus receptores en las células de la granulosa para estimular el desarrollo folicular y al complejo enzimático de las aromatasas que convierten a los andrógenos en estrógenos (Catt y Dufau, 1976; Richards, 1994).

Las tres clases de esteroides secretados por las gónadas (estrógenos, progestágenos y andrógenos) se unen a receptores específicos en el hipotálamo y en la hipófisis e influyen directamente (retroalimentación negativa) en la secreción de gonadotropinas (Gharib *et al.*, 1987; Winters *et al.*, 1992). Existen otras tres hormonas gonadales diferentes a los esteroides, encargadas de regular la secreción de gonadotropinas. Estas incluyen a dos proteínas diméricas, la inhibina y la activina, y a una monomérica, la folistatina; todas ellas, son producidas por las gónadas además de ser sintetizadas en diversos tejidos como la hipófisis, el hígado, la placenta, la médula ósea, la glándula suprarrenal y el cerebro (Sawchenko *et al.*, 1988; Ying, 1988; Mason *et al.*, 1989; Shimasaki *et al.*, 1989; Krummen *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1994). La inhibina es un supresor selectivo de la síntesis y secreción de FSH tanto *in vivo* como *in vitro* (Rivier *et al.*, 1986); la activina, incrementa la síntesis y secreción de FSH, mientras que la folistatina actúa indirectamente al bionutralizar a la activina (Krummen *et al.*, 1993) o por medio de su asociación con cadenas de heparán sulfato de la membrana plasmática, lo cual favorece la unión de la activina a su receptor produciéndose su captación dentro de las células (Sugino *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1997).

Otros mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de gonadotropinas a nivel central incluyen a la prolactina, que inhibe la secreción de GnRH (Milenkovic *et al.*, 1994; Calogero *et al.*, 1996); a las gonadotropinas, que modulan la secreción de GnRH por el hipotálamo (asa corta de retroalimentación) o la GnRH, la cual puede influir directamente en su propia secreción (asa ultracorta de retroalimentación) (Marshall y Kelch, 1986).

HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROPICO

El hipogonadismo hipogonadotrópico es definido como aquella alteración en la cual los individuos afectados no presentan desarrollo gonadal ni de caracteres sexuales secundarios debido a deficiencia en la síntesis de GnRH y/o de gonadotropinas. Los individuos afectados presentan bajas concentraciones de gonadotropinas y esteroides sexuales (Crowley *et al.*, 1985; Layman, 1991). Se han descrito cuatro patrones de secreción de GnRH en hombres con hipogonadismo hipogonadotrópico (Seminara *et al.*, 1998). La mayoría de los pacientes (84%), no presentan pulsos de LH detectables (patrón apulsátil). En ellos no hay evidencia de maduración sexual y representan el grupo con la forma más severa de deficiencia de GnRH. En el segundo grupo, se demuestran pulsos de LH durante el sueño, hallazgo similar a lo descrito en la pubertad temprana (Boyar *et al.*, 1974). En el tercer patrón se demuestra una secreción pulsátil de GnRH, pero los pulsos de LH son de muy baja amplitud y por ello poco perceptibles, lo que sugiere un estado de pulsatilidad débil de la GnRH o una resistencia a la misma (de Roux *et al.*, 1997; Strobel *et al.*, 1998). El cuarto consiste en la presencia de una pulsatilidad normal de LH al cuantificar ésta por radioinmunoanálisis, pero con una bioactividad nula de la misma (Beitins *et al.*, 1977).

La mayoría de los sujetos con hipogonadismo hipogonadotrópico son secundarios a una deficiencia primaria y aislada en la síntesis de GnRH. Este padecimiento ha sido dividido en dos grandes grupos:

hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático y síndrome de Kallmann. En este último existen ausencia (anosmia) o disminución (hiposmia) de la olfacción asociadas (Layman, 1999).

El hipogonadismo hipogonadotrópico también puede ser secundario a alteraciones del sistema nervioso central, por ejemplo: tumores, traumatismos e infecciones, o bien puede estar asociado a otras entidades patológicas, por ejemplo: hipotiroidismo, síndrome de Cushing o anorexia nervosa (Van Binsbergen *et al.*, 1990; Snider, 1993).

Hipogonadismo Hipogonadotrópico Idiopático

En este padecimiento se han descrito individuos afectados cuyo patrón hereditario es autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado al cromosoma X; sin embargo, también han sido descritos un gran número de casos esporádicos (Crowley *et al.*, 1985; Rugarli *et al.*, 1993). El(los) gen(es) involucrado(s) en esta patología no ha(n) sido caracterizado(s).

En 1986, Mason *et al.* describieron una delección del gen de GnRH en ratones que presentaban una forma autosómica recesiva de hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático. Sin embargo, estudios en humanos no han podido caracterizar mutaciones en el gen de GnRH en pacientes con dicha alteración (Weiss *et al.*, 1989; Weiss *et al.*, 1991; Layman *et al.*, 1993). La mayoría de los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático responden a la administración exógena de GnRH al sintetizar y secretar gonadotropinas, pero la cantidad de las mismas es extremadamente variable (Bell *et al.*, 1973; Crowley *et al.*, 1985), razón por la cual fue sugerido que alteraciones en el gen del receptor de GnRH (GnRH-R) fuesen las responsables de esta entidad patológica (de Roux *et al.*, 1997). El gen del GnRH-R fue clonado y caracterizado inicialmente en el ratón (Tsutsumi *et al.*, 1992) y posteriormente en el humano (Kakar *et al.*, 1992; Chi *et al.*, 1993). Este, se encuentra en 4q13 (Kakar y Neill, 1995; Kottler *et al.*, 1995), está compuesto

por 3 exones (Fan *et al.*, 1994; Kakar 1997), codifica para una proteína de 328 aminoácidos y es el único gen de un receptor acoplado a proteínas G clonado hasta el momento que no posee un dominio intracelular carboxilo terminal (Chi *et al.*, 1993) (Figura 1).

El gen humano del GnRH-R posee 3 exones que comprenden 18.9 Kb (Fan *et al.*, 1995). El intrón 1 se localiza entre los codones 174-175 que corresponden en la proteína al 4º dominio putativo transmembranal y el intrón 2 se localiza entre los codones 248-249 (Fan *et al.*, 1994).

Se ha observado que las mutaciones en el gen del GnRH-R causan alteraciones en la interacción ligando-receptor, lo cual ha sido demostrado por medio de modelos computarizados (Ballesteros y Weinstein, 1995), así como por modelos *in vitro* (Dohlman *et al.*, 1991; Davidson *et al.*, 1995; 1996).

Existen diversos estudios en los cuales se han investigado alteraciones moleculares en el gen del GnRH-R en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico habiéndose encontrado mutaciones solamente en los casos familiares. Estas fueron encontradas en estado heterocigoto compuesto en los sujetos afectados, siendo los padres y los hermanos sanos portadores de una de las alteraciones moleculares (de Roux *et al.*, 1997; Layman *et al.*, 1997; 1998; Caron *et al.*, 1999; de Roux *et al.*, 1999; Kottler *et al.*, 2000; Seminara *et al.*, 2000; Beranova *et al.*, 2001); o en estado homocigoto, siendo ambos padres del sujeto afectado portadores de uno de los alelos afectados (Pralong *et al.*, 1999; Beranova *et al.*, 2001) (Tabla 1).

Síndrome de Kallmann

En 1856, Maestre de San Juan observó la asociación de hipogonadismo con anomalías del sistema olfatorio. La naturaleza hereditaria de esta enfermedad fue identificada por Kallmann *et al.* en 1944. En la actualidad, el epónimo de síndrome de Kallmann se utiliza para definir a aquella alteración hereditaria caracterizada por la asociación de hipogonadismo hipogonadotrópico con anosmia o hiposmia.

El síndrome de Kallmann es la forma más común de deficiencia aislada de gonadotropinas. El grado de deficiencia de GnRH en pacientes con síndrome de Kallmann puede variar desde formas parciales hasta formas completas. En más del 90% de los pacientes con síndrome de Kallmann existe ausencia en la pulsatilidad de LH, lo que origina el estado hipogonádico. Sin embargo, se ha descrito una amplia heterogeneidad fenotípica en cuanto al síndrome de Kallmann se refiere, ya que incluso se han reportado casos de pacientes con esta afección en los cuales se ha demostrado fertilidad (Turner *et al.*, 1974; Quinton *et al.*, 1999). Los pacientes con esta entidad presentan un hábito eunucoide, testículos y pene pequeños y ausencia de vello púbico, además de otras características somáticas asociadas, como por ejemplo: alteraciones renales (Colquhoun-Kerr *et al.*, 1999; Zenteno *et al.*, 1999), defectos en la línea medifacial (labio o paladar hendido), sinquinecias (Kallmann *et al.*, 1944; Danek *et al.*, 1992), sordera neurosensorial (Kallmann *et al.*, 1944; Waldstreicher *et al.*, 1996), anomalías oculomotoras (Waldstreicher *et al.*, 1996) y ataxia cerebelosa (Schwankhaus *et al.*, 1989). La incidencia de este síndrome se ha estimado en 1:10,000 varones y en 1:50,000 mujeres; posee una prevalencia de 1 de cada 25 pacientes anósmicos o hipósmicos y de 1 en 30 varones con hipogonadismo (Rugarli y Ballabio, 1993). Se han descrito patrones hereditarios autosómico dominante, autosómico recesivo y recesivos ligados al cromosoma X lo cual demuestra la heterogeneidad génica en esta enfermedad (White *et al.*, 1983; Hermanussen y Sippell, 1985; Layman, 1999).

Debido a que los hombres son afectados aproximadamente 5 veces más que las mujeres, se propuso inicialmente que la forma ligada al cromosoma X era la más frecuente (Jones y Kemman, 1976; Pawlowitzki *et al.*, 1987); sin embargo, recientemente se ha sugerido que la mayor parte de los sujetos afectados presentan mutaciones en genes autosómicos (Waldstreicher *et al.*, 1996; Georgopoulos *et al.*, 1997; Layman, 1999; Oliveira *et al.*, 2001). La penetrancia puede ser incompleta y por ello se ha reportado

discordancia en gemelos idénticos con este síndrome (Hipkin *et al.*, 1990). La expresividad es variable y por ello el fenotipo muchas veces difiere intrafamiliarmente (Hermanussen y Sippell, 1985; Parenti *et al.*, 1995).

Con la observación clínica de una familia en la cual los varones con síndrome de Kallmann presentaban ictiosis ligada al cromosoma X, se propuso que un síndrome de genes contiguos debido a una codeleción de genes adyacentes, KAL y de la sulfatasa esteroidea (STS) en el cromosoma X, fuese el responsable de la presencia de la asociación de estas dos enfermedades. Con base en lo anterior, se postuló que el gen KAL se encontraba próximo al locus del gen STS en la región Xp22.3 (Ballabio *et al.*, 1986), habiéndose aislado, posteriormente, mediante el uso de técnicas de clonación posicional (Franco *et al.*, 1991; Legouis *et al.*, 1991). La caracterización de la estructura del gen KAL demostró la presencia de un gen de 14 exones que abarca aproximadamente 210 Kb en la región Xp22.3 (Figura 2). Este gen escapa a la inactivación del cromosoma X, posee un gen homólogo ampliamente relacionado pero no funcional en Yq11.2 (del Castillo *et al.*, 1992; Incerti *et al.*, 1992) y está altamente conservado en especies poco relacionadas excepto en ratones y en hámsters (Rugarli *et al.*, 1993).

En 1992 se demostró que el gen KAL codifica para una proteína de 680 aminoácidos denominada anosmina (del Castillo *et al.*, 1992; Incerti *et al.*, 1992), que posee homología estructural con moléculas involucradas en el desarrollo neural. La porción amino-terminal contiene un dominio similar a la secuencia consenso de la familia de proteínas ácidas del suero y al núcleo de 4-disulfuros (Hennighausen y Sippel, 1982) encontrado en los inhibidores de proteasas (Stetler *et al.*, 1986) y en las neurofisinas (Drenth *et al.*, 1980). La porción carboxilo-terminal contiene cuatro repeticiones contiguas tipo fibronectina III (del Castillo *et al.*, 1992) con homología estructural con moléculas de adhesión tales como las moléculas de adhesión neural (NCAM), las caderinas, la contactina, las protein-cinasas ligadas a receptores y las fosfatasas (Lander, 1989; Edelman y Crossin, 1991; Fischer *et al.*, 1991; Hutter *et al.*, 2000). Si bien la anosmina contiene un péptido

señal de 19 aminoácidos en la región amino terminal, la ausencia de un dominio transmembrana o de un sitio de unión a fosfatidilinositol, sugiere que es una proteína de la matriz extracelular (del Castillo *et al.*, 1992; Incerti *et al.*, 1992).

Estudios en embriones de pollo han demostrado un amplio número de derivados ectodérmicos, mesodérmicos y endodérmicos que expresan el gen KAL durante diversos periodos del desarrollo (Calof y Chikaraishi, 1989; Legouis *et al.*, 1993; Lutz *et al.*, 1994). En el humano a los 45 días de la embriogénesis, momento en el cual los nervios olfatorios ya han iniciado su migración a partir del epitelio nasal (Duke *et al.*, 1995), no se han detectado transcritos del gen KAL en el cerebro. Esto sugiere que la expresión del mismo no es necesaria para la migración temprana de los nervios a partir del epitelio olfatorio. Sin embargo, aproximadamente en la semana 11 de gestación, la expresión del gen KAL puede evidenciarse en el bulbo olfatorio con mayor expresión que fuera del trayecto del nervio olfatorio (Duke *et al.*, 1995) y en la semana 19 del desarrollo, se encuentran los niveles más elevados de KAL en las células granulares y en el trayecto de los nervios olfatorios (Lutz *et al.*, 1994).

En un feto de 19 semanas de gestación con síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X se evidenció que los nervios olfatorios pasan a través de la lámina cribiforme, pero se detienen prematuramente dentro de las meninges, por encima del platillo clival (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1989). Aunque las neuronas olfatorias y las productoras de GnRH poseen una misma ruta de migración, el defecto en el síndrome de Kallmann parece ser más bien una alteración en la interacción neuronal que una detención en la migración (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1989; Rugarli *et al.*, 1996). Tempranamente en la embriogénesis, la migración de las neuronas olfatorias y las productoras de GnRH por la región nasal, se encuentra regulada por una molécula de adhesión denominada factor nasal embrionario de LHRH (NELF), que sirve de guía común para las proyecciones de los axones olfatorios y subsecuentemente para

la migración neurofilica de las células productoras de GnRH (Kramer y Wray, 2000). Posteriormente, la proteína del gen KAL, anosmina-1, la cual es un componente de la membrana basal y de la matriz intersticial (Soussi-Yanicostas *et al.*, 1998; Hardelin *et al.*, 1999), interviene en los eventos tardíos de la migración neuronal, los cuales incluyen la entrada de las neuronas productoras de GnRH en el bulbo olfatorio (Rugarli *et al.*, 1993) y/o el establecimiento del contacto entre los axones olfatorios y las neuronas del bulbo olfatorio (Legouis *et al.*, 1993; Duke *et al.*, 1995). En ausencia de KAL y consecuentemente en ausencia de conexiones sinápticas normales, se hipotetiza que los nervios olfatorios sufren una degeneración retrógrada con la consecuente afección de la migración de las neuronas productoras de GnRH (Legouis *et al.*, 1993). Diversos estudios han sugerido que la ausencia del bulbo olfatorio o las alteraciones en su morfología visualizados por resonancia magnética nuclear, permiten hacer un diagnóstico presuntivo de este síndrome y que resulta de particular importancia en los pacientes con alteraciones en la olfacción (Truwit *et al.*, 1993; Birnbacher *et al.*, 1994; Gasztonyi *et al.*, 2000); sin embargo, se ha demostrado que hasta el 25% de los sujetos con síndrome de Kallmann presentan un bulbo olfatorio normal, sugiriéndose que la resonancia magnética nuclear no es una técnica sensible para diagnosticar a estos sujetos (Quinton *et al.*, 1996).

Fuera del SNC, el gen KAL se expresa en derivados mesenquimatosos como el mesénquima facial, las células fibrosas y las pericondrales, en las paredes de pequeños vasos sanguíneos, así como en el mesonefros y en el metanefros (Legouis *et al.*, 1993; Rugarli *et al.*, 1993). En los humanos, la expresión anormal de KAL en el cerebelo puede relacionarse con síntomas tales como nistagmo y ataxia, los cuales pueden observarse en pacientes con síndrome de Kallmann (Schwankhaus *et al.*, 1989). Asimismo, pudiera existir una correlación entre la expresión del mesénquima facial y la fisura palatina, y la expresión en mesonefros/metanefros y la agenesia renal (Colquhoun-Kerr *et al.*, 1999; Zenteno *et al.*, 1999).

Por medio de inmunofluorescencia se ha localizado la presencia de células que sintetizan GnRH en el epitelio nasal superior en dos adultos con síndrome de Kallmann. La presencia de las mismas demuestra que un defecto en la síntesis de GnRH no es el responsable de este padecimiento (Quinton *et al.*, 1997).

La ausencia de concordancia entre genotipo y fenotipo en el síndrome de Kallmann ha sido comprobada en dos hermanos que poseen la misma delección en los genes STS y KAL. En uno de ellos se observó hipogonadismo hipogonadotrópico e hiposmia severa y en el otro un desarrollo puberal normal y un defecto olfatorio leve. Esto sugiere que otra proteína con funciones redundantes a aquellas que posee KAL pudiera compensar la acción del gen KAL cuando éste es defectuoso, además de que otros factores pudieran encontrarse involucrados en las manifestaciones fenotípicas del síndrome de Kallmann, o que existiese interacción con otros genes aún no descritos para este padecimiento (Parenti *et al.*, 1995).

El conocimiento preciso de la estructura del gen KAL, ha permitido demostrar la presencia de mutaciones en algunos pacientes afectados por la forma ligada al cromosoma X de esta enfermedad, habiéndose descrito desde mutaciones puntuales hasta delecciones completas de dicho gen (Tabla 2). El hallazgo de mutaciones en este gen ha demostrado que éste es, por lo menos en ciertos casos, responsable de la forma ligada al cromosoma X de la enfermedad. Sin embargo, en varios de estos estudios (Hardelin *et al.*, 1993b; Quinton *et al.*, 1996; Maya-Núñez *et al.*, 1998b; Oliveira *et al.*, 2001), no se han encontrado mutaciones en el gen KAL en un alto porcentaje de los pacientes, sugiriendo estos hallazgos que en estos casos la alteración pudiese encontrarse en la región no codificadora del exón 1 o del exón 14, dentro de un intrón o en la región del promotor o bien en otros genes relacionados con la síntesis y secreción de GnRH o con el receptor de esta hormona (Hardelin *et al.*, 1993b; Quinton *et al.*, 1996; Maya-Núñez *et al.*, 1998b; Oliveira *et al.*, 2001).

