Πανεπιστήμιο Πατρών
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Ιατρικής
Παθολογική Κλινική-Ενδοκρινολογικό Τμήμα

Ανίχνευση μεταλλάξεων
στο γονίδιο KAL,
στο γονίδιο της GnRH,
στο γονίδιο του υποκινητή της GnRH
και στο γονίδιο του υποδοχέα της GnRH
σε ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH

Γεώργιος Α. Βαγενάκης
Ιατρός

Διδακτορική Διατριβή
Πάτρα 2005

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Φωτεινή Παληογιάννη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Βενετσάνα Κυριαζοπούλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας

Αθανάσιος Παπαβασιλείου

Καθηγητής Βιοχημείας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Φωτεινή Παληογιάννη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Βενετσάνα Κυριαζοπούλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας

Αθανάσιος Παπαβασιλείου

Καθηγητής Βιοχημείας

Γεώργιος Δημητρακόπουλος

Καθηγητής Μικροβιολογίας

Χαράλαμπος Γώγος

Καθηγητής Παθολογίας

Νεοκλής Γεωργόπουλος

Λέκτορας Ενδοκρινολογίας Αναπαραγωγής Μ/Γ

Ιωάννης Χαμπαίος

Λέκτορας Παθολογίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Φωτεινή Παληογιάννη, τον Καθηγητή Βιοχημείας του Ιατρικού Τμήματος κ. Αθανάσιο Παπαβασιλείου και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας κ.Βενετσάνα Κυριαζοπούλου για την εκπόνηση του Διδακτορικού αυτού, και τη συνεχή τους συμπαράσταση. Τον υπεύθυνο εργαστηρίου του προγράμματος Λέκτορα της Αναπαραγωγικής Ενδοκρινολογίας κ. Νεοκλή Γεωργόπουλο ο οποίος στάθηκε δίπλα μου σαν δάσκαλος και φίλος με αμέριστη αγάπη και υπομονή σε όλη την διάρκεια του διδακτορικού και όχι μόνο. Την καθηγήτρια Βιολογίας της Ιατρικής κ. Αγλαία Αθανασιάδου για τη παροχή φιλοξενίας και υποστήριξης στο εργαστήριο του Τμήματος Βιολογίας. Την Δρ. Βιολογίας κ. Αργυρώ Σγουρού για την πολυτιμότερη βοήθεια της στο εργαστήριο, την αγάπη, την φιλία της και την συμπαράστασή της. Την Βιολόγο κ. Βίκυ Κόικα για την πολύτιμη βοήθειά της στο εργαστήριο. Την Λέκτορα Βιολογίας της Ιατρικής κ. Αδαμαντία Παπαχατζοπούλου για τις πολύτιμες συμβουλές της και την βοήθειά της στο εργαστήριο. Τον Δρ. Βιοχημείας κ. Πάνο Ζήρο και την Δρ. Βιοχημείας κ. Πάολα Κοκκόρη-Rochas και τον Λέκτορα

Παθολογίας κ. Ιωάννη Χαμπαίο για την αγάπη και την βοήθεια τους στις δύσκολες ώρες του εργαστηρίου. Την βιοχημικό κ. Μαρία Μακρή για την βοήθειά της στον προσδιορισμό των ορμονών, και τον ψυχίατρο κ. Θωμά Υφαντή για την βοήθεια του στην ψυχιατρική εκτίμηση των ασθενών.

Ιδιαίτερως ευχαριστώ τόσο τον Καθηγητή Βιοχημείας του Ιατρικού Τμήματος κ. Αθανάσιο Παπαβασιλείου στο εργαστήριο του οποίου συντελέστηκε το μεγαλύτερο τμήμα της παρούσης μελέτης και ο οποίος καθοδήγησε αποφασιστικά τα βήματα της εργαστηριακής διερεύνησης, την ομάδα μελέτης της ανεπάρκειας GnRH κ. Μαρία Αλεβιζάκη, κ. Αικατερίνη Δάκου-Βουτετάκη, κ. Ασημίνα Γαλλή, κ. Γεώργιο Κουκούλη, κ. Δημήτριο Πανίδα, κ. Ιωάννη Παπαδήμα, κ. Αγαθοκλή Τσατσούλη, κ. Βασιλική Σπηλιώτη για την παραχώρηση των περιστατικών τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Παθολογίας κ. Απόστολο Βαγενάκη στο Τμήμα του οποίου εκπονήθηκε η παρούσα μελέτη, τόσο για τις σημαντικές παρεμβάσεις του στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων όσο και για το παράδειγμα ιατρού και ερευνητού το οποίο μου ενέπνευσε.

Η διατριβή αυτή χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα Καραθεοδωρή

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ		ΣΕΛΙΔΕΣ
ΠΕΡΙΛΗΨΗ/SUMMARY		9-13
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
Ανεπάρκεια GnRH	Ορισμός	14-15
	Ιστορική αναδρομή	15-19
	Κλινική εικόνα	19-22
	Διάγνωση	22
Σύνδρομο Kallmann		
	Παθογένεια	23-26
	Κληρονομικότητα	26-27
	Το γονίδιο KAL	27-30
	Η πρωτεΐνη KAL	30-33
	Μεταλλάξεις στο KAL	33-35
	Άλλα ενεχόμενα γονίδια	35
Ιδιοπαθής Υπογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός		
	Κληρονομικότητα	36
	Το γονίδιο της GnRH	37-39
	Το γονίδιο του υποδοχέα της GnRH	39-40
	Ο πρωτεϊνικός υποδοχέας της GnRH	40-45
	Μεταλλάξεις στον υποδοχέα της GnRH	45-47
	Άλλα ενεχόμενα γονίδια	47

Θεραπεία		48
	Πρόκλησης εφηβείας	48-50
	Υπογοναδισμού	50-52
	Υπογονιμότητας	52-59
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
Σκοπός της μελέτης		61-62
Ασθενείς και μέθοδοι		
	Ασθενείς	63-64
	Μέθοδοι προσδιορισμού γονιδιώματος	65-73
	Ορμονικοί προσδιορισμοί	74
	Χαρακτηριστικά προσωπικότητας	75-79
Αποτελέσματα		80-84
Συζήτηση		84-88
Βιβλιογραφία		89-104
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ		
Πίνακες		104-114
Εικόνες		115-135

Περίληψη

Το σύνδρομο ανεπάρκειας της GnRH περιλαμβάνει ετερογενή, αλλά συναφή προς το κλινικό φαινότυπο πληθυσμό ασθενών οι οποίοι παρουσιάζουν πλήρη ή μερική απώλεια της ικανότητας του οργανισμού τους να προάγει την κατά ώσεις έκκριση της GnRH. Η ανεπάρκεια αυτή οδηγεί στην πλήρη ή μερική αναστολή της σεξουαλικής ωρίμανσης και σε στειρότητα του ασθενούς. Η παρουσία συνοδού ανοσμίας αναφέρεται ως σύνδρομο Kallmann, ενώ η απουσία άλλων συνοδών ανωμαλιών ως ιδιοπαθής υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός (IYY).

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση ύπαρξης μεταλλάξεων στα γονίδια KAL, της GnRH, του υποκινητή της GnRH, του υποδοχέα της GnRH, και του υποκινητή του υποδοχέα της GnRH, σε ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH, με στόχο την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη συχνότητα των διαφόρων μορφών μετάδοσης της νόσου στον ελληνικό χώρο, καθώς και η συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου των ασθενών και ειδικών κλινικών φαινοτύπων.

Μελετήθηκαν συνολικά τριάντα οκτώ (38) ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH, δώδεκα (12) ασθενείς με σύνδρομο Kallmann και είκοσι έξι (26) ασθενείς (13 άνδρες και 13 γυναίκες) με ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό (IYY). Η μεθοδολογία της εργαστηριακής έρευνας περιέλαβε απομόνωση DNA γονιδιώματος από τους ασθενείς εκλεκτικό πολλαπλασιασμό της κωδικοποίησης με την μέθοδο PCR και τέλος προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA στα προϊόντα της PCR.