Tabla 1: Mutaciones descritas en el gen del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas

Sujetos	Hipogonadismo	Mutación	Referencia
2	FAMILIAR 2	G-A (317) Gln106Arg (1 ^{er} asa extracelular; exón 1) A-G (785) Arg262Gln (3 ^{er} asa intracelular; exón 3)	de Roux, 1997
24	ESPORADICO 20 femeninos (2 con anosmia) 4 masculinos	Ninguna	Layman, 1997
50	ESPORADICO 32 masculinos; 14 femeninos	Ninguna	Layman, 1998
	FAMILIAR 3 femeninos; 1 masculino	A-G (785) Arg262Gln (3 ^{er} asa intracelular; exón 3) A-G (851) Tyr284Cys (6 ^{ta} región transmembrana; exón 3)	
3	FAMILIAR 1 femenino; 2 masculinos	C-A (386) Ala129Asp (3 ^{er} dominio transmembrana; exón 1) A-G (785) Arg262Gln (3 ^{er} asa intracelular; exón 3)	Caron, 1999
3	FAMILIAR 2 femeninos; 1 masculino	G-A (317) Gln106Arg (1 ^{er} asa extracelular; exón 1) C-A (648) Ser217Arg (5 ^{to} dominio transmembrana; exón 2) A-G (785) Arg262Gln (3 ^{er} asa intracelular; exón 3)	de Roux, 1999
1	ESPORADICO 1 masculino	T-A (504) Ser168Arg (4 ^{to} dominio transmembrana; exón 2)	Pralong, 1999
1	ESPORADICO	G-A (317) Gln106Arg (1 ^{er} asa extracelular; exón 1) T-A (941) Leu314Stop (7 ^{mo} dominio transmembrana; exón 3)	Kottler, 2000
1	FAMILIAR	G-A (317) Gln106Arg (1 ^{er} asa extracelular; exón 1) A-G (785) Arg262Gln (3 ^{er} asa intracelular; exón 3)	Seminara, 2000
52	ESPORADICO 47 sujetos (29 con anosmia)	C-T (95) Thr32Ile (porción aminoterminal; exón 1) A-G (599) Cys200Tyr (2 ^{da} asa extracelular; exón 2) T-G (797) Leu266Arg (3 ^{er} asa intracelular; exón 3) G-A (317) Gln106Arg (1 ^{er} asa extracelular; exón 1) A-G (785) Arg262Gln (3 ^{er} asa intracelular; exón 3)	Beranova, 2001
	FAMILIAR 3 masculinos; 2 femeninos	G-A (836) Cys279Tyr (6 ^{ta} región transmembrana; exón 3) G-A (317) Gln106Arg (1 ^{er} asa extracelular; exón 1) A-G (785) Arg262Gln (3 ^{er} asa intracelular; exón 3)	

Tabla 2: Mutaciones descritas en el gen KAL

Pacientes	Mutación	Referencia
6	3 deleciones del gen, síndrome de genes contiguos; deleción intragénica del gen desde el exón 2 hasta el exón 14	Ballabio, 1989
59	Deleción intragénica de 3300 p.b.	Bick, 1992
4	Deleción completa del gen, síndrome de genes contiguos	Bouloux, 1993
21	Dos deleciones completas del gen; mutación en el sitio aceptor del intrón 12; Trp ₂₃₇ → codón terminación (exón 5); Arg ₂₅₇ → codón terminación (exón 6); Trp ₂₅₈ → codón terminación (exón 6); Asn ₂₆₇ → Lys (exón 6); Gln ₄₂₁ → codón terminación (exón 9); Arg ₄₂₃ → codón terminación (exón 9); deleción 1 citocina en posición 981 (exón 6); inserción 1 adenina (base 1166)	Hardelin, 1992-1993a,b
1	Deleción completa del gen, síndrome de genes contiguos	Meindl, 1993
1	Deleción completa del gen, síndrome de genes contiguos	Klink, 1994
6	2 deleciones del exón 2, síndrome de genes contiguos	Paige, 1994
3	Deleción completa del gen, síndrome de genes contiguos	Martul, 1995
6	Deleciones del gen, síndrome de genes contiguos	Parenti, 1995
12	Trp ₂₅₈ → codón terminación (exón 6); deleción del exón 1 y del 11; deleción 1 citosina en posición 1847 (codón terminación prematuro en exón 12)	Quinton, 1996
24 (3 familias)	Deleción de 14 p.b. (cambio en el marco de lectura en la Pro ₄₆₄ , exón 10); Tyr ₂₃₈ → codón de terminación (exón 7); deleción 9 p.b. (mutación en splicing en Asn ₄₀₀ , exón 8); Phe ₅₁₇ → Leu (exón 11)	Georgopoulos, 1997
1 familia	Inserción 11 p.b. (exón 1) → codón de terminación prematuro	Gu, 1998
12	Deleción del exón 3 al 5 (1 sujeto); Glu ₅₁₄ → Lys (región codifica para 3 ^o repetición FN-like tipo III)	Maya-Núñez, 1998a
1 familia	Mutación en el sitio aceptor de la unión de exón 6/intrón 5	O'Neill, 1998
1	Deleción completa del gen, síndrome de genes contiguos	Weissortel, 1998
3	Gln ₆₆ → codón de terminación (exón 1)	Izumi, 1999
1	Deleción del exón 1 al 3 del gen, síndrome de genes contiguos	Maya-Núñez, 1999
2	Mutación puntual exón 13	Jansen, 2000
2	Deleción de 14 p.b. en el exón 9	Matsuo, 2000
2	Deleción del exón 5 al exón 10	Nagata, 2000
101	Cys ₁₇₂ → Arg (exón 4); Arg ₁₉₁ → codón terminación (exón 5); Arg ₄₅₇ → codón terminación (exón 10); deleción 1 citocina en posición 1951 con cambio en el marco de lectura → codón terminación (exón 13)	Oliveira, 2001

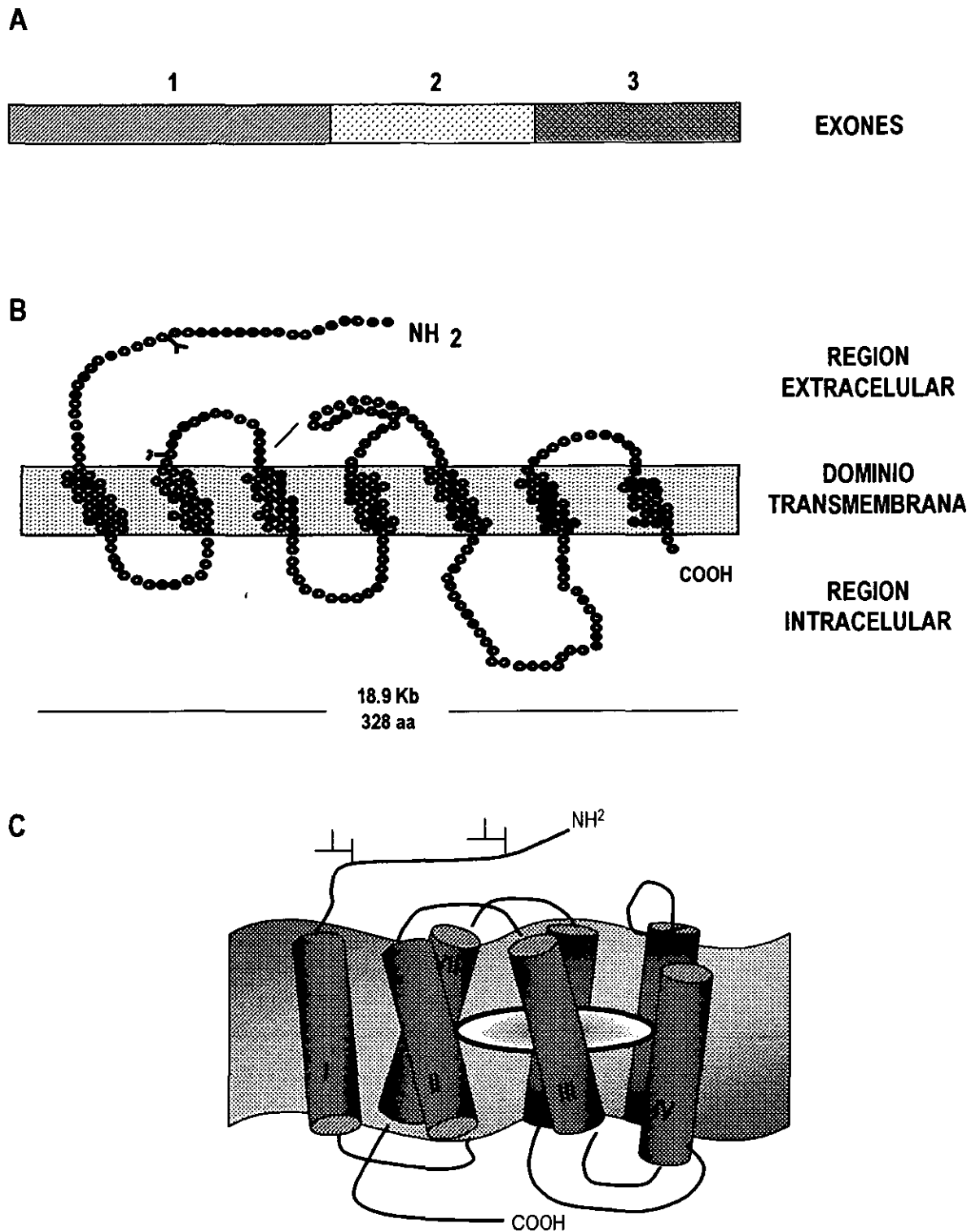


FIGURA 1: Representación esquemática del gen (panel A) y de la proteína (panel B) del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas. En el panel C se observa la representación tridimensional de los siete dominios transmembranales del mismo receptor.

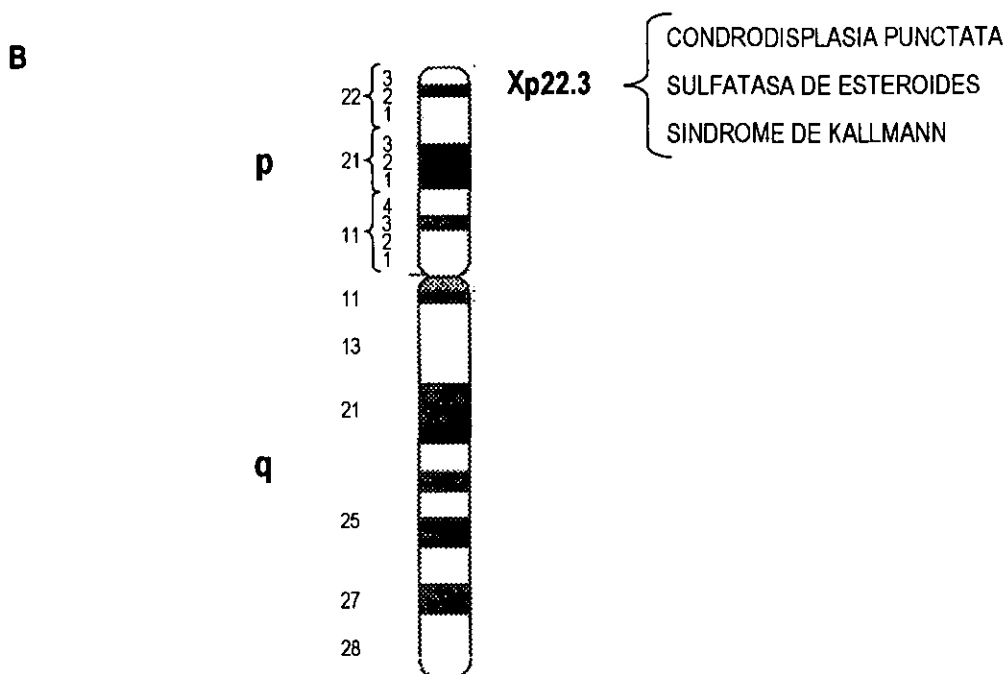
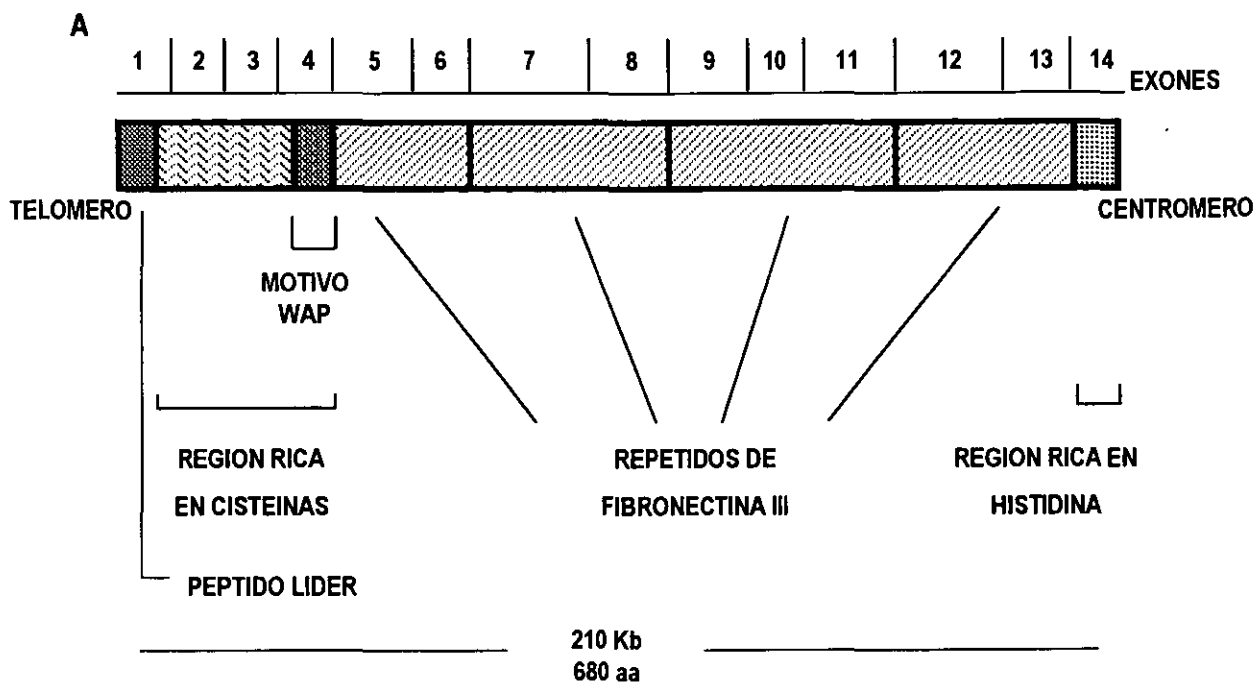


FIGURA 2: En el panel A se observa un esquema del gen KAL. En el panel B se esquematiza la localización del gen KAL en el brazo corto (p) del cromosoma X.

JUSTIFICACION

La deficiencia aislada de gonadotropinas que se presenta con hipogonadismo hipogonadotrópico con o sin defectos en la olfacción, comprende un amplio espectro fenotípico tanto en hombres como en mujeres. El aislamiento del gen responsable de la forma ligada al cromosoma X del síndrome de Kallmann permitió explicar la asociación entre el desarrollo de deficiencia de GnRH con anosmia, debido a que el defecto en la migración de las neuronas productoras de GnRH es secundario a una pérdida en la comunicación entre los nervios olfatorios y el cerebro, aunque aún persisten muchos interrogantes y se necesitaría de un modelo neurobiológico que presente este síndrome para poder contestarlos.

Con base en lo anteriormente descrito, podemos afirmar que en la actualidad no se ha podido identificar el origen del hipogonadismo (síndrome de Kallmann o aislado) en la mayoría de los sujetos afectados que han sido estudiados molecularmente. De hecho, se desconocen cuales son los genes autosómico dominantes o autosómico recesivos responsables de la deficiencia de GnRH y si esos defectos genéticos que ocasionan síndrome de Kallmann causan también hipogonadismo hipogonadotrópico aislado sin alteraciones olfatorias. Mucho se ha especulado al respecto y por ello decidimos estudiar tanto el gen KAL como el gen del receptor de GnRH en pacientes con dichas alteraciones.

OBJETIVO

Investigar mutaciones en el gen KAL y en el gen del receptor de GnRH en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico familiar o esporádico y en pacientes con síndrome de Kallmann.

HIPOTESIS

En los pacientes con diagnóstico de hipogonadismo hipogonadotrópico familiar o esporádico y en aquellos con síndrome de Kallmann, existen alteraciones en la secuencia del gen KAL o del gen del receptor de GnRH que están involucradas en la génesis de dichas patologías.

PACIENTES Y METODOS

Se incluyeron 12 sujetos con diagnóstico de síndrome de Kallmann ligados al cromosoma X. Inicialmente, se secuenció el gen KAL y en aquellos en los que no se encontró mutación alguna, se llevó a cabo la secuenciación del gen del GnRH-R.

Por otro lado, se investigaron las posibles mutaciones existentes tanto en el gen del GnRH-R como en el gen KAL, en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico familiar (3 familias) y en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico esporádico (14 sujetos).

Asimismo, se incluyeron 50 controles sanos, 25 mujeres y 25 varones en estadio 5 (desarrollo puberal completo) de la clasificación de Marshall y Tanner (1969, 1970).

Para la realización de este estudio, se obtuvo la aprobación tanto del Comité Local de Investigación y el de Bioética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, como de los sujetos participantes.

SINDROME DE KALLMANN

Criterios de inclusión

- 1) Sujetos masculinos mayores de 18 o femeninos mayores de 16 años de edad
- 2) Diagnóstico clínico y de laboratorio de síndrome de Kallmann:
 - A) Desarrollo puberal Tanner 1
 - B) Anosmia o hiposmia
 - C) Concentraciones en suero basales prepuberales de gonadotropinas y de testosterona o estradiol
- 3) Origen étnico mestizo-mexicano dado por al menos dos generaciones de la familia en este país

Criterios de exclusión

- 1) Procesos inflamatorios crónicos del tracto respiratorio

HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROPICO

Criterios de inclusión

- 1) Sujetos masculinos mayores de 18 o femeninos mayores de 16 años de edad
- 2) Diagnóstico clínico y de laboratorio de hipogonadismo hipogonadotrópico:
 - A) Desarrollo puberal Tanner 1
 - B) Concentraciones en suero basales prepuberales de gonadotropinas y de testosterona o estradiol
- 3) Origen étnico mestizo-mexicano dado por al menos dos generaciones de la familia en este país

Criterios de exclusión

- 1) Presencia de otra deficiencia hormonal concomitante
- 2) Procesos inflamatorios crónicos del tracto respiratorio

CONTROLES

Criterios de inclusión

- 1) Sujetos sanos, masculinos o femeninos, con desarrollo puberal Tanner 5
- 2) Origen étnico mestizo-mexicano dado por al menos dos generaciones de la familia en este país

Criterios de exclusión

- 1) Cualquier enfermedad endócrina o genética concomitante

Protocolo de estudio

A cada paciente se le practicó una evaluación clínica detallada con el fin de llevar a cabo el diagnóstico preciso de síndrome de Kallmann o de hipogonadismo hipogonadotrópico esporádico o familiar. Las características clínicas de cada sujeto se pueden observar en las tablas 3, 4 y 5. Todos los pacientes eran de origen étnico mestizo-mexicano. Cada una de las genealogías provenía de diferentes áreas del país y no existía relación alguna entre ninguno de los individuos. Para establecer el diagnóstico se consideró que un paciente presentaba hipogonadismo hipogonadotrópico cuando se encontraba en estadio 1 (prepuberal) de la clasificación de Marshall y Tanner (1969, 1970) y las concentraciones de gonadotropinas y esteroides gonadales eran prepuberales. Además de lo anterior, los pacientes con síndrome de Kallmann presentaban anosmia o hiposmia asociadas. La alteración olfatoria se determinó mediante la prueba descrita por Rosen *et al.* (1979). Esta prueba consiste en la evaluación de la olfacción al identificar diversos aromas que ya han sido estandarizados previamente. En breve, al paciente con los ojos vendados se le presentan estos aromas en recipientes opacos, iniciándose con el aroma menos penetrante, para finalmente utilizar el más penetrante, utilizándose los siguientes: dentífrico, vainilla, café, colonia y alcohol. Se consideró que el paciente era anósmico cuando no percibió ninguno de los 5 aromas probados; se clasificó al individuo como hipósmico cuando no percibió alguno(s) de los aromas presentados. Todos los pacientes con síndrome de Kallmann incluidos en el estudio presentaban un patrón de transmisión ligado al cromosoma X. Esto fue confirmado al existir por lo menos un hombre afectado en la familia de la madre del *propósi*, ausencia de mujeres afectadas en la familia, ausencia de transmisión de hombre a hombre y ausencia de consanguinidad. Solamente se incluyeron en el proyecto aquellos pacientes que presentaban concentraciones basales de LH, FSH, testosterona o estradiol por debajo de los valores de referencia para un adulto normal. En las tablas 3, 4 y 5 se pueden observar las concentraciones hormonales plasmáticas de gonadotropinas y de esteroides

sexuales cuantificados por radioinmunoanálisis siguiéndose las técnicas previamente utilizadas por nuestro grupo de trabajo (Méndez *et al.*, 1998). La posibilidad de que una lesión tumoral condicionase el hipogonadismo hipogonadotrópico fue excluida mediante placas de cráneo anteroposteriores y laterales con foco en la silla turca. Otras causas de hipogonadismo hipogonadotrópico central fueron excluidas mediante la historia clínica detallada y en caso necesario mediante estudios de laboratorio complementarios.

Asimismo, incluimos en nuestro estudio a los padres y a dos hermanos sanos de dos pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico en los cuales se encontró una mutación en el gen del receptor de GnRH (Figura 3). No fue posible constatar consanguinidad en esta familia, pero los padres provienen de una misma localidad y aparentemente, sus bisabuelos eran primos. Los sujetos en estudio (HH10 y HH11) fueron referidos al hospital a la edad de 21 y 19 años, respectivamente. Ambos fueron producto de embarazos normales, constatándose en ambos criptorquidia al nacimiento la cual fue corregida quirúrgicamente en la infancia temprana. El desarrollo psicomotor en ambos se consideró normal. La madre (45 años) y la hermana (17 años) presentaron un desarrollo puberal normal y sus ciclos menstruales así como las concentraciones séricas de gonadotropinas y estradiol, se encontraban dentro de los valores de referencia. El padre (45 años) y el hermano sano (18 años), se encontraron bien virilizados y tanto la potencia como la libido, así como las concentraciones séricas de gonadotropinas y testosterona, fueron normales.

Tabla 3: Características clínicas y concentraciones hormonales basales en pacientes con síndrome de Kallmann

Paciente	Edad (años)	Alteración olfacción	Longitud pene (cm)	Gónadas (cc)		Vello púbico #	Anomalías Asociadas	LH * (mUI/ml)	FSH * (mUI/ml)	T (ng/ml)
				D	I					
K 1	18	Anosmia	4.3	4.1	5.3	2	AMO-AR-S	0.6	0.3	0.4
K 2	25	Anosmia	2.1	5.3	5.3	2	ACF-AME-AP-AR-S	1.6	0.2	0.2
K 3	28	Anosmia	3.0	6.3	**	1	ACF-AO-AR-S-V	1.4	0.3	0.4
K 4	20	Anosmia	2.5	3.7	2.3	2	ACF-AR-AMO-S	0.1	0.3	0.5
K 5	23	Anosmia	2.2	2.0	2.0	2	AME	0.8	0.4	0.3
K 6	28	Hiposmia	3.8	**	2.3	2	ACF	1.2	0.3	0.4
K 7	21	Anosmia	3.4	5.3	3.7	1	S	0.9	0.2	0.3
K 8	18	Hiposmia	2.2	5.3**	4.1	1	AME-H-S	0.7	N.D.	0.5
K 9	23	Anosmia	2.5	**	**	1	ACF-AME-AP-S	0.2	0.4	0.3
K 10	29	Anosmia	2.5	**	**	2	ACF-AME-AMO-So	1.6	0.6	0.2
K 11	22	Anosmia	3.5	2.3	3.7	1	ACF-AME	N.D.	0.3	0.4
K 12	19	Anosmia	3.3	4.1	5.3	1	S-AO	0.1	0.4	0.5

Valores de referencia: LH: 3-12 mUI/ml; FSH: 0.5-5.0 mUI/ml; T: >3.8 ng/ml.

*: Media de dos muestras tomadas con 20 minutos de intervalo.

** : Criptorquidia o antecedente de la misma.

: Estadio de Tanner.

N.D.: No detectable.

ACF: Alteración cráneo-facial

AME: Alteración músculo-esquelética

AMO: Anormalidad en los movimientos oculares

AO: Alteración Oftalmológica

AP: Alteraciones en piel

AR: Alteración renal

H: Hipospadias

S: Sinquinesias

So: Sordera

V: Vitiligo

Tabla 4: Características clínicas y concentraciones hormonales basales de varones con hipogonadismo hipogonadotrópico

Paciente	Edad (años)	Alteración olfacción	Longitud pene (cm)	Gónadas (cc)		Vello púbico #	Anomalías asociadas	LH * (mUI/ml)	FSH * (mUI/ml)	T (ng/ml)
				D	I					
HH 1	19	No	4.0	**	**	1	Ninguna	N.D.	N.D.	0.1
HH 2 ♣	18	No	1.5	1.5	1.5**	1	Ninguna	N.D.	0.2	0.2
HH 3 ♣	21	No	4.2	2.5	3.0	1	Ninguna	0.2	0.4	0.8
HH 8	21	No	3.3	**	**	1	Ninguna	0.3	0.4	0.3
HH 10 ♦	21	No	3.7	3.6**	2.5**	1	Ninguna	0.3	0.2	0.4
HH 11 ♦	19	No	3.4	1.5**	1.8**	1	Ninguna	0.3	0.1	0.5
HH 14 ♠	18	No	2.4	2.6	2.6	1	Ninguna	N.D.	0.2	0.3
HH 15 ♠	19	No	2.5	2.6	2.3	1	Ninguna	1.4	0.4	0.6
HH 16 ♠	22	No	5.0	9.5	16.0	3	Ninguna	1.2	0.8	2.5
HH 17 ♠	23	No	4.6	3.0	3.0	1	Ninguna	N.D.	0.5	0.2
HH 19	21	No	3.4	1.0	1.5	1	Ninguna	N.D.	0.2	0.4
HH 20	22	No	3.6	3.0	3.0	2	Ninguna	0.1	0.1	2.6
HH 21	20	No	3.5	2.3	2.3	1	Ninguna	N.D.	0.2	1.3

Valores de referencia: LH: 3-12 mUI/ml; FSH: 0.5-5.0 mUI/ml; T: >3.8 ng/ml.

*: Media de dos muestras tomadas con 20 minutos de intervalo.

** : Criptorquidia o antecedente de la misma.

: Estadio de Tanner.

Un mismo símbolo (♣, ♦, ♠) identifica a los miembros de una misma familia.

N.D: No detectable.

Tabla 5: Características clínicas y concentraciones hormonales basales de mujeres con hipogonadismo hipogonadotrópico

Paciente	Edad (años)	Alteración olfacción	Mamas #	Vello púbico #	Anomalías asociadas	LH * (mUI/ml)	FSH * (mUI/ml)	E ₂ (pg/ml)
HH 4	18	No	1	1	Ninguna	0.4	0.4	13.4
HH 5	17	No	1	1	Ninguna	0.3	0.6	< 13
HH 6	18	No	1	1	Ninguna	1.1	0.5	< 13
HH 7	19	No	1	1	Ninguna	N.D.	0.3	< 13
HH 9	17	No	1	1	Ninguna	N.D.	0.1	< 13
HH 12	18	No	1	1	Ninguna	1.4	0.4	31.7
HH 13	26	No	1	1	Ninguna	2.1	0.4	< 13
HH 18	19	No	2	2	Ninguna	N.D.	0.3	21
HH 22	16	No	2	1	Ninguna	0.1	0.4	< 13

Valores de referencia: LH: 3-12 mUI/ml; FSH: 0.5-5.0 mUI/ml; E₂: > 30 pg/ml.

*: Media de dos muestras tomadas con 20 minutos de intervalo.

#: Estadio de Tanner.

N.D.: No detectable.

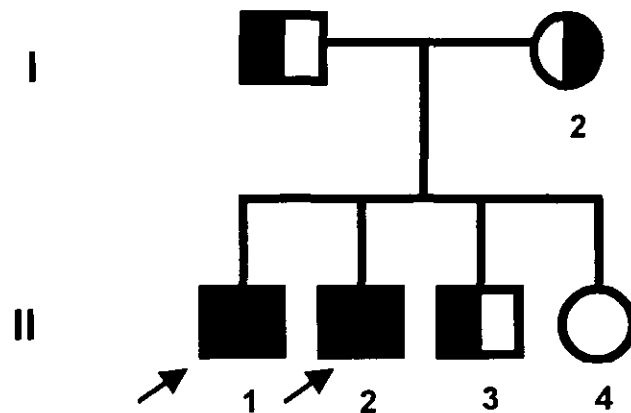


FIGURA 3: Arbol genealógico de una familia con mutación en el gen del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas.

Ambos *propósi* se indican con flechas.

Extracción de DNA genómico

El DNA genómico de los sujetos estudiados se obtuvo mediante una técnica previamente descrita (Canto *et al.*, 1997). La sangre con Na₂EDTA se mezcló en un tubo cónico, con el fin de lisar a los eritrocitos, con un volumen igual de un amortiguador el cual contenía Tris-HCl 10 mM pH 7.4, tritón X-100 al 1% y sacarosa 300 mM. La muestra se centrifugó decantándose el sobrenadante; el botón se transfirió a un microtubo de 1.5 ml, se resuspendió vigorosamente en 1 ml del mismo amortiguador y se centrifugó. Este último paso se repitió cuantas veces fuese necesario hasta obtener un botón de glóbulos blancos limpio, el cual se resuspendió en 570 μ l de NaCl 50 mM, se le agregó 50 μ l de SDS al 10% y se agitó varios minutos para lisar las membranas de los leucocitos. Con el fin de precipitar las proteínas se adicionaron 200 μ l de NaCl saturado, se agitó varios minutos y se centrifugó. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). El DNA precipitado se recolectó con una pipeta Pasteur de punta curva, se lavó en etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspendió en 100 μ l de H₂O destilada y desionizada estéril, conservándose para su análisis a -20°C.

En todas las muestras obtenidas se realizó un análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 260 y 280 nm. La concentración de DNA se calculó mediante la siguiente fórmula:

$\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260})(\text{dilución}^{-1})(0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l})$, donde 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNA = 1 D.O.₂₆₀. La relación 260/280 indicó la pureza del DNA obtenido. Las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O.₂₆₀ fueron las óptimas. Con el fin de determinar la calidad de las muestras se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% tiñéndose con bromuro de etidio al 0.0002%. En todos los casos, se evidenció la banda de alto peso molecular sin degradación alguna.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos específicos derivados de la secuencia de los exones de ambos genes fueron adquiridos en una casa comercial (Gibco BRL, Life Technologies, Inc. Gaithersbury, Maryland, EUA). Cada uno de los oligonucleótidos fué llevado a una concentración de 100 μ M. La secuencia de los iniciadores correspondientes a los 14 exones del gen KAL (Hardelin *et al.*, 1993a) y a los 3 exones del gen del receptor de GnRH (Layman *et al.*, 1997), se encuentran detalladas en las tablas 6 y 7.

Tabla 6: Oligonucleótidos del gen KAL

Exón	Oligonucleótidos en dirección 5'→3'
1	CCT CGC CCT CGC CCT CGA CCC GCA G GAA CTT TGC GAG CCC AGG CTG GGA G
2	TTG GAA GGG AAG GAC AGC AGG GCA CCA TTC ATA CAG GTA TAG
3	TCT CAG CTT TGT TTG TTT CCA CGT AAG CAT AGT CAG ATT TGG
4	ATG TCT TGG AAA TCA GAC TTC ATG TGA CAC TGC ATG TGT CTT
5	CAG ATT GTT TTA ATT GAT ACG GCA GAC ACT ACC TCC AGG ATG
6	AGT GAC ATG TTC CCT GTG CTC CTG GTA GCA AGG ATA GTA TTC
7	ATG ATG TGT CTT TGT ACT GGG TGG GAA TAA CAA TCC TTC CTC
8	GAC GTG GAA GGT TTG TAA CGC ATC ATG TCA CAA TCA TCT TGA
9	TGC CCA GGA ATC TAT AAT TAC ACT ATC TCT ATA TTA CTG TGC
10	ACC TGG AAT GTA ACA TCC AGC ACC ATT CTG CTT TCC ACT TCC
11	AAT ATG ATT TCA ATT CTT GCC GAT GTA GAA GTC CTT CAG GTG
12	TCT CCA GTC GCC TAA TCC TGG CCA ATG ACA CAG ACA TAG TAC
13	GTG CAT TGC ATG TTG TCT CTG TGA CAG GAT GGC TTA TAT GCC
14	ATG TTA CTG ACA TAT TTT GTC GGC CGA AGT TCA ACA AGC TTA

Tabla 7: Oligonucleótidos del gen del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas

Exón	Oligonucleótidos en dirección 5'→3'
1	ACA CAA GGC TTG AAG CTC TGT CC AGA CCT TAT ATC AAA TTT AGA
2	CTA GCA GAG TAC CAA AGA GAA AAC TT AAA CTG CCC ACA AAT GAC
3	CAC CTC TCT TTT CTC TAT CCA ACA ACA TTT GTG TTA ATC ATT CCC AGA

Reacción en Cadena de las Polimerasas (PCR)

La amplificación de cada uno de los exones del gen KAL y del gen del receptor de GnRH se llevó a cabo por medio de una reacción con un volumen total de 50 μ l siguiéndose la técnica descrita por Sambrook *et al.* (1989). A 1 μ g del DNA genómico de cada sujeto se le adicionaron bien fuese 0.25 μ l de cada uno de los iniciadores (5' y 3') del gen del KAL a una concentración de trabajo de 100 μ M ó 0.62 μ l de cada uno de los iniciadores (5' y 3') del gen del GnRH-R a una concentración de trabajo de 20 μ M; 1 μ l de cada uno de los desoxirribonucleótidos trifosfatados, 5 μ l del amortiguador 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3 y KCl/Mg₂Cl), 2 U de Taq polimerasa y H₂O destilada y desionizada estéril para completar un volumen de reacción de 50 μ l. Los reactivos para llevar a cabo la reacción de PCR se adquirieron con Perkin-Elmer (New Jersey, EUA). Los programas de amplificación se realizaron en el equipo DNA Thermal Cycler 480 de Perkin-Elmer y se detallan en las tablas 8 y 9.

Los productos de cada reacción de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio 0.0002%. Como marcador de peso molecular se incluyó a una escalera de 100 p.b. (Gibco BRL, Life Technologies, Inc. Gaithersbury, Maryland, EUA).

Purificación de los productos de PCR

Para llevar a cabo la purificación de los productos de PCR se utilizó el estuche comercial QIAEX II (QIAGEN Inc, Alemania). La banda del gel de agarosa que se deseaba purificar fue recortada, se pesó y se disolvió a 55°C con 3 veces su peso en μl del amortiguador QX1 y en 10 μl de la suspensión QIAEX II, utilizando la propiedad del DNA de unirse al vidrio; se centrifugó por 2 minutos a 14,000 r.p.m. a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante. El paso anterior se repitió con 500 μl del amortiguador QX1. Posteriormente, el botón se lavó en 2 ocasiones con 500 μl del amortiguador PE centrifugándose en la primer ocasión por 2 minutos a 14,000 r.p.m. y en la última por 5 minutos a 14,000 r.p.m. a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 20 μl de H₂O destilada y desionizada estéril para despegar el DNA del vidrio a 55°C durante 5-15 minutos. Al producto purificado se le realizó un análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 260 y 280 nm para evaluar la pureza y la concentración del DNA extraído y se conservó a -20°C hasta su utilización en la reacción de secuenciación.

Secuenciación

La reacción de secuenciación se realizó mediante un estuche de DNA Sequencing Kit Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit (Perkin-Elmer, New Jersey, EUA), que se basa en el método descrito por Sanger *et al.* (1977) con algunas modificaciones. Posterior a la purificación de los productos de PCR, en tubos de microcentrifuga de 0.2 ml, se llevó a cabo la mezcla de reacción con: amortiguador de secuencia 5X, mezcla de dNTP's, oligonucleótido (5' ó 3') a una concentración final de 3.2 pM, terminador colorido A, terminador colorido C, terminador colorido G, terminador colorido T y AmpliTaq DNA Polimerasa, FS. A esta reacción de mezcla se le añadió la concentración del DNA previamente estandarizada (Tablas 8 y 9) y H₂O

destilada y desionizada estéril para un volumen final de 20 μ l. Se llevó a cabo el PCR de cada una de las reacciones de secuenciación con las temperaturas de desnaturalización, reasociación y extensión previamente estandarizadas.

Al finalizar el PCR, se procedió a la purificación de los productos mediante el uso de las columnas CENTRI SEP (Princeton Separations, Applied Biosystems, Inc., New Jersey, EUA). Dichas columnas separan, por medio de Sephadex TM grado 50 fino, a los nucleótidos y sales excedentes del producto de PCR a ser secuenciado. Brevemente, se rehidrata el Sephadex G-50 contenido en las mismas con 800 μ l de H₂O destilada y desionizada estéril durante 2 horas, el líquido intersticial es removido por precipitación, se centrifuga a 4,000 r.p.m. por 2 minutos, se depositan los 20 μ l del PCR de secuencia y se centrifuga a 4,000 r.p.m. por 2 minutos recuperándose así el producto de PCR purificado. Posteriormente, el mismo fue evaporado en una centrifuga de vacío. Las muestras se resuspendieron en amortiguador de carga (formamida desionizada y EDTA 25 mM, pH 8.0, que contiene 50 mg/ml de azul dextrán en una proporción de 5:1 de formamida a EDTA/azul dextrán), se calentaron a temperatura de ebullición durante 5 minutos y se colocaron en hielo. El DNA fue secuenciado en un gel de poliacrilamida al 4.75% (50 ml) que contiene acrilamida al 40%, urea 25 g, bisacrilamida:acrilamida (18:2), 5 ml de TBE 10X, 16.87 ml de H₂O destilada y desionizada estéril, 250 μ l NH₄SO₄ al 10% y 28.2 μ l de N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina. Se colocaron las muestras (1.5 μ l /carril) y se corrieron en el secuenciador automático Applied Biosystem 377 DNA Sequencer.

Tabla 8: Condiciones de PCR del gen KAL

Exón	Temperatura alineamiento (°C)	Producto amplificado (p.b.)	DMSO	Producto secuenciado (p.b.)	Concentración de DNA para secuencia (ng)
1	65	329	4%	207	13
2	55	230	-	48	10
3	55	174	-	63	9
4	55	334	-	222	13
5	55	267	-	186	12
6	55	218	4%	130	12
7	55	269	-	117	10
8	55	237	-	235	11
9	55	266	-	146	10
10	55	293	4%	95	13
11	55	272	2%	172	12
12	55	302	-	221	13
13	55	241	-	142	12
14	55	147	-	118	10

DMSO: Dimetil sulfóxido

Tabla 9: Condiciones de PCR del gen del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas

Exón	Temperatura alineamiento (°C)	Producto amplificado (p.b.)	Producto secuenciado (p.b.)	Concentración de DNA para secuencia (ng)
1	55	560	522	17
2	55	321	219	13
3	55	355	244	13

RESULTADOS

Los estudios de los árboles genealógicos practicados a los pacientes con síndrome de Kallmann confirmaron el patrón hereditario ligado al cromosoma X en todos estos sujetos.

Tanto en los pacientes con síndrome de Kallmann, como en aquellos con hipogonadismo hipogonadotrópico (salvo en los sujetos HH10 y HH11; ver sujetos) se confirmó la ausencia de consanguinidad en todas las familias estudiadas; todas ellas pertenecieron a genealogías diferentes.

Gen KAL

Se encontraron defectos genéticos del gen KAL en 3 de los 12 *propósitos*. El paciente K11 presentó una delección del exón 5; el resto de los exones del gen amplificaron normalmente (Figura 4). El paciente K10 presentó una mutación puntual en el exón 6 que consistió en una sustitución de C por T en el codón 262 (CGA por TGA), convirtiendo el codón para la arginina en un codón de terminación prematuro (Figura 5). Esta mutación se encuentra localizada en la región que comparte homología con la secuencia de las repeticiones de fibronectina III que posee la proteína *Kal*. El paciente K7 presentó una inserción de 11 p.b. en el exón 1 del gen. La misma, constituye una repetición de la secuencia previa y condiciona un cambio en el marco de lectura generándose un codón de terminación prematuro 19 tripletes posteriores a la inserción, dentro del mismo exón (Figura 6).

En los 9 pacientes restantes con diagnóstico de síndrome de Kallmann, así como en los 14 pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico aislado y en las dos familias con hipogonadismo hipogonadotrópico, no se encontraron mutaciones en este gen.