Στους ασθενείς με σύνδρομο Kallmann δεν ανευρέθη αλλαγή βάσεων του γονιδίου KAL. Επίσης, στους ασθενείς με ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό

υπογοναδισμό δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στους υποκινητές των γονιδίων της GnRH και του υποδοχέα της.

Σε πέντε ασθενείς με ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό που αφορούσαν σποραδικές περιπτώσεις, εντοπίστηκε η μετάλλαξη (g→c στο κωδικόνιο 16 Trp16Ser) στο γονίδιο της GnRH η οποία αποτελεί φυσικό πολυμορφισμό. Στο γονίδιο του υποδοχέα της GnRH εντοπίστηκαν δύο μεταλλάξεις. Η μετάλλαξη (c→t στο κωδικόνιο 146), ανιχνεύτηκε σε δύο ασθενείς με οικογενή κληρονομικότητα. Η μετάλλαξη αυτή προκαλεί αλλαγή του αμινοξέως στη θέση 146 της πρωτεΐνης από προλίνη σε σερίνη την οποία φέρουν και οι δύο ασθενείς σε ετεροζυγωτία.

Στους δύο ασθενείς με IYY και τη μετάλλαξη Pro146Ser, καθώς και σε ένα άνδρα με IYY και φυσιολογική αλληλουχία του υποδοχέα της GnRH παρατηρήθηκε αντίσταση στη δράση της GnRH. Ασθενείς με IYY και αντίσταση στη δράση της GnRH αποτελούν φυσικά πρότυπα για τη μελέτη και τον εντοπισμό των πολλαπλών γονοτυπικών συνδυασμών οι οποίοι έχουν ως κατάληξη την εμφάνιση του συγκεκριμένου φαινοτύπου. Ο μη εντοπισμός νοσογόνων μεταλλάξεων ομοζυγωτίας ή διπλής ετεροζυγωτίας στους συγκεκριμένους ασθενείς συνηγορεί στην ύπαρξη διαταραχών στην έκφραση γονιδίων τα οποία επηρεάζουν ή την ενδοκυττάρια μετάδοση του μηνύματος ή την ίδια την έκφραση του υποδοχέα της GnRH.

Αν και το γονίδιο KAL έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη ψυχοπαθολογικών εκδηλώσεων, με κύριο εκπρόσωπο τη σχιζοφρένεια, οι εκδηλώσεις από τη ψυχική σφαίρα ασθενών με σύνδρομο Kallmann δεν έχουν μελετηθεί. Επιπλέον σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να περιγράψει αυτές τις διαταραχές και να τις συσχετίσει με το γονότυπο των ασθενών. Ένας εκ των

ασθενών με σύνδρομο Kallmann παρουσίαζε και σχιζοφρένεια χωρίς όμως να αναδειχθούν μεταλλάξεις στο γονιδίωμά του. Ενώ παράλληλα οι ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH δεν διαφέρουν σημαντικά στις κλίμακες ψυχοπαθολογίας ούτε από τις μέσες τιμές φυσιολογικού πληθυσμού, ούτε από τις τιμές που έδωσε η ομάδα ελέγχου με χρόνιες σωματικές παθήσεις, δίνουν σημαντικά χαμηλότερες τιμές σε όλες τις κλίμακες ψυχοπαθολογίας από ότι οι ψυχιατρικά ασθενείς, εκτός από την υποκλίμακα του «θυμού».

Summary

The syndrome of GnRH insufficiency is due to a functional deficit of GnRH production or secretion in the hypothalamus resulting in the loss of pulsatile secretion of GnRH. This deficiency leads to a complete or partial arrest of sexual maturation and infertility. Patients with no further anomalies are referred as having Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism (IHH) and when accompanied with anosmia, it is called Kallmann syndrome.

The aim of this study was to identify mutations in the KAL gene, the GnRH gene, the GnRH receptor gene and their promoters in patients with GnRH insufficiency, the prevalence in the Greek population and the relevance between the genotype and individual phenotype of these patients.

The study included thirty eight (38) patients with GnRH insufficiency, twelve patients (12) with Kallmann syndrome and twenty six patients with IHH (13 male and 13 female). Detection was carried out by isolation of genomic DNA from whole blood, which was used as a template for PCR amplification and finally, cycle sequencing analysis of all exons spanning the entire coding regions of the genes.

No mutations were found in the KAL gene, whereas in patients with IHH, no mutations were identified in transcription factor binding sites of the promoters of the GnRH and GnRH receptor gene.

In the GnRH gene of five (5) patients with IHH a natural polymorphism was identified in codon 16 (g→c Trp16Ser). In the GnRH receptor gene a novel mutation was found in codon 146, resulting in substitution of proline with serine identified in two sisters harboring this mutation in heterozygosity.

The two sisters and a male patient with IHH with normal gene sequencing were found to be resistant to GnRH action. Resistance to GnRH is particularly rare among IHH patients. One might hypothesize, that these patients ought to have inactivating mutations in their receptor gene. However such a defect was not found, therefore making these patients an ideal clinical phenotype of an aberration in signal transduction pathway or in transcriptional factors which regulate the expression of the GnRH receptor.

A common pathogenesis for KS and schizophrenia had been proposed, based on shared pathologies of these two disorders. The gene for the X-linked form of KS (known as KAL) has been implicated in the genetic pathogenesis of schizophrenias, although no such clinical associations have ever been reported. An additional aim of this study was to identify any psychopathologies in these patients. One of our patients with KS also developed schizophrenia but no mutations were identified in all 14 exons of the KAL gene.

ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΤΗΣ GnRH

Ορισμός

Το σύνδρομο ανεπάρκειας της GnRH περιλαμβάνει έναν ετερογενή, αλλά συναφή ως προς το κλινικό φαινότυπο, πληθυσμό ασθενών οι οποίοι παρουσιάζουν πλήρη ή μερική απώλεια της ικανότητας του οργανισμού να προάγει την κατά ώσεις έκκριση της GnRH.

Ο υπογοναδισμός ο προκαλούμενος από μεμονωμένη έκπτωση των υποφυσιακών γοναδοτροφινών οφείλεται σε λειτουργική αδυναμία έκκρισης της GnRH στον υποθάλαμο. Η κύρια δράση της γοναδορελίνης (GnRH) είναι η διέγερση, η σύνθεση και η απελευθέρωση των γοναδοτροφινών (LH και FSH) από τα γοναδοτρόφα κύτταρα του προσθίου λοβού της υπόφυσης.

Οι γοναδοτροφίνες, θυλακιοτρόπος (Follicle Stimulating Hormone: FSH) και ωχρινοποιητική (Luteinizing Hormone: LH), είναι γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες που εκκρίνονται από την αδενοϋπόφυση και ρυθμίζουν την ορμονοεκκριτική και αναπαραγωγική λειτουργία των γονάδων (όρχις-ωοθήκη). Τα γοναδοτρόφα υποφυσιακά κύτταρα διεγείρονται από την εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροφινών (Gonadotropin Releasing Hormone: GnRH), ένα δεκαπεπτίδιο που συντίθεται σε πυρήνες του πρόσθιου και μέσου υποθαλάμου - κυρίως στην προοπτική περιοχή και στον τοξοειδή πυρήνα-εκκρίνεται κατά ώσεις και κατέχει κεντρική θέση στη λειτουργία του ενδοκρινικού άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες (εικόνα 1). Η δραστική διέγερση των γοναδοτρόφων κυττάρων επιτυγχάνεται χάρις στην κατά ώσεις

έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο. Είναι η συχνότητα και το εύρος των ώσεων της GnRH αυτή που εξασφαλίζει τη λειτουργικότητα του άξονα.

Οποιαδήποτε διαταραχή της λειτουργικότητας του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης οδηγεί σε αδυναμία ενήβωσης, υπογοναδισμό και υπογονιμότητα.

Η διαταραχή αυτή μπορεί να είναι είτε πρωτοπαθής και οδηγεί σε πλήρη έκπτωση της έκκρισης της GnRH, είτε λειτουργική με αποτέλεσμα ελαττωματική έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο και συνακόλουθη διαταραχή της υποφυσιακής έκκρισης των γοναδοτροφινών. Κατ'επέκταση, το εύρος της κλινικής εικόνας καθορίζεται από τη βαρύτητα της υποθαλαμικής διαταραχής. Η παρουσία συνοδού ανοσμίας αναφέρεται ως **σύνδρομο Kallmann**, ενώ η απουσία άλλων συνοδών ανωμαλιών ως **ιδιοπαθής υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός (IYY)**. Και οι δύο οντότητες φαίνεται ότι αποτελούν επικαλυπτόμενες κλινικές εκφάνσεις της ανεπάρκειας GnRH και όχι ξεχωριστές οντότητες.