Asimismo, encontramos 5 polimorfismos del gen KAL (Tablas 10, 11 Y 12). El primero de ellos

consistió en una sustitución de G por A en el codón 78, en el exón 2. Este polimorfismo fue observado en el 92% de los pacientes con síndrome de Kallmann y en el 75% de los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico. Este cambio ya reportado previamente en la literatura, no alteró el aminoácido codificado (Glicina) (Figura 7). El segundo fue detectado en el exón 11 y consistió en una sustitución de A por G en el codón 534 (isoleucina por valina). Este polimorfismo fue observado en el 64% de los pacientes con síndrome de Kallmann y en el 94% de los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico y al igual que en el caso anterior, ya había sido reportado previamente tanto en pacientes como en sujetos control (Figura 8). Los últimos tres polimorfismos fueron localizados en el exón 12. El tercer polimorfismo, consistió en una sustitución de T por C en el codón 565 (isoleucina por treonina). Dicha alteración fue observada en el 83% de los pacientes con síndrome de Kallmann, en el 44% de los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico y en el 8% de los controles estudiados (Figura 9). El cuarto polimorfismo, consistió en una sustitución de T por C en el codón 609 (serina por prolina); éste fue observado en el 58% de los pacientes con síndrome de Kallmann, en el 44 % de los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico y en el 6% de los controles (Figura 10). En todos los casos en los cuales se presentó el polimorfismo en el codón 609, éste se encontró asociado al polimorfismo en el codón 565 tanto en los sujetos con síndrome de Kallmann como en aquellos con hipogonadismo hipogonadotrópico. El quinto polimorfismo consistió en una sustitución de T por C en el codón 611. Dicho cambio fue observado en el 75% de los pacientes con síndrome de Kallmann, en el 81% de los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico y en el 50% de los controles sanos. Este cambio, que no alteró el aminoácido codificado (isoleucina), ya había sido reportado previamente (Figura 11).

Tabla 10: Polimorfismos en el gen KAL en pacientes con síndrome de Kallmann

Sujeto	PM 78	PM 534	PM 565	PM 609	PM 611	Total PM por sujeto
K 1	+	+	+	-	+	4
K 2	+	-	+	+	+	4
K 3	+	-	+	+	+	4
K 4	+	+	+	+	+	5
K 5	+	-	+	+	-	3
K 6	-	-	+	-	-	1
K 7	+	+	+	+	+	5
K 8	+	+	-	-	+	3
K 9	+	+	+	+	+	5
K 10	+	-	+	-	-	2
K 11	+	+	-	-	+	3
K 12	+	+	+	+	+	5

Tabla 11: Polimorfismos en el gen KAL en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico

Sujeto	PM 78	PM 534	PM 565	PM 609	PM 611	Total PM Por Sujeto
HH 1	+	+	+	+	+	5
HH 2 Y 3	+	+	+	+	+	5
HH 4	+	+	-	-	+	3
HH 5	+	+	-	-	-	2
HH 6	+	+	-	-	+	3
HH 7	+	+	-	-	-	2
HH 8	+	+	+	+	+	5
HH 9	-	+	-	-	+	2
HH 12	-	+	-	-	+	2
HH 13	+	+	-	-	+	3
HH 14-17	+	+	+	+	+	5
HH 18	-	+	-	-	+	2
HH 19	+	+	+	+	+	5
HH 20	+	+	+	+	+	5
HH 21	-	-	+	+	-	2
HH 22	+	+	-	-	+	3

PM: Polimorfismo

PM 78: cambio de CAG por CAA (Glicina)

PM 534: cambio de ATT por GTT (Isoleucina → Valina)

PM 565: cambio de ATC por ACC (Isoleucina → Treonina)

PM 609: cambio de TCC por CCC (Serina → Prolina)

PM 611: cambio de ATT por ATC (Isoleucina)

Tabla 12: Polimorfismos en el exón 12 del gen KAL en controles sanos

Control	PM 565	PM 609	PM 611	Total PM	Control	PM 565	PM 609	PM 611	Total PM
1	-	-	-	0	26	-	-	-	0
2	-	-	-	0	27	-	-	+	1
3	-	-	-	0	28	-	-	-	0
4	+	+	-	2	29	+	+	-	2
5	-	-	-	0	30	-	-	+	1
6	+	-	-	1	31	-	-	+	1
7	-	-	+	1	32	-	-	-	0
8	-	-	+	1	33	-	-	-	0
9	-	-	-	0	34	-	-	+	1
10	-	-	-	0	35	-	-	+	1
11	-	-	-	0	36	-	-	-	0
12	-	-	+	1	37	-	-	+	1
13	-	-	-	0	38	+	+	+	3
14	-	-	+	1	39	-	-	+	1
15	-	-	+	1	40	-	-	+	1
16	-	-	-	0	41	-	-	-	0
17	-	-	+	1	42	-	-	+	1
18	-	-	-	0	43	-	-	+	1
19	-	-	+	1	44	-	-	-	0
20	-	-	+	1	45	-	-	-	0
21	-	-	+	1	46	-	-	+	1
22	-	-	+	1	47	-	-	+	1
23	-	-	+	1	48	-	-	-	0
24	-	-	-	0	49	-	-	-	0
25	-	-	-	0	50	-	-	-	0

PM: Polimorfismo

PM 565: cambio de ATC por ACC (Isoleucina → Treonina)

PM 609: cambio de TCC por CCC (Serina → Prolina)

PM 611: cambio de ATT por ATC (Isoleucina)

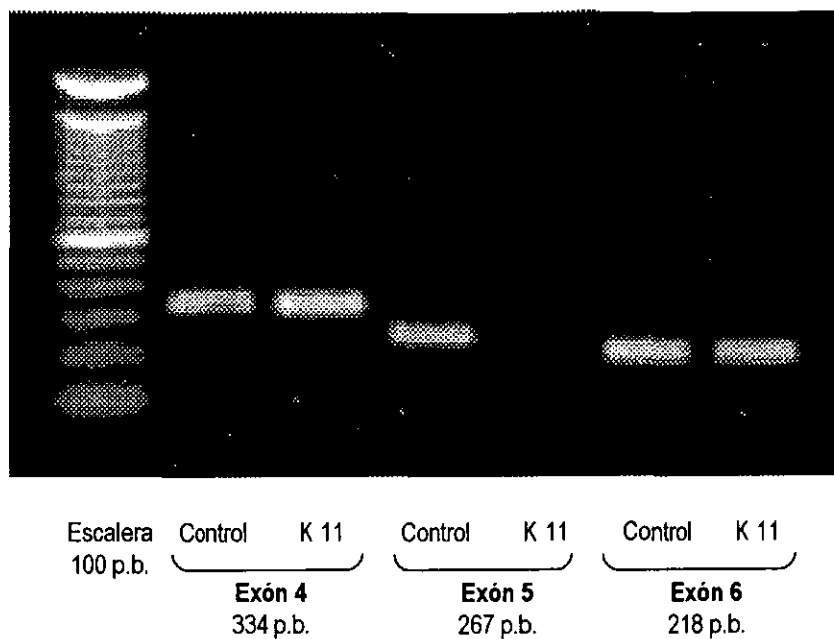


FIGURA 4: Delección del exón 5 del gen KAL en un sujeto (K11) con síndrome de Kallmann.

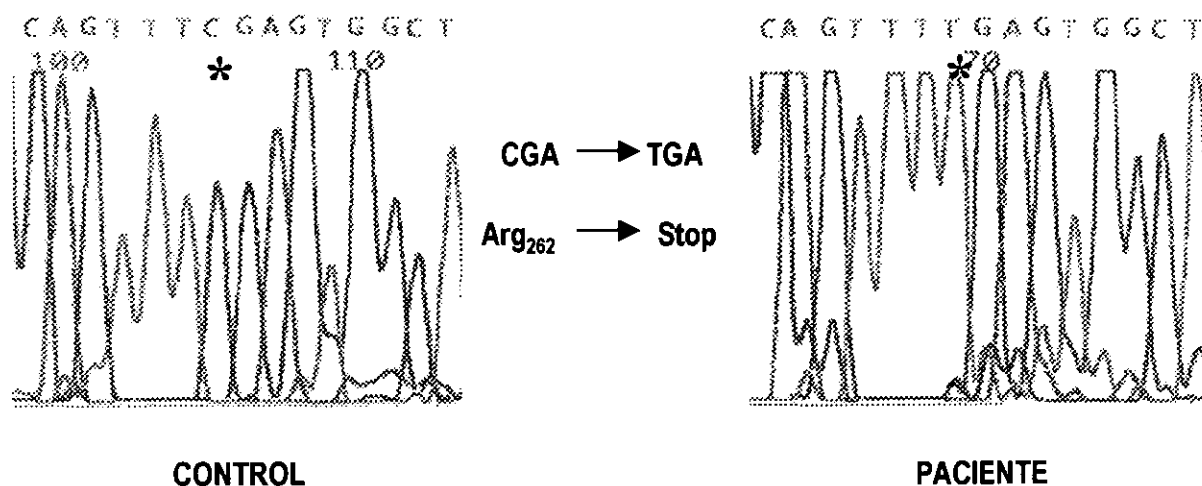


FIGURA 5: Mutación puntual (CGA por TGA) que origina un codón de terminación prematuro (Stop) en el exón 6 del gen KAL en un sujeto (K 10) con síndrome de Kallmann. El asterisco señala su ubicación.

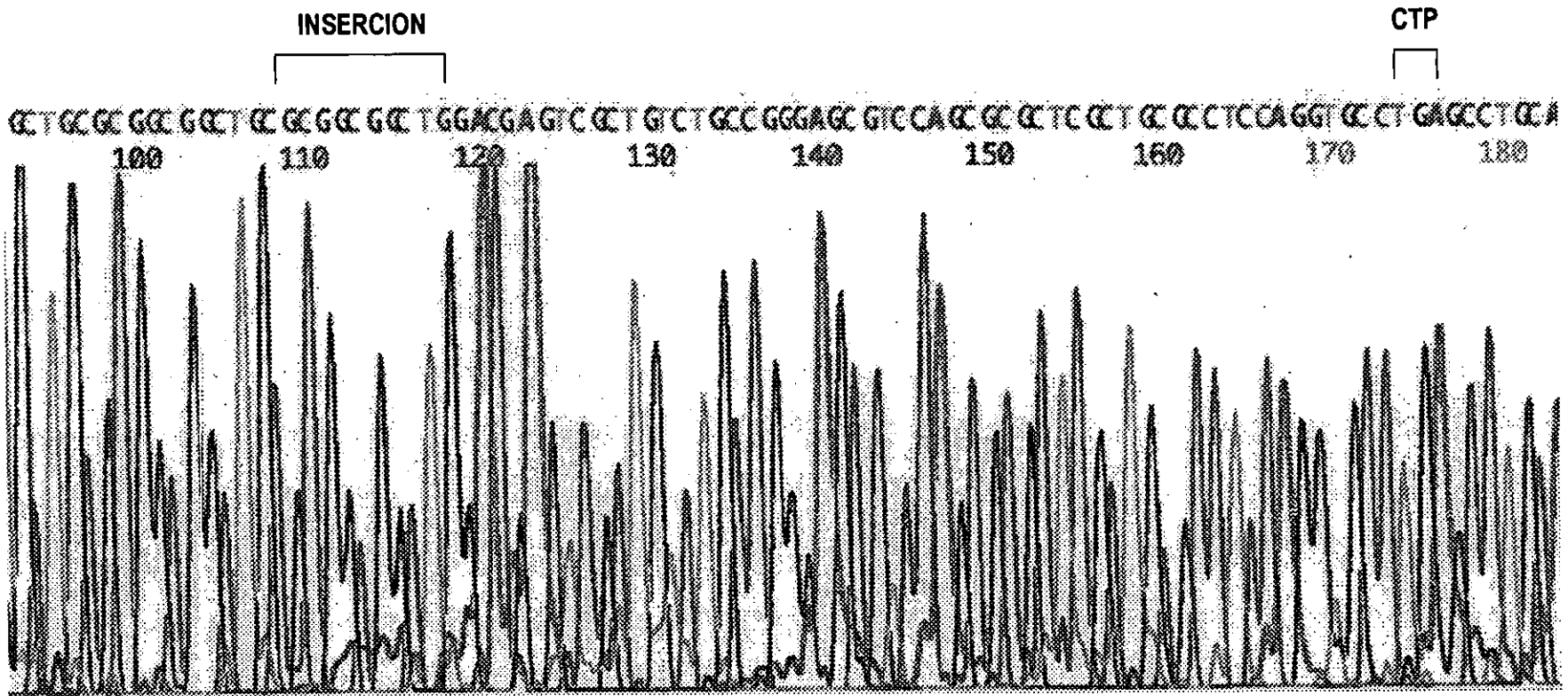
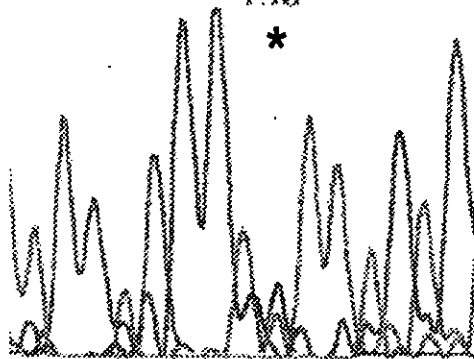


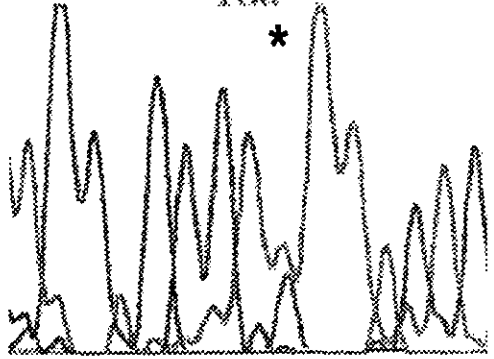
FIGURA 6: Inserción de 11 p.b. que corresponde a una duplicación de la secuencia que antecede, en el exón 1 del gen KAL. La misma, ocasiona un codón de terminación prematuro (CTP) debido a un cambio en el marco de lectura.

TGGTGCCAGAAATCAC
150



SECUENCIA NORMAL

TGGTGCANAATCAC
160

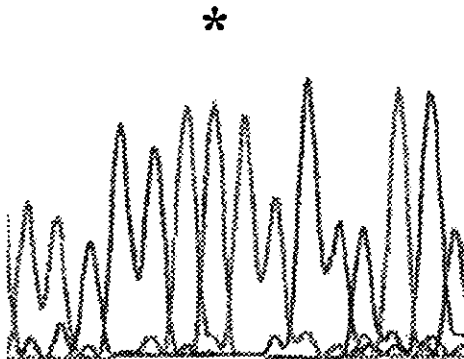


SECUENCIA POLIMORFICA

CAG → CAA
Gln₇₈

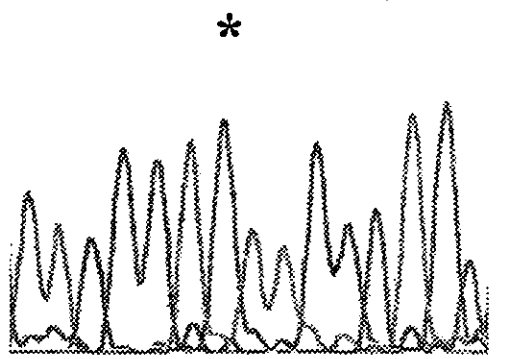
FIGURA 7: Polimorfismo encontrado en el exón 2 del gen KAL. El mismo no ocasiona cambio en el aminoácido codificado (Glicina). El asterisco señala su ubicación.

AAGCCTATTGGCTGC
210



SECUENCIA NORMAL

AAGCCTGTTGGCTGC
210 220



SECUENCIA POLIMORFICA

ATT → GTT
Ile₅₃₄ → Val

FIGURA 8: Polimorfismo encontrado en el exón 11 del gen KAL. El mismo ocasiona un cambio de Isoleucina por Valina (ATT por GTT) en la posición 534 de la proteína. El asterisco señala su ubicación.

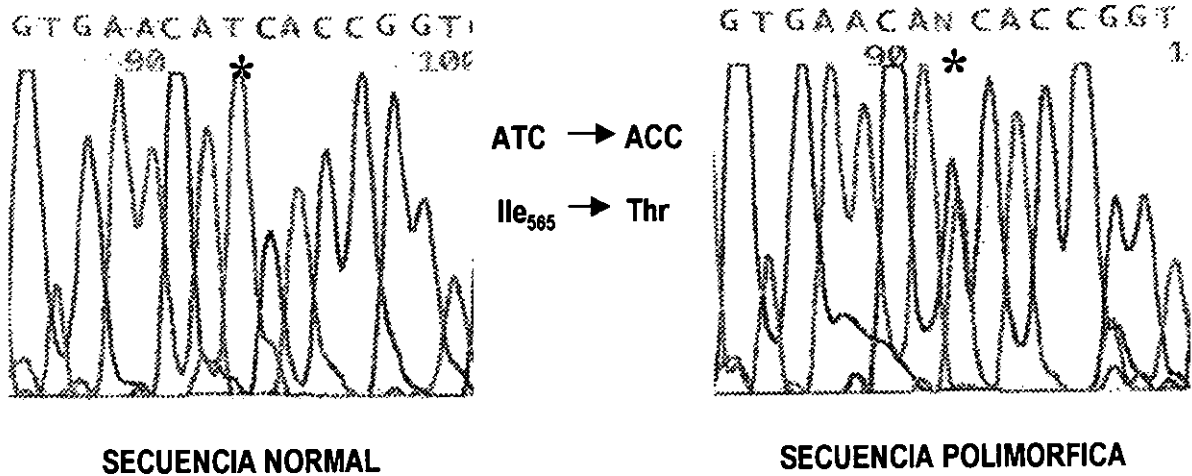


FIGURA 9: Polimorfismo encontrado en el exón 12 del gen KAL. El mismo ocasiona un cambio de Isoleucina por Treonina (ATC por ACC) en la posición 565 de la proteína. El asterisco indica su ubicación.

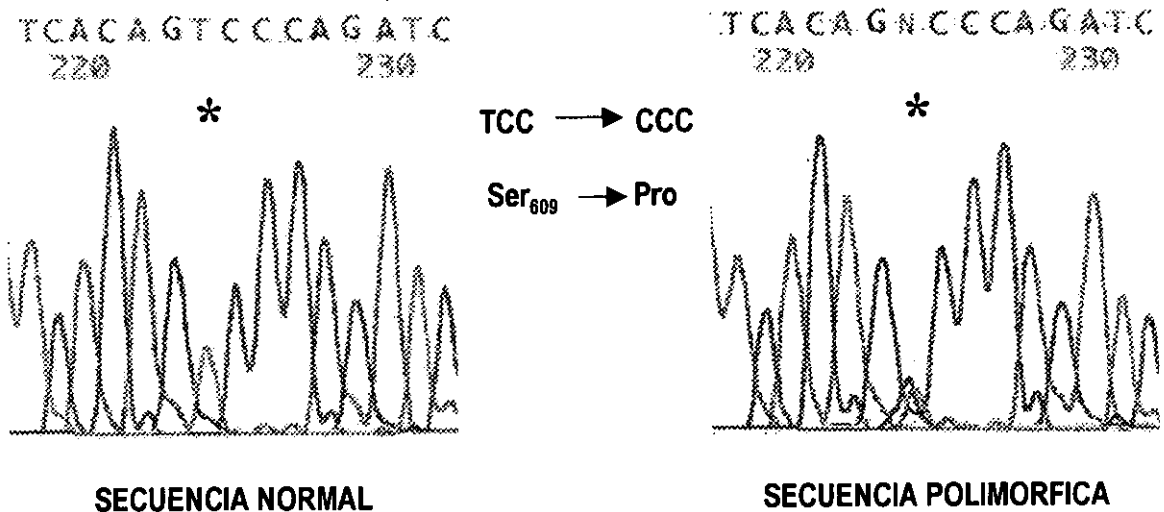
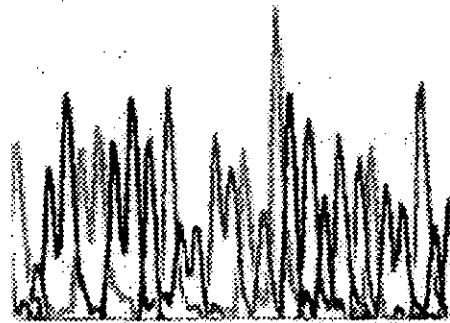


FIGURA 10: Polimorfismo encontrado en el exón 12 del gen KAL. El mismo ocasiona un cambio de Serina por Prolina (TCC por CCC) en la posición 609 de la proteína. El asterisco señala su ubicación.

síndrome de Kallmann, no demostró la presencia de alteraciones moleculares en este gen.

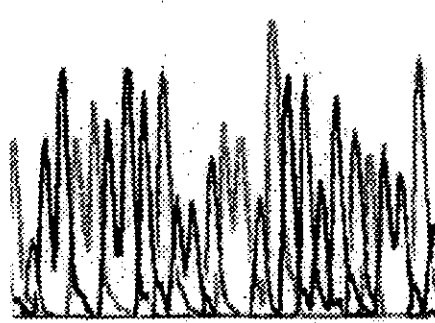
Cincuenta individuos sanos (100 alelos), clasificados como estadio de Tanner 5 y con fertilidad probada, no presentaron la mutación en el nucleótido 268, siendo homocigotos para la forma silvestre del receptor.

ACCGACCTGTGGAAGACTCTGATTGTG
270 280 290



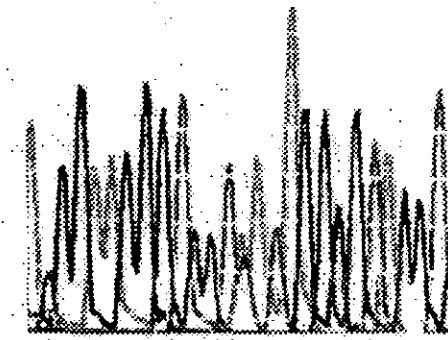
CONTROL

ACCGACCTGTGGAAGACTCTGATTGTG
10 300 310



HOMOCIGOTA

ACCGACCTGTGGAAGACTCTGATTGTG
300 310



HETEROCIGOTA

GAG → AAG

Glu₉₀ → Lys

FIGURA 12: Secuencia parcial del exón 1 del gen del receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas que muestra una mutación puntual homocigota (sustitución de G por A) en el nucleótido 268 (*) en los dos hermanos afectados (panel central) que condiciona un cambio de ácido glutámico por lisina en la posición 90 de la proteína. En el panel derecho, se observa el estado heterocigota (tanto G como A) en la posición 268 (*) que presentaron ambos padres y un hermano sano. Una hermana sana era homocigota para la forma silvestre del receptor (panel izquierdo).

DISCUSION

En los individuos sanos al inicio de la pubertad existe una reactivación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada la cual condiciona los cambios específicos de esta etapa del desarrollo (Boyar *et al.*, 1974). Los sujetos con hipogonadismo hipogonadotrópico no presentan desarrollo gonadal ni de caracteres sexuales secundarios debido a una alteración en la síntesis de GnRH y/o de gonadotropinas, en la mayoría de los casos condicionada por una deficiencia primaria y aislada en la síntesis de GnRH. Este padecimiento ha sido dividido en dos grandes grupos: hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático y síndrome de Kallmann, existiendo en este último anosmia o hiposmia asociadas (Layman, 1991).

En este trabajo investigamos la presencia de mutaciones en el gen KAL y en el gen del receptor de GnRH en pacientes con síndrome de Kallmann y con hipogonadismo hipogonadotrópico familiar o esporádico.

En los últimos años se han descrito diversas mutaciones en el gen KAL en algunos de los pacientes afectados por la forma ligada al cromosoma X de esta enfermedad, habiéndose descrito desde mutaciones puntuales hasta deleciones completas de dicho gen (Ballabio *et al.*, 1989; Bick *et al.*, 1992; Hardelin *et al.*, 1992; Bouloux *et al.*, 1993; Hardelin *et al.*, 1993a; 1993b; Meindl *et al.*, 1993; Klink *et al.*, 1994; Paige *et al.*, 1994; Martul *et al.*, 1995; Parenti *et al.*, 1995; Quinton *et al.*, 1996; Georgopoulos *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1998; Maya-Núñez *et al.*, 1998a; O'Neill *et al.*, 1998; Weissortel *et al.*, 1998; Izumi *et al.*, 1999; Maya-Núñez *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2000; Nagata *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2001). En el presente trabajo encontramos alteraciones genéticas del gen KAL en 3 de los 12 *propósi* estudiados con síndrome de Kallmann (una deleción del exón 5; una mutación puntual en el exón 6 y una inserción de 11 p.b. en el exón 1). Esto representa la presencia de mutaciones en el 25% de los sujetos, lo cual se encuentra por

debajo de la frecuencia reportada en otros estudios que, en conjunto, ha sido un poco menor al 50% (Ballabio *et al.*, 1989; Hardelin *et al.*, 1992; 1993b; Quinton *et al.*, 1996; Georgopoulos *et al.*, 1997; Maya-Núñez *et al.*, 1998b). Nuestro hallazgo confirma la observación de que la forma ligada al cromosoma X del síndrome de Kallmann no constituye la forma principal de presentación en individuos con esta alteración, confirmándose así la heterogeneidad genética de esta enfermedad (Quinton *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2001).

Dos de las mutaciones (la delección del exón 5 y la mutación de CGA por TGA que condiciona un cambio de Arg₂₆₂ por un codón de terminación prematuro en el exón 6) se presentaron en la región que codifica para las cuatro repeticiones de fibronectina tipo III de la proteína *Kal* que corresponde a un dominio involucrado en procesos de migración neuronal y en el establecimiento del contacto entre los axones y las neuronas del bulbo olfatorio (Figura 2) (del Castillo *et al.*, 1992; Hynes y Lander, 1992). La mutación puntual encontrada no había sido descrita previamente. Esto apoya el concepto de que las mutaciones en el gen del síndrome de Kallmann se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo de los 14 exones.

La inserción de 11 pares de bases se encuentra localizada en el exón 1. Este exón codifica para la región altamente conservada y rica en cisteínas de la porción amino terminal de la proteína *Kal* (Figura 2) (del Castillo *et al.*, 1992). Este caso constituye el cuarto reporte de una alteración molecular encontrada en dicha región que condiciona síndrome de Kallmann (Gu *et al.*, 1998; Maya-Núñez *et al.*, 1998a; Izumi *et al.*, 1999). Nuestro hallazgo confirma que una mutación en esta región, la cual además condiciona la aparición de un codón de terminación prematuro, ocasiona una pérdida completa en la función de la proteína *Kal*.

La ausencia de alteraciones moleculares en 9 de los pacientes estudiados amplía y confirma estudios previos, en los cuales no se han encontrado mutaciones en un alto porcentaje de pacientes con

síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X (Hardelin *et al.*, 1993b; Quinton *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2001). La presencia de alteraciones en las regiones reguladoras del promotor del gen KAL, en las regiones no traducidas de los exones 1 y 14 o dentro de los intrones (Hardelin *et al.*, 1993a; Quinton *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2001), o bien la existencia de otro(s) gen(es) participante(s) en el síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X deberán de ser consideradas como posibles explicaciones para la presencia de síndrome de Kallmann en estos individuos (Seminara *et al.*, 1998; Layman, 1999; Oliveira *et al.*, 2001).

La asociación de polimorfismos en un mismo sujeto fue importante en este grupo de estudio, ya que 8 de los 9 pacientes con síndrome de Kallmann que no presentaron mutaciones en el gen KAL (Tabla 10) y 10 de los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico (Tabla 11), presentaron la coexistencia de tres, cuatro o cinco polimorfismos en el gen KAL. Esto difirió sustancialmente de lo evidenciado en el grupo de controles, en el cual solamente un sujeto de los cincuenta estudiados presentó la asociación de 3 polimorfismos, dos sujetos presentaron concomitantemente dos polimorfismos y los demás presentaron uno o ningún polimorfismo en este gen (Tabla 12).

La existencia de múltiples polimorfismos en algunos de los individuos afectados, en los cuales no se encontró mutación alguna en el gen KAL, pudiese indicar que la presencia de los mismos fuese la causa del padecimiento. A pesar del supuesto de que los polimorfismos aparentemente no predisponen a la presencia de enfermedad, ha sido demostrado que pueden estar asociados a diferentes entidades patológicas, como por ejemplo: la eliptocitosis hereditaria, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la diabetes mellitus tipo 2, las enfermedades tiroideas autoinmunes, la nefropatía por IgA o la artritis reumatoide (Alloisio *et al.*, 1991; Goldfarb *et al.*, 1992; Hager *et al.*, 1995; Van Sande *et al.*, 1995; Walston *et al.*, 1995; Rau *et al.*, 2001; Tsuge *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001).

En 1992 fue clonado el DNA complementario del GnRH-R (Kakar *et al.*, 1992). En años recientes, se

han reportado 7 familias con mutaciones en el gen del GnRH-R (de Roux *et al.*, 1997; Layman *et al.*, 1998; Caron *et al.*, 1999; de Roux *et al.*, 1999; Pralong *et al.*, 1999; Seminara *et al.*, 2000; Beranova *et al.*, 2001). De Roux *et al.* (1997), describieron una familia con mutaciones inactivantes heterocigotas compuestas en los codones 106 y 262. Posteriormente, reportaron otra familia en la que todos los sujetos afectados fueron heterocigotos compuestos para una mutación en el codón 262 en un alelo y dos mutaciones en los codones 106 y 217 en el otro alelo (de Roux *et al.*, 1999). Layman *et al.* (1998), estudiaron una familia con mutaciones heterocigotas compuestas en los codones 262 y 284. Caron *et al.* (1999), reportaron una familia con mutaciones heterocigotas compuestas en los codones 129 y 262. Seminara *et al.* (2000) describen el caso índice de una familia con dos mutaciones heterocigotas, siendo cada uno de los padres portadores de una de ellas; mientras que Pralong *et al.* (1999) y Beranova *et al.* (2001) describen las primeras mutaciones en estado homocigoto en los codones 168 y 106 respectivamente. En este estudio pudimos demostrar una mutación homocigota del GnRH-R, que no había sido reportada previamente, en una familia (de tres estudiadas) con dos sujetos afectados, que presentaban hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático completo.

El espectro fenotípico del hipogonadismo hipogonadotrópico en los pacientes con mutaciones heterocigotas compuestas en el gen del GnRH-R es variable, presentándose desde una forma de hipogonadismo parcial con concentraciones significativas de gonadotropinas y esteroides gonadales, hasta aquellos casos en los cuales el hipogonadismo es completo (de Roux *et al.*, 1997; Layman *et al.*, 1998; Caron *et al.*, 1999; de Roux *et al.*, 1999). Asimismo, se ha observado una variación importante en el grado de hipogonadismo hipogonadotrópico en pacientes pertenecientes a una misma familia y que presentan la misma mutación heterocigota compuesta (Caron *et al.*, 1999; de Roux *et al.*, 1999). Estas diferencias sugieren que existe la influencia de una gran variedad de factores sobre la expresión del fenotipo, habiéndose

sugerido incluso un dimorfismo sexual en la tolerancia a las alteraciones en la función de la GnRH (de Roux *et al.*, 1999). En contraste, los pacientes con mutaciones homocigotas descritos por Pralong *et al.* (1999) y Beranova *et al.* (2001), así como nuestros *propósi* homocigotos, presentaron un fenotipo de deficiencia completa de GnRH lo cual se comprueba por la presencia de micropene y criptorquidia bilateral, por las concentraciones sumamente bajas de gonadotropinas y consecuentemente de testosterona (Tabla 4), así como por la ausencia de respuesta a la estimulación con GnRH exógena. El hecho de que una mutación homocigota haya inducido en todos los casos reportados la presencia de hipogonadismo hipogonadotrópico completo no puede ser determinada únicamente por tres reportes, por lo que el estudio de más sujetos con este tipo de alteraciones es imprescindible.

Por otro lado, este estudio amplía reportes previos (de Roux *et al.*, 1997; Layman *et al.*, 1998; Caron *et al.*, 1999; de Roux *et al.*, 1999; Pralong *et al.*, 1999; Kottler *et al.*, 2000; Seminara *et al.*, 2000; Beranova *et al.*, 2001) de que, al igual que en otros receptores de la misma familia (LH, FSH y TSH), el receptor de GnRH puede verse afectado por una variedad de mutaciones inactivantes que inducen la pérdida parcial o total de la función (Aittomäki *et al.*, 1995; de Roux *et al.*, 1996; Latronico *et al.*, 1996).

Un hallazgo adicional de nuestro trabajo es que la mutación Glu90Lys induce hipogonadismo hipogonadotrópico solamente cuando se encuentra en estado homocigoto, debido al hecho de que fué silente en el estado heterocigoto, siendo por ello heredada en forma autosómica recesiva, lo que concuerda con el estudio de Pralong *et al.* (1999). Con base en el hecho de que el alelo mutado puede encontrarse presente en los sujetos normales, estudiamos a 50 individuos sanos (100 alelos) en estadio 5 de Tanner. En ninguno de estos individuos se demostró la variación génica encontrada en los pacientes, lo que indica, en esta muestra, una frecuencia génica menor del 1%.

La mutación Glu90Lys se localiza en el segundo dominio transmembranal (TM) del receptor de

GnRH, siendo ésta la primera mutación espontánea reportada en este dominio. En estudios previos, se han descrito mutaciones en la primera y tercera asas intracelulares, así como en el tercero, en el cuarto y en el sexto dominios transmembranales (de Roux *et al.*, 1997; Layman *et al.*, 1998; Caron *et al.*, 1999; de Roux *et al.*, 1999; Pralong *et al.*, 1999; Kottler *et al.*, 2000; Seminara *et al.*, 2000; Beranova *et al.*, 2001). Nosotros asumimos que la mutación Glu90Lys afecta la función del GnRH-R considerando que en el GnRH-R de los mamíferos, el aminoácido Asp87 localizado en el TM-2 (el cual es sustituido por una Asn altamente conservada en la mayoría de los demás receptores acoplados a proteínas G que provienen de la familia de las rodopsinas/ β -adrenérgicos), interacciona con el Asp318 (Asn en otros receptores) en el TM-7, formándose un microdominio hélice-2/hélice-7 estructural y funcional que ha sido recientemente implicado en la expresión del receptor, así como en su activación e interacción con las pequeñas proteínas G heterotriméricas (Tabla 13) (Zhou *et al.*, 1994; Seaffon *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 1998; Ulloa-Aguirre y Conn, 1998; Flanagan *et al.*, 1999). De esta forma, una mutación cercana al aminoácido altamente conservado (Asn87) puede afectar la estructura terciaria de la α -hélice, provocándose una perturbación estructural al alterar la conformación del microdominio hélice-2/hélice-7, que puede impedir la expresión y/o la activación del receptor. Asimismo, hay que considerar que en particular la lisina puede potencialmente modificar la estructura de la α -hélice hidrofóbica, al añadir cargas positivas, como ha sido recientemente ejemplificado en un estudio en el cual la delección de Lys191 ocasiona una expresión del receptor cuatro veces mayor (Arora *et al.*, 1999). Asimismo, es importante considerar que cuando el aminoácido Glu90, el cual se encuentra totalmente conservado en todos los GnRH-R de los mamíferos clonados hasta el momento (Zhou *et al.*, 1994) es sustituido, el receptor se transforma en una proteína incapaz de unir a su ligando o de traducir la señal (Hoffmann *et al.*, 2000).

En este estudio identificamos una mutación en el GnRH-R en una de las tres familias con hipogonadismo hipogonadotrópico aislado estudiadas. Con el fin de poder determinar la prevalencia

exacta de estas mutaciones se requiere del estudio de un mayor número de pacientes. Debido a la presencia de aparente consanguinidad en la familia afectada, nosotros suponemos que la mutación deriva de un ancestro común.

Esta mutación constituye la primera descripción de una mutación localizada en el segundo dominio transmembranal (Glu90Lys) del GnRH-R, indicando que la integridad del ácido glutámico en esa posición es crucial para la función del receptor. De igual manera, este reporte complementa otros al demostrar que dichas mutaciones se encuentran distribuidas a lo largo del gen del receptor de GnRH.

Tabla 13: Dominios transmembranales 2 y 7 en receptores acoplados a proteínas G de la familia de las rodopsinas/ β adrenérgicos

Receptor		TM 2 87			TM 7 318	
Hormona liberadora de gonadotropinas	HLTLA	N	LLETL	LNPCF	D	PLIYG
Hormona luteinizante	NLSFA	D	FCMGL	LFYPI	N	SCANP
Hormona foliculo estimulante	NLAFA	D	LCIGI	LFHPI	N	SCANP
Hormona tiroestimulante	NLAFA	D	FCMGM	LFYPL	N	SCANP
Neurotensina	SLALS	D	LLTLL	VSSTI	N	PILYN
Colecistocinina	SLAVS	D	LLLAV	ASACV	N	PLVYC
5-Hidroxitriptamina	SLAIA	D	MLVGL	VCSGI	N	PLVYT

N: Asparagina
D: Acido aspártico

(Zhou *et al.*, 1994)

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor

Al comité tutorial

A mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo

Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI

I.M.S.S.

Este proyecto fue financiado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Apoyo # 29790M),

así como por la Coordinación de Investigación Médica del I.M.S.S.

(Fondo del Fomento a la Investigación; Apoyo # FP 038/788).

BIBLIOGRAFIA

- Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 99:391-395, 1997.
- Aittomäki K, Dieguez Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehwäsälä H, Engel AR, Nieschlag E, Huhtaniemi I, de la Chappelle A. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 82:959-968, 1995.
- Alloisio N, Morlé L, Marechal J, Roux AF, Ducluzeau MT, Guetarni D, Pothier B, Baklouti F, Ghanem A, Kastally R. Sp alpha V/41: a common spectrin polymorphism at the alpha IV-alpha V domain junction. Relevance to the expression level of hereditary elliptocytosis due to alpha-spectrin variants located in trans. *J Clin Invest* 87:2169-2177, 1991.
- Arora KK, Chung HO, Catt KJ. Influence of a species-specific extracellular amino acid on expression and function of the human gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 13:890-896, 1999.
- Ascoli M. Internalization and degradation of receptor-bound human choriogonadotropin in Leydig tumor cells. Fate of the hormone subunits. *J Biol Chem* 257:13306-13311, 1982.
- Ballabio A, Parenti G, Tippet P, Mondello C, DiMaio S, Tenore A, Andria G. X-linked ichthyosis due to steroid sulphatase deficiency associated with Kallmann syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia): Linkage relationships with Xg and cloned DNA sequences from the distal short arm of the X chromosome. *Hum Genet* 72:237-240, 1986.
- Ballabio A, Bardoni B, Carozzo R, Andria G, Bick D, Campbell L, Hamel B, Ferguson-Smith MA, Gimelli G, Fraccaro M, Maraschio P, Zuffardi O, Guioli S, Camerino G. Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10001-10005, 1989.
- Ballesteros JA, Weinstein H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci* 25:366-428, 1995.
- Barraclough CA, Wise PM. The role of catecholamines in the regulation of the pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocr Rev* 3:91-119, 1982.
- Beitins IZ, Dufau ML, O'Loughlin K, Catt KJ, McArthur JW. Analysis of biological and immunological activities in the two pools of LH released during constant infusion of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in men. *J Clin Endocrinol Metab* 45:605-608, 1977.