Ιστορική αναδρομή

Το 1856 ο Ισπανός ανατόμος Maestre de san Juan, παρουσίασε την πρώτη περιγραφή του συνδρόμου μετά από αυτοψία την οποία διενήργησε σε 40χρονο άρρενα (1). Τα ευρήματά του ήταν η απουσία οσφρητικών λοβών, μικροφαλία, μικρορχία, και απουσία αδρεναρχής με έλλειψη τρίχωσης στο εφηβαίο και τις μασχάλες. Λίγα χρόνια αργότερα ο Αυστριακός παθολογοανατόμος Richard Ladislaus Heschl (1824-1881) παρουσίασε σε Αυστριακό ιατρικό περιοδικό ένα 45χρονο άρρενα με απουσία οσφρητικών λοβών, υποπλαστικά γεννητικά όργανα και παύση της αδρεναρχής.

Το 1914 ο Franz Weidenreich μετά από νεκροψία 10 ασθενών με ανοσμία, τρεις από τους οποίους είχαν συνοδό υπογοναδισμό, πρότεινε για πρώτη φορά τη πιθανότητα αιτιολογικής σύνδεσης της ανοσμίας και του υπογοναδισμού (2).

Μετά από σαράντα χρόνια ο Kallmann και οι συνεργάτες του περιέγραψαν τρεις οικογένειες με διάφορες κλινικές εκφάνσεις της νόσου, από τη μερική μέχρι τη πλήρη μορφή (ανοσμία, δαλτονισμός, καθυστέρηση ήβης) ενώ μερικά μέλη παρουσίαζαν και διανοητική καθυστέρηση (3). Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν τον Kallmann στο συμπέρασμα ότι η αιτιολογία του συνδρόμου είναι γενετική και ότι η νόσος κληρονομείται κυρίως με το φυλοσύνδετο τρόπο μετάδοσης. Η αναγνώριση της γενετικής αιτιοπαθογένειας του συνδρόμου από τον Kallmann ήταν και η αιτία που το σύνδρομο φέρει έκτοτε το όνομά του. Η μελέτη νέων περιστατικών κατέδειξε ότι η νόσος μεταδίδεται τόσο με τον φυλοσύνδετο όσο και με το σωματικό επικρατούντα και υπολειπόμενο χαρακτήρα, ενώ η πλειοψηφία των

περιστατικών είναι σποραδικά. Ο τρόπος μετάδοσης της νόσου υποδεικνύει την ύπαρξη πολλών γονιδίων τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση της ενδογενούς παραγωγής της GnRH.

Το 1954 ο Ελβετός ανατόμος De Morsier, μελέτησε λεπτομερώς το σύνδρομο και μαζί με τον Gauthier περιέγραψαν για πρώτη φορά διεξοδικά την απουσία ή την υποπλασία των οσφρητικών βολβών και οδών σε άρρενες με πρωτοπαθή υπογοναδισμό (4,5,6). Στο μελετηθέν νεκροτομικό υλικό παρατηρήθηκαν και υποπλαστικές ή δυσπλαστικές περιοχές στον υποθάλαμο, ευρήματα τα οποία επιβεβαιώθηκαν πολύ αργότερα με την απεικονιστική τεχνική του μαγνητικού συντονισμού (MRI) (7).

Το 1971 ο Naftolin συνέδεσε τον υπογοναδισμό με την έλλειψη έκκρισης της GnRH ενώ τον ίδιο χρόνο ανακαλύφθηκε το δεκαπεπτίδιο της GnRH (8,9), εύρημα το οποίο χάρισε στο Schally το βραβείο Nobel Ιατρικής.

Το 1986-1988 περιεγράφη η συνύπαρξη της νόσου με την φυλοσύνδετη μορφή ιχθύωσης και χονδροδυσπλασίας. Η δεύτερη ήταν γνωστό ότι οφείλεται στην έλλειψη της στεροειδικής σουλφατάσης (STS) το γονίδιο της οποίας είχε εντοπιστεί στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος X. Η κλινική αυτή παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση ότι η νόσος προκαλείται από δύο γειτονικά γονίδια, η κοινή βλάβη των οποίων προκαλεί και τις δυο νόσους (10,11,12). Αυτή η παρατήρηση άνοιξε το δρόμο για την χαρτογράφηση του υπεύθυνου γονιδίου για την φυλοσύνδετη μετάδοση της νόσου στο σημείο Xp 22.3 του βραχέως σκέλους του χρωμοσώματος X (13).

Το 1989 οι Schwanzel-Fukuda και Praff διατύπωσαν την θεωρητική υπόθεση ότι η συνύπαρξη ανοσμίας και υπογοναδισμού οφείλεται σε αδυναμία μετανάστευσης των πυρήνων της GnRH από τη θέση γέννησής τους στο

οσφρητικό πλακόδιο του εκτοδέρματος, διαμέσου της οσφρητικής οδού προς τη τελική θέση εγκατάστασής τους στον υποθάλαμο (Εικόνα 1) (14). Η θεωρητική αυτή υπόθεση επαληθεύτηκε λίγο αργότερα από τον Brick. Μετά από νεκροτομή την οποία διενήργησε σε αγέννητο έμβρυο μητέρας αγοριού με σύνδρομο Kallmann η οποία είχε αποβάλει την 14 εβδομάδα της κύησης, ανακάλυψε ότι τα νευρικά κύτταρα της GnRH είχαν σταματήσει λίγο έξω από το forebrain. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη περιγραφή της οδού, την οποία ακολουθούν τα κύτταρα της GnRH προκειμένου να βρουν την τελική τους θέση στους πυρήνες του υποθάλαμου.

Το 1990-1991 οι Petit και Franco εντόπισαν την ακριβή περιοχή στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος X όπου εδράζεται το γονίδιο το υπεύθυνο για τη φυλοσύνδετη μετάδοση του συνδρόμου Kallmann (Χρ 22.3 του χρωμοσώματος X) (15, 16), το οποίο ονομάστηκε KAL-1 και μεταλλάξεις του έχουν εντοπιστεί στο 60-70% των φυλοσύνδετων Kallmann. Το μικρό ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων του γονιδίου KAL-1 τόσο στη οικογενή φυλοσύνδετη μετάδοση όσο και στις σποραδικές μορφές της νόσου (15% οικογενή, 5-8% σποραδικά) (17,18). υποδεικνύει ότι η φυλοσύνδετη μορφή δεν είναι η περισσότερο συχνή.

Πρόσφατα εντοπίστηκε το υπεύθυνο γονίδιο για μια μορφή του με σωματική κυρίαρχη μετάδοση κληρονομούμενου συνδρόμου Kallmann. Πρόκειται για το γονίδιο FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) (19). Ο εντοπισμός προήλθε από τη διερεύνηση δύο ασθενών με σύνδρομο συνεχόμενων γονιδίων που παρουσίαζαν συγγενή σφαιροκύτταρωση, σύνδρομο Kallmann και έλλειψη στη θέση 8p11.2 του χρωμοσώματος 8 (20). Μεταλλάξεις του γονιδίου FGFR1 (αναφερόμενου και ως KAL-2) φαίνεται να ευθύνονται για το

10% περίπου των οικογενών περιστατικών με κυρίαρχη μετάδοση και για λιγότερο του 10% των σποραδικών περιστατικών (20).

Μεταλλάξεις στον υποδοχέα της GnRH έχουν εντοπισθεί σε μικρό αριθμό οικογενειών με σωματική υπολειπόμενη μετάδοση της νόσου (οικογενή 40% σποραδικά 16%) (21,22). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα περιστατικά αυτά χαρακτηρίζονται από μεγάλη κλινική ποικιλομορφία.

Πρόσφατα εντοπίστηκε ένα νέο γονίδιο υπεύθυνο επίσης για μια μορφή της νόσου κληρονομούμενης με σωματική υπολειπόμενη μετάδοση. Το ενεχόμενο γονίδιο εντοπίστηκε στη θέση 19p13.3 του χρωμοσώματος 19 (23). Πρόκειται για το γονίδιο GPR54 (G Protein-coupled Receptor Gene). Οι ασθενείς παρουσιάζουν διαταραχή της ενδογενούς έκκρισης της GnRH και καθυστερημένη απάντηση στην εξωγενή χορήγηση GnRH (24,25). Μεταλλάξεις του γονιδίου GPR54 έχουν εντοπιστεί σε πολύ μικρό ποσοστό ασθενών με σποραδικό ΙΥΥ (1-2%).

Το παρόν επίπεδο κατανόησης της μοριακής αιτιοπαθογένειας της νόσου δεν επιτρέπει περαιτέρω διαφοροποιήσεις της θεραπευτικής προσέγγισης.

Κλινική εικόνα

Η συμπτωματολογία ποικίλει ανάλογα της ηλικίας του ασθενούς. Η συνήθης εικόνα είναι αυτή της καθυστέρησης της ολοκλήρωσης της εφηβείας, του υπογοναδισμού, της πρωτοπαθούς αμηνόρροιας στις γυναίκες, αν και υπάρχει μια μικρή ομάδα ασθενών οι οποίες εισέρχονται φυσιολογικά στην εφηβεία και παρουσιάζουν παύση της αναπαραγωγικής τους ωρίμανσης και δευτεροπαθή αμηνόρροια.(17)

Στο σύνδρομο Kallmann η συχνότητα κατά φύλο είναι 7-8 άνδρες προς 1 γυναίκα, ενώ στον ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό η κατανομή κατά φύλο είναι ίση.

Η συμπτωματολογία ποικίλει ανάλογα της ηλικίας του ασθενούς (17).

- Κατά την διάρκεια της νεογνικής περιόδου τα αγόρια μπορεί να παρουσιάζουν μικροφαλία (περίπου το 50 % των νεογνών με μικροφαλία έχουν ανεπάρκεια της GnRH).
- Κατά την παιδική ηλικία το μόνο εύρημα είναι η ανοσμία η οποία βοηθά στη διάγνωση αλλά δεν είναι παθογνωμονική.
- Στην εφηβεία παρατηρείται αδυναμία ανάπτυξης των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου (τρίχωση στο εφηβαίο, μειωμένη μυϊκή μάζα για τα αγόρια και υποπλασία στήθους, ελλιπής ανάπτυξη μικρών και μεγάλων χειλέων του αιδοίου στα κορίτσια) .Στα κορίτσια ως πρωταρχικό εύρημα μπορεί επίσης να εμφανιστεί πρωτοπαθής αμηνόρροια η oligομηνόρροια η οποία και τις ωθεί προς τον γιατρό.
- Τέλος υπάρχει μια μικρή ομάδα ασθενών οι οποίοι εισέρχονται φυσιολογικά στην εφηβεία αλλά κατά την διάρκεια αυτής υπάρχει παύση της αναπαραγωγικής τους ωρίμανσης. Επίσης υπάρχουν και ασθενείς που ενώ είχαν φυσιολογική εφηβεία, ανέπτυξαν υπογοναδισμό στην ενήλικη ζωή τους ο οποίος εμφανίζεται με στειρότητα-σεξουαλική δυσλειτουργία-πτώση της libido-αλλαγές στην διάθεση και κατάθλιψη-πτώση τριχών από το εφηβαίο και μείωση της μυϊκής δύναμης.

Κλινικά σημεία (17)

- Ευνουχοειδής σωματότυπος (συνήθως).
- Άνοιγμα χειρών > ύψους (περισσότερο από 5 cm) υποδηλώνοντας την έλλειψη σύγκλισης των επιφύσεων εξαιτίας της έλλειψης στεροειδών ορμονών.
- **Γυναίκες** : Απουσία δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου με μικρή έως πλήρη έλλειψη ανάπτυξης του στήθους και των τριχών του εφηβαίου (στάδιο κατά Tanner I η II).
- **Άνδρες** : Μικρή η πλήρης απουσία τριχών στο πρόσωπο , λεπτή παιδική φωνή, μικροφαλία, μικρορχία (1 με 2 ml όγκο) αλλά και κρυπορχία ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι τρίχωση στο εφηβαίο μπορεί να είναι φυσιολογική λόγω των λίγων αλλά επαρκών στεροειδών ορμονών οι οποίες εκκρίνονται από τα επινεφρίδια.
- Η γυναικομαστία στους άνδρες είναι ασυνήθης λόγω μειωμένης έκκρισης γοναδοτροφινών και οιστρογόνων.
- Ανοσμία. Εύρημα το οποίο υποδηλώνει ότι η ανεπάρκεια της GnRH οφείλεται σε σύνδρομο Kallmann.
- Άλλες συγγενείς ανωμαλίες οι οποίες συνδυάζονται με το σύνδρομο Kallmann (26,27) είναι οι εξής :

ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ :

Συνκινησία ακρών, παρεγκεφαλιδική αταξία, νευροαισθητήρια βαρηκοΐα, πνευματική καθυστέρηση, σπαστική παραπληγία, επιληψία, διαταραχές οφθαλμικής κινητικότητας.

ΕΞΩΝΕΥΡΙΚΟΙ

Ετερόπλευρη νεφρική αγενεσία, κοιλοποδία, λαγώχειλος–λυκόστομα, ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη κρυφορχία, αγενεσία οδόντων, μειωμένη ανάπτυξη 4^{ης} μετακαρπικής φάλαγγας.

Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι σε ασθενείς με σύνδρομο Kallmann και λυκόστομα έχουν βρεθεί διαφορές στην μορφολογία τόσο του κρανίου όσο και του προσώπου σε σχέση με τους φυσιολογικούς αλλά και τους ασθενείς με Kallmann χωρίς συγγενείς ανωμαλίες (αυξημένο mandibular inclination+angulation-retrognathism- δυσμορφία σφηνοειδούς οστού).

Αξίζει να τονισθεί ότι σε αντίθεση με τις πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς βλάβες του υποθαλάμου, όχι μόνο δεν παρατηρείται υπερπρολακτιναιμία, αλλά στη πλειοψηφία των περιπτώσεων υπάρχουν πολύ χαμηλές τιμές προλακτίνης.

- ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΗ ΨΥΧΙΚΗ ΣΦΑΙΡΑ:

Αν και το γονίδιο KAL έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη ψυχοπαθολογικών εκδηλώσεων, με κύριο εκπρόσωπο τη σχιζοφρένεια, οι εκδηλώσεις από τη ψυχική σφαίρα ασθενών με σύνδρομο Kallmann δεν έχουν μελετηθεί.

Μέχρι σήμερα έχει περιγραφεί μόνο μία περίπτωση μονο-ωειδών διδύμων με σχιζοειδή ψύχωση και υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό.