- Bell J, Spitz I, Slonim A, Perlman A, Segal S, Palti Z, Rabinowitz D. Heterogeneity of gonadotropin responses to LHRH in hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 36:791-794, 1973.
- Beranova M, Oliveira LMB, Bédécarrats GY, Schipani E, Vallejo M, Ammini AC, Quintos JB, Hall JE, Martin KA, Hayes FJ, Pitteloud N, Kaiser UB, Crowley WF Jr, Seminara SB. Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1580-1588, 2001.
- Bergland RM, Page RB. Can the pituitary secrete directly to the brain? (affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* 102:1325-1338, 1978.
- Bick D, Franco B, Sherins RJ, Heye B, Pike L, Crawford J, Maddalena A, Incerti B, Pragliola A, Meitinger T, Ballabio A. Brief report: intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *N Engl J Med* 326:1752-1755, 1992.
- Bimbacher R, Wandl-Vergesslich K, Frisch H. Diagnosis of X-recessive Kallmann syndrome in early infancy. Evidence of hypoplastic rhinencephalon. *Eur J Pediatr* 153: 245-247, 1994.
- Bouloux PMG, Kirk J, Munroe P, Duke V, Meindl A, Hilson A, Grant D, Carter N, Betts D, Meitinger T, Besser GM. Deletion analysis maps ocular albinism proximal to the steroid sulphatase locus. *Clin Genet* 43:169-173, 1993.
- Bourne GA, Baldwin DM. Evidence for cAMP as a mediator of gonadotropin secretion from female pituitaries. *Am J Physiol* 253:E290-E295, 1987.
- Boyar RM, Rosenfeld RS, Kapen S, Finkelstein JW, Roffwarg HP, Weitzman ED, Hellman L. Human puberty: simultaneous augmented secretion of luteinizing hormone and testosterone during sleep. *J Clin Invest* 54:609-618, 1974.
- Calof AL, Chikaraishi DM. Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor *in vitro*. *Neuron* 3:115-127, 1989.
- Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, Weber RF, D'Agata R. Interaction between prolactin and catecholamines on hypothalamic GnRH release *in vitro*. *J Endocrinol* 151:269-275, 1996.
- Canto P, Vilchis F, Chávez B, Mutchinick O, Imperato-McGinley J, Pérez-Palacios G, Ulloa-Aguirre A, Méndez JP. Mutations of the 5- α reductase type 2 gene in eight Mexican patients from six different pedigrees with 5- α reductase-2 deficiency. *Clin Endocrinol* 46:155-160, 1997.

- Caron P, Chauvin S, Christin-Maitre S, Bennet A, Lahlou N, Counis R, Bouchard P, Kottler ML. Resistance of hypogonadic patients with mutated GnRH receptor genes to pulsatile GnRH administration. *J Clin Endocrinol Metab* 84:990-996, 1999.
- Castillo RH, Matteri RL, Dumesic DA. Luteinizing hormone synthesis in cultured fetal human pituitary cells exposed to gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 75:318-322, 1992.
- Catt KJ, Dufau ML. Basic concepts of mechanism of action of peptide hormones. *Biol Reprod* 14:1-15, 1976.
- Catt KJ, Stojilkovic SS. Calcium signaling and gonadotropin secretion. *Trends Endocrinol Metab* 1:15-19, 1989.
- Chang JP, Graeter J, Catt KJ. Dynamic actions of arachidonic acid and protein kinase C in pituitary stimulation by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 120:1837-1845, 1987.
- Chang JP, Stojilkovic SS, Graeter JS, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone stimulates luteinizing hormone secretion by extracellular calcium-dependent and -independent mechanisms. *Endocrinology* 123:87-97, 1988.
- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 4:179-211, 1983.
- Chi L, Zhou W, Prikhozhan A, Flanagan C, Davidson JS, Golemba M, Illing N, Millar RP, Sealton SC. Cloning and characterization of the human GnRH receptor. *Mol Cell Endocrinol* 91:R1-R6, 1993.
- Colquhoun-Kerr JS, Gu WX, Jameson JL, Withers S, Bode HH. X-linked Kallmann syndrome and renal agenesis occurring together and independently in a large Australian family. *Am J Med Genet* 83:23-27, 1999.
- Conn PM, Marian J, McMillian M, Stern J, Rogers D, Hamby M, Penna A, Grant E. Gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary: a three step mechanism. *Endocr Rev* 2:174-185, 1981.
- Conn PM, Crowley WF Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med* 324:93-103, 1991.
- Conn PM, Crowley WF Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med* 45:391-405, 1994.
- Conn MP, Janovick JA, Stanislaus D, Kuphal D, Jennes L. Molecular and cellular bases of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary and central nervous system. *Vitam Horm* 50:151-214, 1995.
- Comea A, Janovick JA, Stanislaus D, Conn PM. Redistribution of Gq/11alpha in the pituitary gonadotrope in response to a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Endocrinology* 139:397-402, 1998.

- Crowley WF Jr, Filicori M, Spratt DI, Santoro NF. The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. *Recent Prog Horm Res* 41:473-531, 1985.
- Danek A, Heye B, Schroedter R. Cortically evoked motor responses in patients with Xp22.3-linked Kallmann's syndrome and in female gene carriers. *Ann Neurol* 31:299-304, 1992.
- Davidson JS, Flanagan CA, Zhou W, Becker II, Elario R, Emeran W, Sealfon SC, Millar RP. Identification of N-glycosylation sites in the gonadotropin-releasing hormone receptor: role in receptor expression but not ligand binding. *Mol Cell Endocrinol* 107:241-245, 1995.
- Davidson JS, McArdle CA, Davies P, Elario R, Flanagan CA, Millar RP. Asn102 of the gonadotropin-releasing hormone receptor is a critical determinant of potency for agonists containing C-terminal glycine. *J Biol Chem* 271:15510-15514, 1996.
- de Roux N, Misrahi M, Brauner R, Houang M, Carel JC, Granier M, Le Bouc Y, Ghinea N, Boumedienne A, Toublanc JE, Milgrom E. Four families with loss of function mutations of the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4229-4235, 1996.
- de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, Milgrom E. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med* 337:1597-1602, 1997.
- de Roux N, Young J, Brailly-Tabard S, Misrahi M, Milgrom E, Schaison G. The same molecular defects of the gonadotropin-releasing hormone receptor determine a variable degree of hypogonadism in affected kindred. *J Clin Endocrinol Metab* 84:567-572, 1999.
- del Castillo I, Cohen-Salmon M, Blanchard S, Lutfalla G, Petit C. Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome. *Nat Genet* 2:305-310, 1992.
- Dohlman HG, Thormer J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model system for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60:653-688, 1991.
- Drenth J, Low BW, Richardson JS, Wright CS. The toxin-agglutinin fold. A new group of small protein structures organized around a four-disulfide core. *J Biol Chem* 255: 2652-2655, 1980.
- Duke VM, Winyard PJD, Thorogood P, Soothill P, Bouloux PMG, Woolf AS. KAL, a gene mutated in Kallmann's syndrome, is expressed in the first trimester of human development. *Mol Cell Endocrinol* 110:73-79, 1995.
- Edelman GM, Crossin KL. Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu Rev Biochem* 60:155-190, 1991.

Fan NC, Jeung EB, Peng C, Olofsson JI, Krisinger J, Leung PC. The human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene: cloning, genome organization and chromosomal assignment. *Mol Cell Endocrinol* 103:R1-R6, 1994.

Fan NC, Peng C, Krisinger J, Leung PC. The human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiple promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signals. *Mol Cell Endocrinol* 107:R1-R8, 1995.

Fiddes JC, Talmadge K. Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones. *Recent Prog Horm Res* 40:43-78, 1984.

Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 253:401-406, 1991.

Flanagan CA, Zhou W, Chi L, Yuen T, Rodic V, Robertson D, Johnson M, Holland P, Millar RP, Weinstein H, Mitchell R, Sealfon SC. The functional microdomain in transmembrane helices 2 and 7 regulates expression, activation, and coupling pathways of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 274:28880-28886, 1999.

Forest MG. Pituitary gonadotropin and sex steroid secretion during the first two years of life. In: Grumbach MM, Sizonenko PC, Aubert ML (eds). *Control of the onset of puberty*. Williams & Wilkins, Baltimore, p.p. 451-478, 1990.

Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, Carozo R, Maestrini E, Pieretti M, Taillon-Miller P, Brown CJ, Willard HF, Lawrence C, Persico MG, Camerino G, Ballabio A. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 353:529-536, 1991.

Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF. Serum leptine levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2849-2855, 1997.

Garcia-Rubí E, Vazquez-Alemán D, Méndez JP, Salinas JL, Garza-Flores J, Ponce de León S, Pérez-Palacios G, Ulloa-Aguirre A. The effects of opioid blockade and GnRH administration upon luteinizing hormone secretion in patients with anorexia nervosa during the stages of weight loss and weight recovery. *Clin Endocrinol* 37:520-528, 1992.

Gasztonyi Z, Barsi P, Czeizel AE. Kallmann syndrome in three unrelated women and an association with femur-fibula-ulna dysostosis in one case. *Am J Med Genet* 93:176-180, 2000.

Georgopoulos NA, Pralong FP, Seidman CE, Seidman JG, Crowley WF Jr, Vallejo M. Genetic heterogeneity evidenced by low incidence of KAL-1 gene mutations in sporadic cases of gonadotropin-releasing hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 82:213-217, 1997.

Gharib SD, Wierman ME, Badger TM, Chin WW. Sex steroid hormone regulation of follicle-stimulating hormone subunit messenger ribonucleic acid (mRNA) levels in rat. *J Clin Invest* 80:294-299, 1987.

Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, Pendelbury WW. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 258:806-808, 1992.

Gordon DF, Wood WM, Ridgway EC. Organization and nucleotide sequence of the mouse alpha-subunit gene of the pituitary glycoprotein hormones. *DNA* 7:679-690, 1988.

Grosse R, Schmid A, Schoneberg T, Herrlich A, Muhn P, Schultz G, Gudermann T. Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to G (q/11) proteins. *J Biol Chem* 275:9193-9200, 2000.

Grumbach MM, Kaplan SL. The neuroendocrinology of human puberty: an ontogenetic perspective. In: Grumbach MM, Sizonenko PC, Aubert ML (eds) *Control of the Onset of Puberty*. Williams & Wilkins, Baltimore, p.p. 1-68, 1990.

Gu WX, Colquhoun-Kerr JS, Kopp P, Bode HH, Jameson JL. A novel aminoterminal mutation in the KAL-1 gene in a large pedigree with X-linked Kallmann syndrome. *Mol Genet Metab* 65:59-61, 1998.

Hager J, Hansen L, Vaisse C, Vionnet N, Philippi A, Poller W, Velho G, Carcassi C, Contu L, Julier C. A missense mutation in the glucagon receptor gene is associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat Genet* 9:299-304, 1995.

Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA, Crowley WF Jr. Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 74:600-607, 1992.

Hardelin JP, Levilliers J, del Castillo I, Cohen-Salmon M, Legouis R, Blanchard S, Compain S, Bouloux P, Kirk J, Moraine C, Chaussain JL, Weissenbach J, Petit C. X chromosome-linked Kallmann syndrome: stop mutations validate the candidate gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8190-8194, 1992.

Hardelin JP, Levilliers J, Blanchard S, Carel JC, Leutenegger M, Pinard-Bertelto JP, Bouloux P, Petit C. Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum Mol Genet* 2:373-377, 1993a.

Hardelin JP, Levilliers J, Young J, Pholsena M, Legouis R, Kirk J, Bouloux P, Petit C, Schaison G. Xp22.3 deletions in isolated familial Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 76:827-831, 1993b.

Hardelin JP, Julliard AK, Moniot B, Soussi-Yanicostas N, Vemey C, Schwanzel-Fukuda M, Ayer-Le Lievre C, Petit C. Anosmin-1 is a regionally restricted component of basement membranes and interstitial matrices during organogenesis: implications for the developmental anomalies of X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Dev Dyn* 215:26-44, 1999.

Hashimoto O, Nakamura T, Shoji H, Shimasaki S, Hayashi Y, Sugino H. A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 272:13835-13842, 1997.

Hawes BE, Conn PM. Assessment of the role of G proteins and inositol phosphate production in the action of gonadotropin-releasing hormone. *Clin Chem* 39:325-332, 1993.

Hazum E, Conn PM. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action. I. The receptor. *Endocr Rev* 9:379-386, 1988.

Hennighausen LG, Sippel AE. Mouse whey acidic protein is a novel member of the family of "four-disulfide core" proteins. *Nucleic Acids Res* 10:2677-2684, 1982.

Hermanussen M, Sippell WG. Heterogeneity of Kallmann's syndrome. *Clin Genet* 28:106-111, 1985.

Hipkin LJ, Casson IF, Davis JC. Identical twins discordant for Kallmann's syndrome. *J Med Genet* 27:198-199, 1990.

Hoffmann SH, Laak TT, Kühne R, Reiländer H, Beckers T. Residues within transmembrane helices 2 and 5 of the human gonadotropin-releasing hormone receptor contribute to agonist and antagonist binding. *Mol Endocrinol* 14:1099-1115, 2000.

Huckle WR, Conn PM. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone action. II. The effector system. *Endocr Rev* 9:387-395, 1988.

Hutter H, Vogel BE, Plenefisch JD, Norris CR, Proenca RB, Spieth J, Guo C, Mastwal S, Zhu X, Scheel J, Hedgecock EM. Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science* 287:989-994, 2000.

Hynes RO, Lander AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 68:303-322, 1992.

Incerti B, Guioli S, Pragliola A, Zanaria E, Borsani G, Tonlorenzi R, Bardoni B, Franco B, Wheeler D, Ballabio A, Camerino G. Kallmann syndrome gene on the X and Y chromosomes: implications for evolutionary divergence of human sex chromosomes. *Nat Genet* 2:311-314, 1992.

Izumi Y, Tatsumi K, Okamoto S, Hosokawa A, Ueno S, Fukui H, Amino N. A novel mutation of the KAL1 gene in Kallmann syndrome. *Endocr J* 46:651-658, 1999.

Jansen C, Hendriks-Stegeman BI, Jansen M. A novel nonsense mutation of the KAL gene in two brothers with Kallmann syndrome. *Horm Res* 53:207-212, 2000.

Jones J, Kemman E. Olfacto-genital dysplasia in the female. *Obstet Gynecol Annu* 5:443-445, 1976.

Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD. Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189:289-295, 1992.

Kakar SS, Neill JD. The human gonadotropin-releasing hormone receptor gene (GNRHR) maps to chromosome band 4q13. *Cytogenet Cell Genet* 70:211-214, 1995.

Kakar SS. Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol* 137:183-192, 1997.

Kallmann FJ, Schonfeld WA, Barrera SE. The genetic aspects of primary eunuchoidism. *Am J Ment Defic* 48:203-236, 1944.

Kalra SP, Crowley WR. Neuropeptide Y: a novel neuroendocrine peptide in the control of pituitary hormone secretion, and its relation to luteinizing hormone. In: Ganong WF, Martini L (eds). *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press, New York, 13:1-46, 1992.

Kaplan SL, Grumbach MM. The ontogenesis of human foetal hormones. II. Luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone. *Acta Endocrinol (Copenh)* 81:808-829, 1976.

Klink A, Meindl A, Hellebrand H, Rappold GA. A patient with an interstitial deletion in Xp22.3 locates the gene for X-linked recessive chondrodysplasia punctata to within a one megabase interval. *Hum Genet* 93:463-466, 1994.

Kottler ML, Lorenzo F, Bergametti F, Commercon P, Souchier C, Counis R. Subregional mapping of the human gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH-R) gene to 4q between the markers D4S392 and D4S409. *Hum Genet* 96:477-480, 1995.

Kottler ML, Chauvin S, Lahlou N, Harris CE, Johnston CJ, Lagarde JP, Bouchard P, Farid NR, Counis R. A new compound heterozygous mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor (L314X, Q106R) in a woman with complete hypogonadotropic hypogonadism: chronic estrogen administration amplifies the gonadotropin defect. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3002-3008, 2000.

Kramer PR, Wray S. Novel gene expressed in nasal region influences outgrowth of olfactory axons and migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons. *Genes Dev* 14:1824-1834, 2000.

Krummen LA, Woodruff TK, DeGuzman G, Cox ET, Baly DL, Mann E, Garg S, Wong WL, Cossum P, Mather JP. Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology* 132:431-443, 1993.

Lander AD. Understanding the molecules of neural cell contacts: emerging patterns of structure and function. *Trends Neurosci* 12:189-195, 1989.

Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJ, Rapaport R, Mendonca BB, Bloise W, Castro M, Tsigos C, Chrousos GP. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 334:507-512, 1996.

Layman LC. Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: diagnosis, pathogenesis, genetics, and treatment. *Adolesc Pediatr Gynecol* 4:111-118, 1991.

Layman LC, Lanclos KD, Tho SPT, Sweet CR, McDonough PG. Patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism have normal gonadotropin-releasing hormone gene structure. *Adolesc Pediatr Gynecol* 6:214-219, 1993.

Layman LC, Peak DB, Xie J, Sohn SH, Reindollar RH, Gray MR. Mutation analysis of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 68:1079-1085, 1997.

Layman LC, Cohen DP, Jin M, Xie J, Li Z, Reindollar RH, Bolbolan S, Bick DP, Sherins RR, Dick LW, Musgrove LC, Sellers JC, Neill JD. Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Genet* 18:14-15, 1998.

Layman LC. Genetics of human hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Med Genet* 89:240-248, 1999.

Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, Millasseau P, Le Paslier D, Cohen D, Caterina D, Bougueleret L, Delamarre-Van de Waal H, Lutfalla G, Weissenbach J, Petit C. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 67:423-435, 1991.

Legouis R, Lievre CA, Leibovici M, Lapointe F, Petit C. Expression of the KAL gene in multiple neuronal sites during chicken development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2461-2465, 1993.

Liu T-C, Jackson GL. Differential actions of arachidonic acid and melittin on luteinizing hormone release and synthesis. *Neuroendocrinology* 49:617-622, 1989.

Lutz B, Kuratani S, Rugarli EI, Wawersik S, Wong C, Bieber FR, Ballabio A, Eichele G. Expression of the Kallmann syndrome gene in human fetal brain and in the manipulated chick embryo. *Hum Mol Genet* 3:1717-1723, 1994.

- Maestre de San Juan A. Teratología: Falta total de los nervios olfatorios con anosmia en un individuo en quien existía atrofia congénita de los testículos y miembro viril. *El Siglo Med* 3:211-214, 1856.
- Mahachoklertwattana P, Sánchez J, Kaplan SL, Grumbach MM. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors mediate the release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) by NMDA in a hypothalamic GnRH neuronal cell line (GT1-1). *Endocrinology* 134:1023-1030, 1994.
- Marshall JC, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N Engl J Med* 315:1459-1468, 1986.
- Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Paul SJ, Ortolano GA, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 47:155-187, 1991.
- Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 44:291-303, 1969.
- Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45:13-23, 1970.
- Martul P, Pineda J, Levilliers J, Vazquez JA, Rodriguez-Soriano J, Loidan L, Díaz-Pérez JL. Hypogonadotrophic hypogonadism with hyposmia, X-linked ichthyosis, and renal malformation syndrome. *Clin Endocrinol* 42:121-128, 1995.
- Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young WS, Phillips HS, Nikolics K, Seeburg PH. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 234:1366-1371, 1986.
- Mason AJ, Berkemeir LM, Schmelzer CH, Schwall RH. Activin B: precursor sequence, genomic structure and "in vitro" activities. *Mol Endocrinol* 3:1352-1358, 1989.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RMV, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1334-1339, 1971.
- Matsuo T, Okamoto S, Izumi Y, Hosokawa A, Takegawa T, Fukui H, Tun Z, Honda K, Matoba R, Tatsumi K, Amino N. A novel mutation of the KAL1 gene in monozygotic twins with Kallmann syndrome. *Eur J Endocrinol* 143:783-787, 2000.
- Maya-Núñez G, Cuevas-Covarrubias S, Zenteno JC, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Méndez JP. Contiguous gene syndrome due to deletion of the first three exons of the Kallmann gene and complete deletion of the steroid sulphatase gene. *Clin Endocrinol* 48:713-718, 1998a.

Maya-Núñez G, Zenteno JC, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Méndez JP. A recurrent missense mutation in the KAL gene in patients with X-linked Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1650-1653, 1998b.

Maya-Núñez G, Torres L, Ulloa-Aguirre A, Zenteno JC, Cuevas-Covarrubias S, Saavedra-Ontiveros D, Kofman-Alfaro S, Méndez JP. An atypical contiguous gene syndrome: molecular studies in a family with X-linked Kallmann syndrome and X-linked ichthyosis. *Clin Endocrinol* 50:157-162, 1999.

Meindl A, Hosenfeld D, Brückl W, Schuffenhauer S, Jendery J, Bacskulin A, Oppermann HC, Swensson O, Bouloux P, Meitinger T. Analysis of a terminal Xp22.3 deletion in a patient with six monogenic disorders: implications for the mapping of X linked ocular albinism. *J Med Genet* 30:838-842, 1993.

Méndez JP, Schiavon R, Díaz-Cueto L, Ruiz A, Canto P, Söderlund D, Díaz-Sánchez V, Ulloa-Aguirre A. A reliable endocrine test with human menopausal gonadotropins (hMG) for the diagnosis of true hermaphroditism in early infancy. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3523-3526, 1998.

Milenkovic L, D'Angelo G, Kelly PA, Weiner RI. Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1244-1247, 1994.

Mitchell R, McCulloch D, Lutz E, Johnson M, MacKenzie C, Fennell M, Fink G, Zhou W, Sealson SC. Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature* 392:411-414, 1998.

Moore A, Krummen LA, Mather JP. Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 100:81-86, 1994.

Nagata K, Yamamoto T, Chikumi H, Ikeda T, Yamamoto H, Hashimoto K, Yoneda K, Nanba E, Ninomiya H, Ishitobi K. A novel interstitial deletion of KAL1 in a Japanese family with Kallmann syndrome. *J Hum Genet* 45:237-240, 2000.

Naor Z, Capponi AM, Rossier MF, Ayalon D, Limor R. Gonadotropin-releasing hormone-induced rise in cytosolic free Ca^{2+} levels: mobilization of cellular and extracellular Ca^{2+} pools and the relationship to gonadotropin secretion. *Mol Endocrinol* 2:512-520, 1988.

Naor Z, Harris D, Shacham S. Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca^{2+} and protein kinase C. *Front Neuroendocrinol* 19:1-19, 1998.

Norgren RB, Lehman MN. Neurons that migrate from the olfactory epithelium in the chick express luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 128:1676-1678, 1991.

Ojeda SR, Ma YJ, Rago F. A role for TGF alpha in the neuroendocrine control of female puberty. In: Plant TM, Lee PA (eds). *The Neurobiology of Puberty*. Journal of Endocrinology Ltd, Bristol, U.K., p.p. 103-117, 1995.

Oliveira LMB, Seminara SB, Beranova M, Hayes FJ, Valkenburgh SB, Schipani E, Costa EMF, Latronico AC, Crowley WF Jr, Vallejo M. The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1532-1538, 2001.

O'Neill MJ, Tridjaja B, Smith MJ, Bell KM, Warne GL, Sinclair AH. Familial Kallmann syndrome: a novel splice acceptor mutation in the KAL gene. *Hum Mutat* 11:340-342, 1998.

Paige DG, Emilion GG, Bouloux PMG, Harper JI. A clinical and genetic study of X-linked recessive ichthyosis and contiguous gene defects. *Br J Dermatol* 131:622-629, 1994.

Parenti G, Rizzolo MG, Ghezzi M, Di Maio S, Sperandio MP, Incerti B, Franco B, Ballabio A, Andria G. Variable penetrance of hypogonadism in a sibship with Kallmann syndrome due to a deletion of the KAL gene. *Am J Med Genet* 57:476-478, 1995.

Pawlowitzki IH, Diekstall P, Schadel A, Miny P. Estimating frequency of Kallmann syndrome among hypogonadic and among anosmic patients. *Am J Med Genet* 26:473-479, 1987.

Pralong FP, Gómez F, Castillo E, Cotecchia S, Abuin L, Aubert ML, Portman L, Gaillard RC. Complete hypogonadotropic hypogonadism associated with a novel inactivating mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3811-3816, 1999.

Quinton R, Duke VM, de Zoysa PA, Platts AD, Valentine A, Kendall B, Pickman S, Kirk JMW, Besser M, Jacobs HS, Bouloux PMG. The neuroradiology of Kallmann's syndrome: a genotypic and phenotypic analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3010-3017, 1996.

Quinton R, Hasan W, Grant W, Thrasivoulou C, Quiney RE, Besser GM, Bouloux PM. Gonadotropin-releasing hormone immunoreactivity in the nasal epithelia of adults with Kallmann's syndrome and isolated hypogonadotropic hypogonadism and in the early midtrimester human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 82:309-314, 1997.

Quinton R, Cheow HK, Tymms DJ, Bouloux PMG, Wu FCW, Jacobs HS. Kallmann's syndrome: is it always for life? *Clin Endocrinol* 50:481-485, 1999.

Ramírez VD, Feder HH, Sawyer CH. The role of brain catecholamines in the regulation of LH secretion: a critical inquiry. In: Martini L, Ganong WF (eds). *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press, New York, 8:27-34, 1984.

- Rau H, Braun J, Donner H, Seissler J, Siegmund T, Usadel KH, Badenhop K. The codon 17 polymorphism of the CTLA4 gene in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 86:653-655, 2001.
- Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Rev* 15:725-742, 1994.
- Rivier C, Rivier J, Vale W. Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 234:205-208, 1986.
- Rosen SW, Gann P, Rogol AD. Congenital anosmia: detection thresholds for seven odorant classes in hypogonadal and eugonadal patients. *Ann Otol* 88:288-292, 1979.
- Rugarli EI, Ballabio A. Kallmann Syndrome. From Genetics to Neurobiology. *JAMA* 270:2713-2716, 1993.
- Rugarli EI, Lutz B, Kuratani SC, Wawersik S, Borsani G, Ballabio A, Eichele G. Expression pattern of the Kallmann syndrome gene in the olfactory system suggests a role in neuronal targeting. *Nat Genet* 4:19-25, 1993.
- Rugarli EI, Ghezzi C, Valsecchi V, Ballabio A. The Kallmann syndrome gene product expressed in COS cells is cleaved on the cell surface to yield a diffusible component. *Hum Mol Genet* 5:1109-1115, 1996.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds). *Molecular-cloning: A Laboratory Manual*. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. p.p. 14.7, 1989.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 74:5463-5467, 1977.
- Santen RJ, Bardin CW. Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis, clinical interpretation, physiologic mechanisms. *J Clin Invest* 52:2617-2628, 1973.
- Sawchenko PE, Plotsky PM, Pfeiffer SW, Cunningham ET, Vaughan J, Rivier J, Vale W. Inhibin beta in central neural pathways involved in the control of oxytocin secretion. *Nature* 334:615-627, 1988.
- Schally A, Arimura A, Baba Y, Nair RMG, Matsuo H, Redding TW, Debeljuk L. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43:393-399, 1971.
- Schwankhaus JD, Currie J, Jaffe MJ, Rose SR, Sherins RJ. Neurologic findings in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Neurology* 39:223-226, 1989.

Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Mol Brain Res* 6:311-319, 1989.

Sealfon SC, Weinstein H, Millar RP. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev* 18:180-205, 1997.

Seminara SB, Hayes FJ, Crowley WF Jr. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. *Endocr Rev* 19:521-539, 1998.

Seminara SB, Beranova M, Oliveira LMB, Martin KA, Crowley WF Jr, Hall JE. Successful use of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) for ovulation induction and pregnancy in a patient with GnRH receptor mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 85:556-562, 2000.

Shimasaki S, Koga M, Buscaglia ML, Simmons DM, Bicsak TA, Ling N. Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues. *Mol Endocrinol* 3:651-659, 1989.

Shivers BD, Harlan RD, Morrell JI, Pfaff DW. Absence of estradiol in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 304:345-347, 1983.

Snider P. Clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* 22: 163-175, 1993.

Snyder GD, Bleasdale JE. Effect of LHRH on incorporation of [32 P]-orthophosphate into phosphatidylinositol by dispersed anterior pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 28:55-63, 1982.

Soussi-Yanicostas N, Faivre-Sarrailh C, Hardelin JP, Levilliers J, Rougon G, Petit C. Anosmin-1 underlying the X chromosome-linked Kallmann syndrome is an adhesion molecule that can modulate neurite growth in a cell-type specific manner. *J Cell Sci* 111:2953-2965, 1998.

Spratt DI, O'Dea LS, Schoenfeld D, Butler J, Rao PN, Crowley WF. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH, and testosterone. *Am J Physiol* 254:E658-E666, 1988.

Stanislaus D, Janovick JA, Brothers S, Conn PM. Regulation of Gq/11alpha by gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 4:738-746, 1997.

Stetler G, Brewer MT, Thompson RC. Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases. *Nucleic Acids Res* 14:7883-7896, 1986.

Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18:213-215, 1998.

Sugino K, Kurosawa N, Nakamura T, Takio K, Shimasaki S, Ling N, Titani K, Sugino H. Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 268:15579-15587, 1993.

Sullivan KA, Silverman AJ. The ontogeny of gonadotropin-releasing hormone neurons in the chick. *Neuroendocrinology* 58:597-608, 1993.

Terasawa E. Control of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generation in nonhuman primates. *Cell Mol Neurobiol* 15:141-164, 1995.

Terasawa E, Fernández DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* 22:111-151, 2001.

Truwit CL, Barkovich AJ, Grumbach MM, Martini JJ. MR imaging of Kallmann syndrome, a genetic disorder of neuronal migration affecting the olfactory and genital systems. *ANJR Am J Neuroradiol* 14:827-838, 1993.

Tsatsoulis A, Shalet SM, Robertson WR. Bioactive gonadotrophin secretion in man. *Clin Endocrinol* 35:193-206, 1991.

Tsuge T, Shimokawa T, Horikoshi S, Tomino Y, Ra C. Polymorphism in promoter region of Fc alpha receptor gene in patients with IgA nephropathy. *Hum Genet* 108:128-133, 2001.

Tsutsumi M, Zhou W, Millar RP, Mellon PL, Roberts JL, Flanagan CA, Dong K, Gillo B, Sealfon SC. Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 6:1163-1169, 1992.

Turgeon JL, Waring DW. cAMP augmentation of secretagogue-induced luteinizing hormone secretion. *Am J Physiol* 250:E62-E68, 1986.

Turner RC, Bobrow LG, MacKinnon PCB, Bonnar J, Hockaday TD, Ellis JD. Cryptorchidism in a family with Kallmann's syndrome. *Proc R Soc Med* 67:33-35, 1974.

Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Díaz-Sánchez V, Altamirano A, Pérez-Palacios G. Self priming effect of LH/hCG upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Plasma testosterone profile. *J Clin Endocrinol Metab* 61:926-932, 1985.

Ulloa-Aguirre A, Midgley R, Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 16:765-787, 1995.

A novel homozygous mutation in the second transmembrane domain of the gonadotrophin releasing hormone receptor gene

D. Söderlund*, P. Canto*, E. de la Chesnaye*,
A. Ulloa-Aguirre†,‡ and J. P. Méndez*

*Research Unit in Developmental Biology, Hospital de
Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto
Mexicano del Seguro Social, †Department of
Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición
Salvador Zubirán, México, D.F., México

(Received 14 June 2000; returned for revision 20 July 2000;
finally revised 17 August 2000; accepted 7 November 2000)

Summary

BACKGROUND and OBJECTIVE Mutations in the GnRH receptor (GnRH-R) gene cause hypogonadotrophic hypogonadism. Here, we present the molecular studies of the GnRH-R gene in three families with isolated hypogonadotrophic hypogonadism.

PATIENTS Three unrelated families, with at least two members diagnosed with isolated hypogonadotrophic hypogonadism were included.

MEASUREMENTS DNA sequencing was performed after polymerase chain reaction amplification of each of the three exons of the gene.

RESULTS A novel homozygous missense mutation, at nucleotide 268, turning glutamic acid into lysine, located at the second transmembrane domain of the GnRH-R gene was found in two patients pertaining to one of the families studied. Both parents and an unaffected brother were heterozygous carriers of one mutant allele, an unaffected sister was homozygote wild type. In the other two affected families no mutations were found in the GnRH-R gene.

CONCLUSIONS This constitutes the first description of an spontaneous mutation located at the second

transmembrane domain (Glu90Lys) of the GnRH-R, indicating that the integrity of glutamic acid at this position is crucial for receptor function. Also this report, complementing others, demonstrates that mutations are distributed throughout the GnRH-R gene and that as in the only other homozygous mutation previously described, affected patients present a complete form of hypogonadotrophic hypogonadism. Due to the fact that apparently consanguinity was present in our affected family, we presume that the mutation derived from a common ancestor, by a founder gene effect.

Individuals affected with isolated hypogonadotrophic hypogonadism fail to achieve spontaneous pubertal development (Crowley *et al.*, 1985; Layman, 1991b). This heterogeneous disorder constitutes one of the most common causes of hereditary hypogonadism and can be transmitted as an autosomal dominant, an autosomal recessive or an X-linked disease, although sporadic forms also have been described (Sparkes *et al.*, 1968; White *et al.*, 1983; Chaussain *et al.*, 1988; Dean *et al.*, 1990). If associated with anosmia or hyposmia the condition is known as Kallman's syndrome and results, in less than 50% of the cases, from mutations in the *Kal-1* gene (Hardelin *et al.*, 1992; Georgopoulos *et al.*, 1997; Maya-Núñez *et al.*, 1998; Maya-Núñez *et al.*, 1999). This gene spans 210kb of genomic DNA in Xp22.3 and encodes a protein sharing homology with molecules involved in neuronal migration and axonal pathfinding (Franco *et al.*, 1991).

In order to elicit the cascade of events which lead to the development of normal puberty and reproductive function GnRH neurones must synthesize and secrete GnRH, in a pulsatile fashion, into the hypophysial portal blood. At the membranes of pituitary gonadotroph cells, GnRH interacts with its high affinity receptor (GnRH-R) (Conn & Crowley, 1994). The LH and FSH synthesized and released from pituitary gonadotrophs stimulate sex steroid hormone biosynthesis and secretion as well as gametogenesis (Yen, 1991). A number of other factors, such as growth factors, catecholamines, endorphins, DAX-1 gene product, etc. are also involved in normal reproductive function (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1988; Muscatelli *et al.*, 1994); disorders in any step

Correspondence: Dr J.P. Méndez, Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo, Coordinación de Investigación Médica, Avenida Cuauhtémoc 330, Apartado Postal 73-032, Colonia Doctores, C.P. 06725, D.F., México. Fax: +525 7610952; E-mail: jpmb@servidor.unam.mx

‡Present address: Research Unit in Reproductive Medicine, Hospital de Ginecología Luis Castelazo Ayala, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., México.

could result in hypogonadism (Layman, 1991a; Muscatelli et al., 1994).

The complementary DNA and the gene for the human GnRH-R were recently cloned (Kakar et al., 1992; Fan et al., 1994) showing that this receptor pertains to the family of G-protein coupled receptors, with seven transmembrane domains and that it activates phospholipase C leading to the intracellular increase in inositol phosphates as well as mobilization of intracellular calcium (Stojilkovic et al., 1994). The human GnRH-R gene is located on 4q13 and consists of three exons (Kakar, 1997).

As the response to exogenous GnRH is quite variable among patients with hypogonadotropic hypogonadism, it was postulated that in some cases a GnRH-R defect could be responsible for the existence of this disorder. To date, some mutations in this gene have been identified as a cause of familial isolated hypogonadotropic hypogonadism (de Roux et al., 1997; Layman et al., 1998; Caron et al., 1999; de Roux et al., 1999; Pralogn et al., 1999).

Here we present the molecular studies of the GnRH-R gene in three families with isolated hypogonadotropic hypogonadism. In one family, with two affected individuals, the disease was caused by a novel mutation of the GnRH-R gene, located at the second transmembrane domain, that was present in the homozygous state. In the other two families no mutation was found in the GnRH-R gene.

Subjects and methods

Subjects

Informed consent was obtained from all subjects participating in the study, which was approved by the institute's human research committee. All patients had a Mexican–mestizo ethnic origin.

Family 1. Consanguinity could not be confirmed but both parents were from the same location (a very small town 100 miles away from Mexico City); apparently, their great-grandparents were cousins. Both probands were referred to the hospital because of hypogonadism at ages of 21 (II-1) and 19 (II-2) (Fig. 1). They were products of uneventful pregnancies, being born with bilateral cryptorchidism which was surgically corrected in early infancy. Psychomotor development in both patients was considered normal. In both individuals height and weight were within the 25th and 50th percentiles for normal Mexican males (168 and 170 cm and 67.8 and 66.2 kg). They have one sister and one brother who had normal pubertal development.

On physical examination the most relevant findings were the following, *Subject II-1*: normal stature, absence of secondary sexual characteristics, no gynaecomastia, penile length was

3.7 cm and testicular volumes were 3.6 ml (right) and 2.5 ml (left). *Subject II-2*: normal stature, absence of secondary sexual characteristics, no gynaecomastia, penile length was 3.4 cm and testicular volumes were 1.5 ml (right) and 1.8 ml (left). Both patients had a normal sense of smell after performing the test described by Rosen et al. (1979). In both cases there were no abnormal eye movements, bimanual synkinesia or colour-blindness.

The basal serum LH and FSH concentrations (mean of four basal values) were, 0.3 IU/l and 0.2 IU/l (subject II-1) and 0.3 IU/l and 0.1 IU/l (subject II-2), below the normal adult male range (LH: 3–12 IU/l; FSH: 0.5–5.0 IU/l). After the intravenous administration of 100 µg of GnRH, serum LH and FSH were measured every 15 min for 2 h; both gonadotrophins failed to respond to the acute stimulus. Serum testosterone concentrations were in the prepubertal range (0.38 and 0.52 nmol/l); normal adult males: >10.5 nmol/l. Results for growth hormone, prolactin, thyroid hormones and cortisol were normal. Neither patient agreed to participate in an 8-h study for determining LH and FSH pulsatile secretion, nor approved semen analysis studies. The high resolution G-banded karyotype was 46,XY and computed axial tomography of the hypothalamic–pituitary region did not demonstrate any anomaly. There were no renal nor craniofacial abnormalities.

The 45-year-old mother (I-2) and the 17-year-old sister (II-4) had normal pubertal development and menstrual cycles, as well as serum gonadotrophin and estradiol concentrations. The 45-year-old father (I-1) and the 18-year-old normal brother (II-3) were completely virilized, had

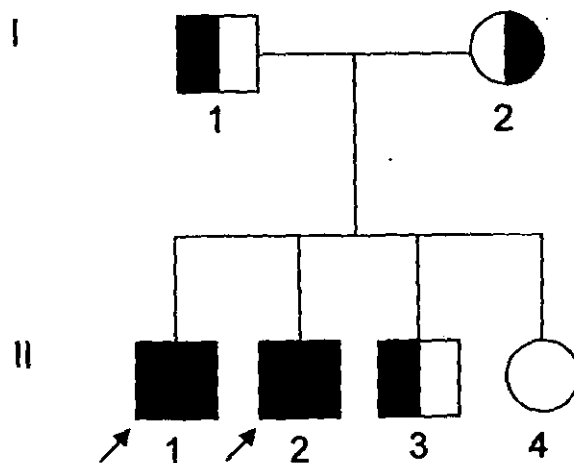


Fig. 1 Pedigree of the family with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to an homozygous point mutation in the GnRH-R gene.

normal potency and libido, as well as serum gonadotrophin and testosterone concentrations.

Family 2. Two hypogonadic male siblings were referred to the hospital in 1976 (18-years-old) and 1981 (21-years-old). In 1986, a 15-year-old sister with primary amenorrhoea also attended the hospital. Besides, four female and three male siblings had normal pubertal development. There was no known history of consanguinity.

On physical examination all three affected individuals presented infantile external genitalia; sense of smell was normal. Basal gonadotrophin concentrations (mean of four basal values) were, 1.1 IU/l, 0.8 IU/l and 1.3 IU/l for LH and 0.3 IU/l, 0.3 IU/l and 0.5 IU/l for FSH. Basal testosterone in both males was 3.20 nmol/l and 0.90 nmol/l, whereas basal oestradiol was not detectable in the female individual. Both gonadotrophins failed to respond to an exogenous GnRH acute stimulus. The high resolution G-banded karyotype was 46,XY in both males and 46,XX in the female; computed axial tomography of the hypothalamic–pituitary region did not demonstrate any anomaly.