Διάγνωση

Τα κριτήρια διάγνωσης (17) του συνδρόμου Kallmann και του ΙΥΥ παρουσιάζονται στο Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Κριτήρια διάγνωσης συνδρόμου Kallmann και ΙΥΥ

Ηλικία μεγαλύτερη των 18 ετών
Επίπεδα στεροειδικών ορμονών στον ορό προεφηβικού σταδίου (Τεστοστερόνη <100 ng/dl (3 nmol/L) στους άνδρες, Οιστραδιόλη <20 pg/ml 173 pmol/L στις γυναίκες)
Κλινικά σημεία και συμπτώματα υπογοναδισμού (καθυστέρηση ενήβωσης, υπογοναδισμός, αμηνόρροια στις γυναίκες)
Επίπεδα LH και FSH φυσιολογικά ή χαμηλότερα των φυσιολογικών ορίων (LH: 1,4-4,3 IU/L, FSH: 1,7-3,7 IU/L)
Φυσιολογικές δοκιμασίες των υπολοίπων ορμονών της αδενουπόφυσης
Φυσιολογική απεικόνιση της περιοχής υποθαλάμου-υπόφυσης με αξονική τομογραφία (CT scan) ή μαγνητική τομογραφία (MRI)
Διάγνωση υποσμίας ή ανοσμίας με την δοκιμασία UPSIT (για το σ. Kallmann)

Σύνδρομο Kallmann**Παθογενετικό υπόστρωμα συνδρόμου Kallmann**

Το παθογενετικό υπόστρωμα των δύο κύριων διαταραχών του συνδρόμου Kallmann (υπογοναδισμός και ανοσμία) ερμηνεύθηκε με την αναγνώριση κοινής εμβρυογενετικής προέλευσης των οσφρητικών νευρώνων και των νευρώνων που εκκρίνουν GnRH. Η ανεπάρκεια της GnRH στο σύνδρομο Kallmann οφείλεται σε αδυναμία μετανάστευσης των GnRH νευρώνων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής στην τελική λειτουργική τους θέση στον υποθάλαμο. Με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας και υβριδισμού *in situ* σε έμβρυα ποντικού - με χρήση αντι-GnRH αντισωμάτων και ανιχνευτών GnRH αντιστοίχως - βρέθηκε ότι οι νευρώνες GnRH εκκινούν από το οσφρητικό

πλακώδιο, μια διακριτή πάχυνση του κεφαλικού εξωδέρματος από το οποίο θα προέλθει το οσφρητικό επιθήλιο (14, 28). Τα τρία είδη νευρώνων (οσφρητικοί, τελικοί και υνιορρινικοί) που συνιστούν την εγκεφαλική συζυγία, προέρχονται επίσης από το οσφρητικό επιθήλιο. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, οι οσφρητικοί νευράξονες μεταναστεύουν διασχίζοντας το ηθμοειδές πέταλο και τις μήνιγγες για να καταλήξουν σε εξειδικευμένη περιοχή του αναπτυσσόμενου ομόπλευρου οσφρητικού βολβού (σπείραμα), όπου δημιουργούν συνάψεις με τους δένδριτες των μιτροειδών κυττάρων (δεύτεροι αισθητικοί νευρώνες) (εικόνα 2). Η επαφή μεταξύ των αναπτυσσόμενων οσφρητικών νευραξόνων και του πρόσθιου εγκεφαλικού κυστιδίου του εμβρύου είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική μορφογένεση των οσφρητικών βολβών. Την ίδια οδό ακολουθούν και οι GnRH νευρώνες, μεταναστεύοντας κατά μήκος των οσφρητικών, τελικών και ινιορρινικών νευρώνων για να καταλήξουν στον πρόσθιο εγκέφαλο, στον υποθάλαμο (14,28).

Η διαπίστωση ότι οι οσφρητικοί νευράξονες και οι νευρώνες GnRH, κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, χρησιμοποιούν κοινή οδό μετανάστευσης, οδήγησε στην υπόθεση ότι η ανοσμία και η ανεπάρκεια GnRH στο σύνδρομο Kallmann οφείλονται σε μια μόνη ανωμαλία, που αφορά τη διαδικασία της νευρωνικής μετανάστευσης. Αυτή θεωρήθηκε ότι μπορεί να σχετίζεται με ανεπάρκεια μορίου(-ων), απαραίτητου(-ων) για την επέκταση και καθοδήγηση των οσφρητικών νευραξόνων προς τον πρόσθιο εγκέφαλο καθώς και για την εγκατάσταση ή/και τη διατήρηση των κατάλληλων αλληλεπιδράσεων τους με τους οσφρητικούς βολβούς και συνεπώς και για την φυσιολογική μετανάστευση των GnRH νευρώνων στην λειτουργική τους θέση στον υποθάλαμο.

Η απουσία έκφρασης του γονιδίου KAL στο οσφρητικό επιθήλιο και στους μεσεγχυματικούς ιστούς που συνιστούν την μεταναστευτική οδό των νευρώνων της GnRH σε οποιοδήποτε στάδιο εμβρυϊκής ανάπτυξης, υποδηλώνει ότι το KAL δεν είναι απαραίτητο για την καθοδήγηση των οσφρητικών νευραξόνων προς την περιοχή του προσθίου εγκεφάλου, ούτε για την εγκατάσταση των αρχικών τους επαφών με τον αναπτυσσόμενο οσφρητικό βολβό. Μάλλον η πρωτεΐνη KAL, εκκρινόμενη από τα μιτροειδή κύτταρα του οσφρητικού βολβού, αποτελεί μόριο προσκόλλησης της εξωκυττάριας ουσίας που συμμετέχει σε πλέον όψιμες διαδικασίες όπως η σταθεροποίηση/διατήρηση των κατάλληλων αλληλεπιδράσεων στις συνάψεις οσφρητικών νευραξόνων και μιτροειδών κυττάρων και/ή στη μορφογένεση/διατήρηση της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του οσφρητικού βολβού. Η διαταραχή μετανάστευσης των νευρώνων της GnRH θεωρείται δευτερογενής, απότοκος της απουσίας της μεταναστευτικής οδού, η οποία φυσιολογικά παρέχεται από την επαφή οσφρητικών νευρώνων και προσθίου εγκεφάλου. Τα γονίδια των αυτοσωματικών μορφών του συνδρόμου Kallmann πιθανώς κωδικοποιούν άλλους παράγοντες που συμμετέχουν στο σύνθετο αυτό αναπτυξιακό σύστημα (εικόνα 5).

Το παθογενετικό αυτό μοντέλο του συνδρόμου Kallmann ενισχύθηκε από τη μελέτη εγκεφάλου ανθρώπινου εμβρύου 19 εβδομάδων με μεγάλη έλλειψη στην περιοχή Xp22.3 που περιελάμβανε και το γονίδιο KAL (29). Το κύημα – προϊόν εκτρώσεως από μητέρα άρρενος ασθενούς με σύνδρομο Kallmann – υπεβλήθη σε νεκροτομική μελέτη κατόπιν συγκατάθεσης των γονέων. Στο έμβρυο αυτό, αν και το οσφρητικό επιθήλιο ήταν φυσιολογικό και οι οσφρητικοί νευράξονες αναπτύσσονταν κανονικά έχοντας αρχίσει να

μεταναστεύουν προς τον πρόσθιο εγκέφαλο, διαπιστώθηκε ότι κατέληγαν πρόωρα στο επίπεδο των μηνίγγων μεταξύ ηθμοειδούς πετάλου και προσθίου εγκεφάλου σε ένα πλέγμα νευρικών ινών και συνδετικού ιστού. Ανοσοϊστοχημική ανάλυση με χρήση αντι-GnRH αντισωμάτων ανέδειξε πλήρη απουσία GnRH νευρώνων από τον εγκέφαλο και συσσωρευση τους στην ρινική κοιλότητα και την οπίσθια επιφάνεια του ηθμοειδούς στο άπω τμήμα των οσφρητικών νευρώνων. Σε συγκριτική μελέτη τριών εμβρύων ίδιας ηλικίας διαπιστώθηκε ότι όλοι οι νευρώνες της GnRH είχαν ήδη φτάσει στην τελική τους θέση στον υποθάλαμο.

Ενδιαφέρουσα είναι εξάλλου η απόπειρα συσχετισμού των κλινικών εκδηλώσεων του συνδρόμου Kallmann με τους ιστούς, εντός και εκτός νευρικού συστήματος, στους οποίους το γονίδιο KAL εκφράζεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής. Πράγματι σε αρκετές περιπτώσεις μια τέτοια σχέση είναι προφανής, δικαιολογώντας την απόδοση της κλινικής ανωμαλίας σε δυσλειτουργία ιστού ή οργάνου που εκφράζει το γονίδιο κατά την εμβρυογένεση, αν και ο ακριβής ρόλος της πρωτεΐνης KAL στην ανάπτυξη των διαφόρων συστημάτων είναι αδιευκρίνιστος (30) (Πίνακας 2). Πολλές όμως αναγνωρισμένες ιστικές θέσεις έκφρασης του KAL δεν συνδέονται με κλινικές διαταραχές. Αυτό θεωρήθηκε ότι πιθανώς οφείλεται στην ύπαρξη ιστικών αντιρροπιστικών μηχανισμών που εμποδίζουν την εμφάνιση του συγκεκριμένου φαινοτύπου ή ότι εντάσσεται στο γενικότερο πλαίσιο της ποικίλης εκφραστικότητας των φαινοτυπικών εκδηλώσεων του συνδρόμου (31).