Family 3. Both male probands were referred to the hospital because of hypogonadism at ages 19 and 17. They had a 21-year-old sister with primary amenorrhoea, and a 24-year-old paternal male cousin with hypogonadism; nor the sister, nor the cousin attended our hospital. Besides, two female and two male siblings had a normal pubertal development. There was no known history of consanguinity.

On physical examination both patients presented infantile external genitalia; sense of smell was normal. Basal gonadotrophin concentrations (mean of four basal values) were, 1.2 IU/l and 1.1 IU/l for LH and 0.4 IU/l and 0.2 IU/l for FSH. Testosterone concentrations were 0.67 nmol/l and 1.75 nmol/l. Both gonadotrophins failed to respond to an exogenous GnRH acute stimulus. The high resolution G-banded karyotype was 46,XY and computed axial tomography of the hypothalamic–pituitary region did not demonstrate any anomaly.

In male patients from the three families, administration of

exogenous testosterone induced penile enlargement and development of secondary sexual characteristics. The female patient received a combination of oestrogen and a synthetic progestagen, which led to development of secondary sexual characteristics and endometrial bleeding.

Methods

Serum levels of LH and FSH were measured as previously described (Méndez *et al.*, 1998). Concentrations of both gonadotrophins are expressed as international units per litre according to the Second International Reference Preparation of Human Menopausal Gonadotrophin.

Genomic DNA was prepared from peripheral blood leucocytes by standard techniques (Sambrook *et al.*, 1989). For each PCR amplification genomic DNA (0.5–1.0 µg) in the presence, 0.1 mmol/l dNTP, 2 U Taq DNA polymerase (AmpliTaq, Perkin Elmer Corp., Branchburg, NJ, USA) and 250 nmol/l of each specific set of GnRH receptor primers, was used. The sequences of the GnRH receptor primers, as well as the PCR conditions were followed according to Layman *et al.* (1997).

The PCR products of the three exons of the GnRH receptor gene were purified using the GeneClean II Kit (BIO-101, Vista, CA, USA). These products were then sequenced (10–15 ng DNA template/reaction) on an ABI 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) using the BigDye™ terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer). PCR conditions for cycle sequencing were identical to those described above. For all exons both strands were sequenced and compared. The mutation was confirmed in three independent PCR amplifications and sequencings in all individuals studied.

Results

Direct sequencing of the three exons of the GnRH-R gene in both probands of family #1, revealed that both patients exhibited a previously unidentified missense mutation, in an homozygous state, at nucleotide 268 consisting of a guanine

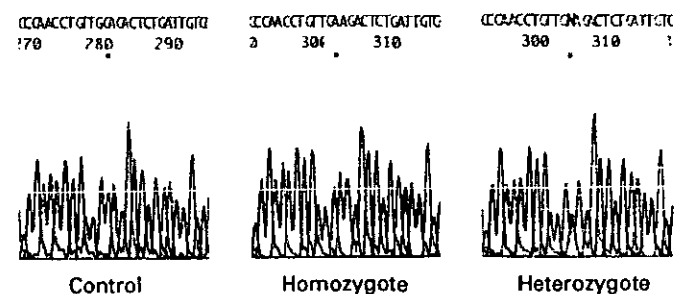


Fig. 2 Part of the sequence of the first exon of the GnRH-R gene. The homozygous point mutation (G to A substitution) at nucleotide 268 (*), presented by both probands, is depicted in the middle panel. In the right panel, both G and A can be observed at position 268 (*) demonstrating the heterozygous state presented by both parents and the unaffected brother. The change in the corresponding codon and amino acid is indicated at the right.

(G) to adenine (A) substitution at codon 90 (GAG to AAG), turning glutamic acid into lysine. This mutation is located at the second transmembrane domain (TM-2) of the GnRH receptor. Study on the family showed that the two parents and the unaffected brother were heterozygous carriers of one mutant allele. The unaffected sister was homozygote wild type (Fig. 2).

Direct sequencing of exons 1–3 of the GnRH-R gene from families 2 and 3 did not reveal any molecular abnormality (data not shown).

Fifty-normal individuals (100 alleles), classified as Tanner stage 5 and with proven fertility, did not harbour the mutation at nucleotide 268 being homozygous wild type.

Discussion

In recent years, five families presenting a mutation of the GnRH-R gene have been reported (de Roux *et al.*, 1997; Layman *et al.*, 1998; Caron *et al.*, 1999; de Roux *et al.*, 1999; Pralong *et al.*, 1999). De Roux *et al.* (1997), described one family with compound heterozygous inactivating mutations at codons 106 and 262 and another family where all affected members were compound heterozygotes carrying a mutation at codon 262 on one allele and two mutations at codons 106 and 217 on the other allele (de Roux *et al.*, 1999). Layman *et al.* (1998), studied a family with compound heterozygous mutations at codons 262 and 284. Caron *et al.* (1999), reported a family with compound heterozygote mutations at codons 129 and 262, while Pralong *et al.* (1999) described the only mutation that has been found in an homozygous state (codon 168). In this study, we report a novel homozygous mutation of the GnRH-R found in two brothers presenting a phenotype of complete form of hypogonadotropic hypogonadism. The parents and an unaffected brother were heterozygous carriers of one mutant allele.

Both mutated individuals described here, displayed complete hypogonadotropic hypogonadism. The severity of gonadotrophin deficiency was evidenced by the clinical characteristics, the very low levels of basal serum LH and FSH, as well as the absence of response of gonadotrophins to exogenous GnRH. The phenotypic spectrum of isolated hypogonadotropic hypogonadism in patients with compound heterozygote mutations in the GnRH-R is variable, ranging from partial hypogonadotropic deficiency with significant concentrations of gonadotrophins and gonadal steroids to complete hypogonadism (de Roux *et al.*, 1997; Layman *et al.*, 1998; Caron *et al.*, 1999; de Roux *et al.*, 1999). Indeed, a substantial variation in the degree of hypogonadotropic hypogonadism has been observed in patients pertaining to the same family and presenting the same compound heterozygote mutations of the GnRH-R gene (Caron *et al.*, 1999; de

Roux *et al.*, 1999). These phenotypic differences suggest that a variety of other factors influence the expression of the phenotype, besides that a sexual dimorphism in the tolerance of alterations in GnRH function has been previously suggested (de Roux *et al.*, 1999). In contrast, the homozygote patient described by Pralong *et al.* (1999), as well as our homozygous patients displayed a phenotype of complete GnRH deficiency as evidenced in both studies by the presence of microphallus, bilateral cryptorchidism, very low levels of gonadotrophins and consequently of testosterone, as well as absence of response to GnRH stimulation. As to whether an homozygous mutation will always induce complete hypogonadotropic hypogonadism can not be determined by two reports; further studies on more patients are required to address this issue. This study extends previous reports (de Roux *et al.*, 1997; Layman *et al.*, 1998; Caron *et al.*, 1999; de Roux *et al.*, 1999; Pralong *et al.*, 1999) that like other receptors of the same family (LH, FSH and TSH), the GnRH-R can be affected by a variety of inactivating mutations inducing partial to total loss of function (Aittomäki *et al.*, 1995; de Roux *et al.*, 1996; Latronico *et al.*, 1996).

An additional finding of our study is that [as also described in the report by Pralong *et al.* (1999)] the mutation induced hypogonadotropic hypogonadism only when present in the homozygous state, due to the fact that it was silent in the heterozygous state, therefore being inherited in an autosomal recessive manner. Taking into consideration that the mutant allele might be present in normal patients, we screened 50 individuals not detecting any other mutant allele, indicating a gene frequency of less than 1%.

The Glu90Lys mutation is located in the second transmembrane domain of the GnRH receptor, constituting the first spontaneous mutation reported in this domain. In previous studies, mutations have been described in the first and third intracellular loops, as well as in the third, fourth and sixth transmembrane domains (de Roux *et al.*, 1997; Layman *et al.*, 1998; Caron *et al.*, 1999; de Roux *et al.*, 1999; Pralong *et al.*, 1999). We assume that the Glu90Lys mutation affected GnRH-R function considering that in the mammalian GnRH-R, the TM-2-located Asn87 (which is substituted by a highly conserved Asp in the majority of all other G-protein-coupled receptors belonging to the rhodopsin/ β -adrenergic family), pairs with Asp318 (Asn in other receptors) in TM-7, forming a structural and functional helix-2/helix-7 microdomain that has been recently implicated in receptor expression, as well as in receptor activation and interaction with heterotrimeric and small G proteins (Zhou *et al.*, 1994; Seafon *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 1998; Ulloa-Aguirre & Conn, 1998; Flanagan *et al.*, 1999) (Table 1). It is worth noting that Glu90 is totally conserved in all mammalian GnRH receptors that have been cloned (Zhou *et al.*, 1994).

Table 1 Alignment of the human GnRH-R sequences with other human G-protein coupled receptors, demonstrating the conserved TM-2-located Asn 87 (substituted by a highly conserved Asp in other G-protein coupled receptors) and the conserved TM-7-located Asp 318 (Asn in other receptors). Amino acids 87 and 318 are depicted in bold type.

Receptor name		TM2			TM7	
		87			318	
Gonadotrophin releasing hormone-R	HLTLA	N	LLETL	LNPCF	D	PLIYG
Luteinizing hormone-R	NLSFA	D	FCMGL	LFYPI	N	SCANP
Follicle stimulating hormone-R	NLAFA	D	LCIGI	LFHPI	N	SCANP
Thyrotrophin-R	NLAFA	D	FCMGM	LFYPL	N	SCANP
Neurotensin-R	SLALS	D	LLTLL	VSSTI	N	PILYN
Cholecystokinin-R	SLAVS	D	LLAV	ASACV	N	PLVYC
5-Hydroxytryptamine-R	SLAIA	D	MLVGL	VCSGI	N	PLVYT

We identified a mutation of the GnRH-R in only one out of three families (33%) with isolated hypogonadotropic hypogonadism. The true prevalence of such mutations is difficult to assess because of the rarity of this entity. Layman *et al.* (1998), found a causative mutation in only one out of 46 patients studied presenting this entity and in one out of 14 (7.1%) when only families with affected females were included. Larger samples of patients will need to be studied in order to determine the true prevalence of these mutations in humans. The absence of mutations in families 2 and 3 indicates that molecular defects in such families could be present in the untranslated regulatory regions of the GnRH-R gene or within introns; besides, defects in other gene(s) could explain the disorder. Due to the fact that apparently consanguinity was present in our affected family, we presume that the mutation derived from a common ancestor, by a founder gene effect.

In conclusion, this constitutes the first description of an spontaneous mutation located at the second transmembrane domain (Glu90Lys) of the GnRH-R indicating that the integrity of glutamic acid at this position is crucial for receptor function. Also this report, complementing others, demonstrates that mutations are distributed throughout the GnRH receptor gene.

Acknowledgements

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México; Grants: G29790M and 212226-5-G0016M and by the Coordinación de Investigación Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social, México Grant: FP0038/788.

We thank Hilda Valdez and Leonor Enciso from the Unidad de Instrumentos, Coordinación de Investigación Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social, for their technical assistance.

Daniela Söderlund is a postgraduate student from the

Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

References

- Aittomäki, K., Dieguez Lucena, J.L., Pakarinen, P., Sistonen, P., Tapanainen, J., Gromoll, J., Kaskikari, R., Sankila, E.M., Lehtväsläho, H., Engel, A.R., Nieschlag, E., Huhtaniemi, I. & de la Chapelle, A. (1995) Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, **82**, 959–968.
- Caron, P., Chauvin, S., Christin-Maitre, S., Bennet, A., Lahlou, N., Counis, R., Bouchard, P. & Kottler, M.L. (1999) Resistance of hypogonadic patients with mutated GnRH receptor genes to pulsatile GnRH administration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**, 990–996.
- Chaussain, J.L., Toublanc, J.E., Feingold, J., Naud, C., Vassal, J. & Job, J.C. (1988) Mode of inheritance in familial cases of primary gonadotropic deficiency. *Hormone Research*, **29**, 202–206.
- Conn, P.M. & Crowley, W.F. Jr (1994) Gonadotropin-releasing hormone, and its analogues. *New England Journal of Medicine*, **324**, 93–103.
- Crowley, W.F., Jr M Filicori, Spratt, D.I. & Santoro, N.F. (1985) The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. *Recent Progress in Hormone Research*, **41**, 473–531.
- Dean, J.C.S., Johnston, A.W. & Klopper, A.I. (1990) Isolated hypogonadotropic hypogonadism: a family with autosomal dominant inheritance. *Clinical Endocrinology*, **32**, 341–347.
- Fan, N.C., Jeung, E.B., Peng, C., Olofsson, J.L., Krisinger, J. & Leung, P.C. (1994) The human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene: cloning, genomic organization and chromosomal assignment. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **103**, R1–R6.
- Flanagan, C.A., Zhou, W., Chi, L., Yuen, T., Rodic, V., Robertson, D., Johnson, M., Holland, P., Millar, R.P., Weinstein, H., Mitchell, R. & Sealson, S.C. (1999) The functional microdomain in transmembrane helices 2 and 7 regulates expression, activation, and coupling pathways of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 28880–28886.
- Franco, B., Guioli, S., Pragliola, A., Incerti, B., Bardoni, B., Tonlorenzi, R., Carrozo, R., Maestrini, E., Pieretti, M., Taillon-Miller, P., Brown, C.J., Willard, H.F., Lawrence, C., Persico, M.G.,

- Camerino, G. & Ballabio, A. (1991) A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path finding molecules. *Nature*, **353**, 529–536.
- Georgopoulos, N.A., Pralong, F.P., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Crowley, W.F. Jr & Vallejo, M. (1997) Genetic heterogeneity evidenced by low incidence of KAL-1 gene mutations in sporadic cases of gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **82**, 213–217.
- Hardelin, J.P., Leveilliers, J., del Castillo, I., Cohen-Salmon, M., Legouis, R., Blanchard, S., Compain, S., Bouloux, P., Kirk, J., Moraine, C., Chaussain, J.L., Weissenbach, J. & Petit, C. (1992) X-chromosome-linked Kallmann syndrome: stop mutations validate the candidate gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 8190–8194.
- Kakar, S.S. (1997) Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *European Journal of Endocrinology*, **137**, 183–192.
- Kakar, S.S., Musgrove, L.C., Devor, D.C., Sellers, J.C. & Neill, J.D. (1992) Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **189**, 289–295.
- Latronico, A.C., Anasti, J., Arnold, I.J., Rapaport, R., Mendonca, B.B., Bloise, W., Castro, M., Tsigos, C. & Chrousos, G.P. (1996) Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *New England Journal of Medicine*, **334**, 507–512.
- Layman, L.C. (1991a) Genetics of gonadotropin genes and the GnRH/GAP gene. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, **9**, 22–33.
- Layman, L.C. (1991b) Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: diagnosis, pathogenesis, genetics, and treatment. *Adolescent and Pediatric Gynecology*, **4**, 111–118.
- Layman, L.C., Cohen, D.P., Jin, M., Xie, J., Li, Z., Reindollar, R.H., Bolbolan, S., Bick, D.P., Sherins, R.R., Duck, L.W., Musgrove, L.C., Sellers, J.C. & Neill, J.D. (1998) Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nature Genetics*, **18**, 14–15.
- Layman, L.C., Peak, D.B., Xie, J., Sohn, S.H., Reindollar, R.H. & Gray, M.R. (1997) Mutation analysis of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Fertility and Sterility*, **68**, 1079–1085.
- Maya-Núñez, G., Torres, L., Ulloa-Aguirre, A., Zenteno, J.C., Cuevas-Covarrubias, S., Saavedra-Ontiveros, D., Kofman-Alfaro, S. & Méndez, J.P. (1999) An atypical contiguous gene syndrome: molecular studies in a family with X-linked Kallmann syndrome and X-linked ichthyosis. *Clinical Endocrinology*, **50**, 157–162.
- Maya-Núñez, G., Zenteno, J.C., Ulloa-Aguirre, A., Kofman-Alfaro, S. & Méndez, J.P. (1998) A recurrent missense mutation in the KAL gene in patients with X-linked Kallmann's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**, 1650–1653.
- Méndez, J.P., Schiavon, R., Díaz-Cueto, L., Ruiz, A.I., Canto, P., Söderlund, D., Díaz-Sánchez, V. & Ulloa-Aguirre, A. (1998) A reliable endocrine test with human menopausal gonadotropins (hMG) for the diagnosis of true hermaphroditism in early infancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**, 3523–3526.
- Mitchell, R., McCulloch, D., Lutz, E., Johnson, M., MacKenzie, C., Fennell, M., Fink, G., Zhou, W. & Sealfon, S.C. (1998) Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature*, **392**, 411–414.
- Muscatelli, F., Strom, T.M., Walker, A.P., Zanaria, E., Récan, D., Meindl, A., Bardoni, B., Guioli, S., Zehetner, G., Rabl, W., Schwarz, H.P., Kaplan, J.C., Camerino, G., Meitinger, T. & Monaco, A.P. (1994) Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature*, **372**, 672–676.
- Pralong, F.P., Gómez, F., Castillo, E., Cotecchia, S., Abuin, L., Aubert, M.L., Portmann, L. & Gaillard, R.C. (1999) Complete hypogonadotropic hypogonadism associated with a novel inactivating mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**, 3811–3816.
- Rosen, S.W., Gahn, P.K. & Rogol, A.D. (1979) Congenital anosmia: detection thresholds for seven odorant classes in hypogonadal and eugonadal patients. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, **88**, 288–292.
- de Roux, N., Misrahi, M., Brauner, R., Houang, M., Carel, J.C., Granier, M., Le Bouc, Y., Ghinea, N., Boumedienne, A., Toublanc, J.E. & Milgrom, E. (1996) Four families with loss of function mutations of the thyrotropin receptor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **81**, 4229–4235.
- de Roux, N., Young, J., Brailly-Tabard, S., Misrahi, M., Milgrom, E. & Schaison, G. (1999) The same molecular defects of the gonadotropin-releasing hormone receptor determine a variable degree of hypogonadism in affected kindred. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**, 567–572.
- de Roux, N., Young, J., Misrahi, M., Genet, R., Chanson, P., Schaison, G. & Milgrom, E. (1997) A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *New England Journal of Medicine*, **337**, 1597–1602.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Isolation of high-molecular weight DNA from mammalian cells. In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (ed. C. Nolan), pp. 9.16–9.23. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sealfon, S.C., Weinstein, H. & Millar, R.P. (1997) Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrine Reviews*, **18**, 180–205.
- Sparkes, R.S., Simpson, R.W. & Paulsen, C.A. (1968) Familial hypogonadotropic hypogonadism with anosmia. *Archives of Internal Medicine*, **121**, 534–538.
- Stojilkovic, S.S., Reinhart, J. & Catt, K.J. (1994) Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocrine Reviews*, **15**, 462–499.
- Ulloa-Aguirre, A. & Conn, P.M. (1998) G protein-coupled receptors and the G protein family. In: *Handbook of Physiology-Endocrinology* (ed. P.M. Conn), pp. 87–124. Section 7, Cellular Endocrinology. Oxford University Press, New York.
- Ulloa-Aguirre, A., Méndez, J.P., González-Castillo, A., Carranza-Lira, S., Garza-Flores, J. & Pérez-Palacios, G. (1988) Changes in the responsiveness of luteinizing hormone secretion to infusion of the opioid antagonist naloxone throughout male sexual maturation. *Clinical Endocrinology*, **29**, 17–28.
- White, B.J., Rogol, A.D., Brown, K.S., Lieblisch, J.M. & Rosen, S.W. (1983) The syndrome of anosmia with hypogonadotropic hypogonadism: a genetic study of 18 new families and a review. *American Journal of Medical Genetics*, **15**, 417–435.
- Yen, S.S.C. (1991) The hypothalamic control of pituitary hormone secretion. In: *Reproductive Endocrinology* (eds S.S.C. Yen, R.B. Jaffe, 3rd edition), pp. 65–104. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Zhou, W., Flanagan, C., Ballesteros, J.A., Konvicka, K., Davidson, J.S., Weinstein, H., Millar, R.P. & Sealfon, S.C. (1994) A reciprocal mutation supports helix 2 and helix 7 proximity in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Molecular Pharmacology*, **45**, 165–170.