Το γονίδιο KAL έχει επίσης θεωρητικά ενοχοποιηθεί στη παθογένεια της σχιζοφρένειας. Η παρατήρηση ότι το σύνδρομο Kallmann και η σχιζοφρένεια

παρουσιάζουν κοινά κλινικά χαρακτηριστικά, τα οποία αφορούν τόσο το ΚΝΣ όσο και την οσφρητικό οδό, οδήγησε στη διατύπωση της θεωρητικής υπόθεσης ότι τα δύο σύνδρομα μπορεί να έχουν κοινή αιτιοπαθολογία. Μέχρι σήμερα δεν έχει παρουσιαστεί ασθενής με σύνδρομο Kallmann και σχιζοφρένεια. Η μόνη κλινική οντότητα που έχει περιγραφεί αφορά μία περίπτωση μονοειδών διδύμων με σχιζοειδή ψύχωση και υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό.

Κληρονομικότητα του συνδρόμου Kallmann

Το σύνδρομο Kallmann εμφανίζεται με την σποραδική όσο και οικογενή μορφή και η επίπτωση του υπολογίζεται σε 1:50.000- 1:100.000 στο γενικό πληθυσμό. Μελέτη πολλών οικογενών περιπτώσεων ΙΗΗ ή/και σ.Kallmann ανέδειξε διάφορους τρόπους κληρονομικότητας που περιλαμβάνουν φυλοσύνδετο, αυτοσωματικό επικρατούντα με ποικίλη διεισδυτικότητα και αυτοσωματικό υπολειπόμενο, αποδεικνύοντας τη γενετική ετερογένεια του συνδρόμου και οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τουλάχιστον τρία γονίδια ενέχονται στην παθογένεια της ανεπάρκειας της GnRH (32-35).

Η πενταπλάσια έως και επταπλάσια επίπτωση του συνδρόμου Kallmann στους άρρενες έναντι των γυναικών, είχε αρχικά οδηγήσει στην υπόθεση ότι η φυλοσύνδετη μορφή αποτελεί τον συνηθέστερο τρόπο μετάδοσης της νόσου (36). Νεότερα δεδομένα από κλινικές μελέτες σε μεγάλες σειρές πασχόντων υποδηλώνουν μετάδοση – στην πλειονότητα των οικογενών περιπτώσεων – με τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα με ατελή εκφραστικότητα (37,38).

Τα γονίδια που σχετίζονται με τις αυτοσωματικές μορφές μετάδοσης του συνδρόμου Kallmann δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Χρωμοσωματικές ανωμαλίες – κυρίως ισοζυγισμένες διαμεταθέσεις – έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με σύνδρομο Kallmann ή IHH. Αυτές οι γενετικές βλάβες δυνατόν να σχετίζονται αιτιολογικά με τη νόσο, παρέχοντας ενδείξεις για την χρωμοσωμιακή εντόπιση των αντιστοιχών αυτοσωματικών γονιδίων (39-40).

Το γονίδιο KAL

α) Χαρτογράφηση

Η πρώτη προσπάθεια χαρτογράφησης του γενετικού επιτόπου που συνδέεται με τη φυλοσύνδετη μορφή του συνδρόμου Kallmann βασίστηκε στην κλινική παρατήρηση της συνύπαρξης της νόσου με τη φυλοσύνδετη μορφή ιχθύασης, λόγω έλλειψης της στεροειδικής σουλφατάσης (STS) και στην υπόθεση ότι οι δύο νόσοι αποτελούν σύνδρομα γειτονικών γονιδίων (contiguous gene syndromes) (10). Με ανάλυση γενετικής σύνδεσης (genetic linkage analysis) το υπεύθυνο γονίδιο χαρτογραφήθηκε στο άπω τμήμα του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος X εγγύς του γονιδίου της STS στην περιοχή Xp22.3 (13, 41). Η περιγραφή ασθενών με ποικίλους συνδυασμούς νοσημάτων οφειλόμενων σε μεγάλες ελλείψεις τμημάτων της περιοχής Xp22.3 και η μοριακή ανάλυση των γενετικών αυτών βλαβών σε συσχέτισμό με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των πασχόντων, οδήγησε στην ακριβή χαρτογράφηση των υπευθύνων για τις διαταραχές αυτές γονιδίων από το τελομερές προς το κεντρομερές του X χρωμοσώματος (10,12,41,42). Οι νόσοι αυτοί, που συνιστούν «γειτονικά γενετικά σύνδρομα» είναι οι εξής: βραχύ

ανάστημα, χονδροδυσπλασία, πνευματική καθυστέρηση, φυλοσύνδετη ιχθύαση και σύνδρομο Kallmann (εικόνα 3). Το σημείο εκκίνησης για την απομόνωση του γονιδίου KAL αποτέλεσε ο εντοπισμός χρωμοσωματικής περιοχής στο Χρ22.3 (διάστημα KAL) με γενετική ανάλυση δύο αρρένων ασθενών με μεγάλες ελλείψεις στην περιοχή, πασχόντων από τις 4 ασθένειες, οι οποίοι διέφεραν στην παρουσία ή όχι και συνδρόμου Kallmann (15). Το διάστημα αυτό, που οριοθετήθηκε από τα δυο διαφορετικά σημεία της χρωμοσωματικής έλλειψης, θεωρήθηκε ότι περιέχει τμήμα τουλάχιστον του γονιδίου του συνδεόμενου με τη φυλοσύνδετη μορφή του συνδρόμου και το μέγεθος του προσδιορίσθηκε αρχικά με ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE) σε λιγότερο από 350 kb. Με «πολυπαραγοντική αυτοματοποιημένη ανάλυση» (multiparameter computer analysis) ολόκληρου του διαστήματος KAL απομονώθηκε νουκλεοτιδική αλληλουχία, με σημαντική συντήρηση σε πολλά είδη θηλαστικών, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής για τη διαλογή βιβλιοθήκης cDNA εμβρυϊκού ανθρώπινου εγκεφάλου. Το γονίδιο που απομονώθηκε ονομάσθηκε ADMLX (Adhesion Molecule-Like from the X chromosome) λόγω της σημαντικής ομολογίας του προβλεπόμενου πρωτεϊνικού του προϊόντος με γνωστά μόρια προσκόλλησης (43). Με παρόμοια τεχνική το ίδιο γονίδιο (KALIG 1: Kallmann's Syndrome Interval Gene 1) απομονώθηκε ταυτόχρονα από ανεξάρτητη ερευνητική ομάδα (16) και εντοπίσθηκε σε απόσταση περίπου 9 Mb από το Χρ τελομερίδιο και 1,5 Mb από το γειτονικό γονίδιο της STS. Η ανεύρεση σημειακών μεταλλάξεων και ελλείψεων του γονιδίου αυτού σε πολλούς ασθενείς με σύνδρομο Kallmann παρέχει την απόδειξη ότι το ADMLX ή KALIG 1 ή KAL αποτελεί το γονίδιο της φυλοσύνδετης μορφής της νόσου (43-46).

β) Τοπογραφία

Το γονίδιο KAL έχει μέγεθος 210 kb και αποτελείται από 14 εξώνια (Εικόνα 2). Το μέγεθος των εξωνίων κυμαίνεται μεταξύ 130 και 230 bp ενώ των ιντρονίων μεταξύ 1 και 18 kb. Περιέχει πλαίσιο ανάγνωσης που αποτελείται από 2040 νουκλεοτίδια, μια μεγάλη (4,1 kb) μη μεταφραζόμενη περιοχή στο 3' άκρο – σημαντική πιθανώς για τη λειτουργία του γονιδίου – και μια μη μεταφραζόμενη περιοχή μεγέθους 150 bp στο 5' άκρο (16,43). Το γονίδιο KAL εκφράζεται και από τα δυο X χρωμοσώματα (διαφεύγει από την αδρανοποίηση) και διαθέτει μη λειτουργικό ομόλογο γονίδιο (KALY) στο εγγύς τμήμα του μακρού σκέλους του Y χρωμοσώματος στην περιοχή Yq11.2. Η περιοχή αυτή του Y χρωμοσώματος εμφανίζει σημαντική ομολογία με αλληλουχίες της Xp22.3 στο διάστημα μεταξύ 7 και 9 Mb από το Xp τελομερίδιο, εκτός της ψευδοαυτοσωματικής περιοχής του Xp, όπου υποχρεωτικά επισυμβαίνει χιασματυπία κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης στον άρρενα. Το KALY – γνωστό και ως ψευδοKAL – διαθέτει υψηλό βαθμό ομολογίας (86,2% - 99,1%) με το γονίδιο KAL, που αφορά και τις περιοχές εντός των ιντρονίων, ενώ στερείται των εξωνίων 1,3,8 και 9 και περιέχει αρκετές ανερμηνεύσιμες (nonsense) και πλαισιοτροποποιητικές (frameshift) μεταλλάξεις (πίνακας 2) (47).

Εξελικτική συντήρηση του γονιδίου KAL

Η πρωτεΐνη KAL

Το γονίδιο KAL κωδικοποιεί πρωτεΐνη 680 αμινοξέων με αμινοτελική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη και καρβοξυτελική περιοχή πλούσια σε ιστιδίνη (48). Το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης, έως το αμινοξύ 176, μπορεί να διακριθεί σε δύο υποπεριοχές. Η μία (έως το αμινοξύ 133) δεν εμφανίζει ομοιότητες με καμία γνωστή πρωτεΐνη ενώ η άλλη (αμινοξέα 134-176) διαθέτει περιοχή «τετραδισουλφιδικού πυρήνα» αποτελούμενη από 8 κυστεΐνες που σχηματίζουν 4 δισουλφιδικούς δεσμούς. Το μοτίβο αυτό (Whey Acidic Protein -WAP- core motif) ανευρίσκεται σε διάφορες πρωτεΐνες όπως η αγλουτινίνη του σιταριού, νευροφυσίνες, καθώς και αναστολείς πρωτεασών. Ενδιαφέρον είναι ότι διάφορες πρωτεάσες (π.χ του τύπου του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου) ρυθμίζουν την προσκόλληση των νευραξόνων σε ειδικά συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, διευκολύνοντας την επιμήκυνση τους και συνεπώς οι αναστολείς τους πιθανώς να τροποποιούν αυτές τις αλληλεπιδράσεις (49). Το τμήμα της πρωτεΐνης, από το αμινοξύ 177 έως το 661, περιέχει 4 γειτονικές επαναλήψεις φιμπρονεκτίνης τύπου III (Fibronectin type III repeat), μοτίβο που αναγνωρίσθηκε αρχικά στην φιμπρονεκτίνη και ανευρίσκεται σε διάφορα μόρια νευρικής κυτταρικής προσκόλλησης (Neural Cell Adhesion Molecules- NCAM) της εξωκυττάριας ουσίας καθώς και σε πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες συνδεόμενες με κυτταρικούς υποδοχείς. Πολλά από αυτά τα μόρια συμμετέχουν στην κατά μήκος αύξηση των

νευριτών και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ νευραξόνων, εμπλεκόμενα έτσι στην νευρωνική μετανάστευση (50-52).

Η τοπογραφία των πιθανών λειτουργικών περιοχών (domains) στο μόριο της πρωτεΐνης KAL μελετήθηκε σε σχέση με τη δομή του γονιδίου (εικόνα 4). Το πρώτο εξώνιο κωδικοποιεί το οδηγό πεπτιδίο της πρωτεΐνης και τμήμα της περιοχής πλούσιας σε κυστεΐνη, η οποία κωδικοποιείται και από τα εξώνια 2,3 και 4, ενώ το WAP core μοτίβο κωδικοποιείται εξ ολοκλήρου από το τέταρτο εξώνιο. Τρεις από τις επαναλήψεις φιμπρονεκτίνης τύπου III (οι r1, r2 και r4) στο μόριο της πρωτεΐνης κωδικοποιούνται από δύο εξώνια (όπως συμβαίνει και στο μόριο της φιμπρονεκτίνης), ενώ η r3 από τρία εξώνια, τα 9, 10 και 11 (47).

Η πρωτεΐνη KAL εμφανίζει συνεπώς σημαντική ομολογία με μόρια που υπεισέρχονται στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος αν και διαθέτει μοναδικά χαρακτηριστικά, όπως η συνύπαρξη στο ίδιο μόριο περιοχής τετραδισουλφιδικού πυρήνα και επαναλήψεων τύπου φιμπρονεκτίνης. Η παρουσία οδηγού πεπτιδίου στο αμινοτελικό άκρο της και η έλλειψη διαμεμβρανικής περιοχής ή αλληλουχιών για σύνδεση με φωσφοϊνοσιτόλη αποτελούν ενδείξεις ότι εκκρίνεται και αποτελεί συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας.

Ιστική έκφραση του γονιδίου KAL

Το KALc εμφανίζει διφασική έκφραση κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής. Κατά τα πρώιμα στάδια της οργανογένεσης (εμβρυϊκή μέρα:ED 1.5- 6) εκφράζεται σε πλήθος παραγώγων του εξωδέρματος, ενδοδέρματος και μεσεγχύματος, συμπεριλαμβανομένων των αρτηριακών τοιχωμάτων, των καταβολών των άκρων και νευρωνικών πληθυσμών νωτιαίου μυελού και

εγκεφάλου, καθώς και σε παροδικές εμβρυϊκές δομές, όπως βραγχιακά τόξα, νωτιαίες χορδές, παράγωγα των σωματιών, μεσόνεφρο-μετάνεφρο και προσωπικό μεσέγγχυμα. Το KAL φαίνεται λοιπόν ότι πρώιμως εμπλέκεται σε μορφογενετικές διαδικασίες κατά την εμβρυογένεση. Το δεύτερο κύμα έκφρασης αρχίζει από την όγδοη εμβρυϊκή μέρα και αφορά πλέον συγκεκριμένους νευρωνικούς πληθυσμούς υποδηλώνοντας τη συμμετοχή του στην όψιμη νευρωνική διαφοροποίηση, το σχηματισμό συνάψεων και/ή τη νευρωνική θρέψη.

Στο οσφρητικό σύστημα νεοσσού όρνιθας ανευρίσκονται υψηλά επίπεδα έκφρασης KALc στα μιτροειδή κύτταρα του οσφρητικού βολβού, τα οποία σχηματίζουν συνάψεις με τους οσφρητικούς νευράξονες αποτελώντας τον δεύτερο αισθητικό νευρώνα της οσφρητικής οδού. Η έκφραση του KALc αρχίζει όταν το νευροεπιθήλιο του προδρόμου οσφρητικού βολβού αρχίζει να διαφοροποιείται (ED 7) και αυξάνεται σταθερά και σημαντικά στα διαφοροποιούμενα μιτροειδή κύτταρα. Ενδιαφέρον είναι ότι mRNA του KAL γονιδίου δεν ανιχνεύεται κατά τη διαφοροποίηση του οσφρητικού πλακωδίου, ούτε κατά την εγκατάσταση των πρώτων επαφών των οσφρητικών νευραξόνων με τον πρόσθιο εγκέφαλο.

Το KALc εκφράζεται επίσης στα κύτταρα Purkinje του φλοιού της παρεγκεφαλίδας και σε νευρώνες του ραβδωτού σώματος, του οπτικοκινητικού πυρήνα, του κινητικού πυρήνα του τριδύμου, του αμφιβληστροειδούς καθώς και στο χοριοειδές πλέγμα.

Μελέτες με *in situ* υβριδισμό σε έμβρυα ανθρώπου, ανέδειξαν έκφραση του KAL σε αντίστοιχες - με το έμβρυο όρνιθας - περιοχές του αναπτυσσόμενου νευρικού συστήματος, όπως στον οσφρητικό βολβό (εξωτερική και κοκκιώδης

στιβάδα), στην παρεγκεφαλίδα (κοκκιώδης στιβάδα), στον μέσο ραχιαίο θάλαμο (ο οποίος συνδέεται λειτουργικά με το οσφρητικό σύστημα) αλλά και επιπλέον στον εγκεφαλικό φλοιό και σε υποφλοιώδεις νευρώνες. Εκτός νευρικού συστήματος, στο ανθρώπινο έμβρυο αναγνωρίστηκαν και άλλες ιστικές θέσεις έκφρασης του KAL όπως στους βρόγχους, στο τοίχωμα του στομάχου, στους μεσοσπονδύλιους δίσκους και στην αδιαφοροποίητη γονάδα (30).

Οι μελέτες αυτές της εξελικτικής συντήρησης και έκφρασης του γονιδίου KAL κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής συνέβαλλαν σημαντικά στην κατανόηση του ρόλου της πρωτεΐνης KAL καθώς και της μοριακής παθογενετικής βάσης του συνδρόμου Kallmann.

Μεταλλάξεις του γονιδίου KAL

Οι μελέτες για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου KAL σε ασθενείς με σύνδρομο Kallmann ανέδειξαν το μεγάλο βαθμό γενετικής ετερογένειας της νόσου (Εικόνα 3). Μεγάλες ελλείψεις στην περιοχή Xp22.3 που περιλαμβάνουν ολόκληρο το γονίδιο KAL – συχνές σε ασθενείς με «γειτονικά γενετικά σύνδρομα» – είναι σπάνιες σε μεμονωμένο σύνδρομο Kallmann. Αντίθετα ποικίλες μικρές ελλείψεις και σημειακές μεταλλάξεις – ανερμηνεύσιμες, δυσερμηνεύσιμες, πλαισιοτροποποιητικές, συνδετικές - (nonsense, missense, frameshift, splice) έχουν περιγραφεί, με ευρεία κατανομή εντός του γονιδίου (16,18,44-46,53-55).

Σε ασθενείς στους οποίους αναγνωρίστηκαν συγκεκριμένες μεταλλάξεις του γονιδίου KAL διαπιστώθηκαν και άλλα κλινικά σημεία εκτός από τον

υπογοναδισμό και τις διαταραχές της όσφρησης (συνκνησία, κοιλοποδία, νεφρική απλασία κ.α), τα οποία, θεωρήθηκε ότι αποτελούν πλειοτροπικές εκδηλώσεις της γενετικής βλάβης (44,45). Η παρουσία των φαινοτυπικών αυτών ανωμαλιών αποτελεί ισχυρή περαιτέρω ένδειξη ότι το KAL εμπλέκεται στην ανάπτυξη όχι μόνο του οσφρητικού και αναπαραγωγικού συστήματος αλλά και άλλων νευρωνικών δικτύων καθώς και στην οργανογένεση του νεφρού (44,45).

Σημειωτέον ότι, σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών με φυλοσύνδετο σύνδρομο Kallmann που μελετήθηκαν δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου KAL (18,32,44,45,46). Το ποσοστό αυτό – που ανέρχεται σε 50% στις διάφορες σειρές ασθενών – αποδίδεται στην πιθανή εντόπιση της βλάβης εκτός της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου δηλ. στις 5΄ και 3΄ μη μεταφραζόμενες περιοχές (μεγέθους 150 bp και 4.120 bp αντιστοίχως), στις ρυθμιστικές αλληλουχίες του υποκινητή ή εντός ιντρονίων με δημιουργία νέας περιοχής splicing, ενώ επίσης δεν μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη άλλου γονιδίου που συμμετέχει στη φυλοσύνδετη μορφή του συνδρόμου (45).

Εξάλλου, η χαμηλή επίπτωση (8 - 15%) μεταλλάξεων του KAL σε σποραδικές περιπτώσεις της νόσου και τα ευρήματα κλινικών γενετικών μελετών συνηγορούν στο ότι η φυλοσύνδετη μορφή κληρονομικότητας αντιπροσωπεύει τη λιγότερο συχνή μορφή της νόσου. Φαίνεται ότι η πλειοψηφία των περιστατικών οφείλεται σε μεταλλάξεις αυτοσωματικών γονιδίων που ρυθμίζουν διάφορες πτυχές της πολύπλοκης εξελικτικής διαδικασίας, την οποία προϋποθέτει η φυσιολογική ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος (18).

Άλλα ενεχόμενα γονίδια

Πρόσφατα εντοπίστηκε το υπεύθυνο γονίδιο για μια μορφή του με σωματική κυρίαρχη μετάδοση κληρονομούμενου συνδρόμου Kallmann. Πρόκειται για το γονίδιο FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) (19). Ο εντοπισμός προήλθε από τη διερεύνηση δύο ασθενών με σύνδρομο συνεχόμενων γονιδίων που παρουσίαζαν συγγενή σφαιροκύττάρωση, σύνδρομο Kallmann και έλλειψη στη θέση 8p11.2 του χρωμοσώματος 8 (20) (Εικόνα 4). Μεταλλάξεις του γονιδίου FGFR1 (αναφερόμενου και σαν KAL-2) φαίνεται να ευθύνονται για το 10% περίπου των οικογενών περιστατικών με κυρίαρχη μετάδοση και για λιγότερο του 10% των σποραδικών περιστατικών (20) (Εικόνα 5).

Ιδιοπαθής Υπογοναδοτροφικός Υπογοναδισμός

Κληρονομικότητα Ιδιοπαθούς Υπογοναδοτροφικού Υπογοναδισμού.

Αν και η συντριπτική πλειοψηφία της εμφάνισης του ΙΥΥ είναι σποραδική υπάρχει κληρονομική μετάδοση, αυτοπεριοριζόμενη συνεπείας του υπογοναδισμού. Η πλειοψηφία των οικογενειών που έχουν εντοπισθεί υποδεικνύει μετάδοση με τον σωματικό κυρίαρχο χαρακτήρα. Σε σύνολο 32 συγγενών περιστατικών 18 ήσαν σποραδικά και 14 οικογενή, εκ των οποίων 8 με σωματικά κυρίαρχη μετάδοση, 5 με σωματικά υπολειπόμενη, 1 με ακαθόριστη και κανένα με φυλοσύνδετη μετάδοση. Αν και μέχρι σήμερα έχουν

εντοπισθεί δύο γονίδια, μεταλλάξεις των οποίων είναι υπεύθυνες για τον υπολειπόμενο σωματικό τρόπο μετάδοσης της νόσου (GnRH receptor, GPR54) κανένα γονίδιο υπεύθυνο για την σωματικά κυρίαρχη μετάδοση δεν έχει εντοπισθεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με το σύνδρομο Kallmann η απουσία μετάδοσης με τον φυλοσύνδετο χαρακτήρα υποδηλώνει ότι τα ενεχόμενα στην παθογένεια του συνδρόμου γονίδια δεν ευρίσκονται στο χρωμόσωμα X αλλά σε σωματικά γονίδια. (22)

Αν συνυπολογίσουμε και τα περιστατικά με συνοδό ανοσμία η συνολική επίπτωση της ανεπάρκειας GnRH σε 106 του MGH (Mass General Hospital) είναι 66% σποραδικά και 34% οικογενή εκ των οποίων 64% με σωματικά κυρίαρχη μετάδοση, 25% με σωματικά υπολειπόμενη και 11% με φυλοσύνδετη.(17)

Το γονίδιο της GnRH και ο υποκινητής του

GnRH 1 gene (8p21.2): Ήταν φυσικό οι πρώτες έρευνες να επικεντρωθούν στο γονίδιο το οποίο παράγει αυτή καθαυτή την ορμόνη που όταν μάλιστα ήταν γνωστό ότι υπάρχει φυσικό πρότυπο στον επίμου (56). Συγκεκριμένα στον επίμου ανευρέθει απάλειψη μιας μεγάλης περιοχής (33.5 Kb) άπω του εξονίου που κωδικοποιεί μέχρι το 11^ο αμινοξύ της του γονιδίου της GAP πρωτεΐνης GnRH με αποτέλεσμα ο επιμύς να παρουσιάζει σημεία υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού. Η γονιδιακή θεραπεία του ανωτέρω τμήματος απεκατέστησε πλήρως τη λειτουργικότητα και την έκφραση του γονιδίου (57).

Το γονίδιο της GnRH στον άνθρωπο ευρίσκεται στο χρωμόσωμα 8 στην θέση 8p11.2-p21 και αποτελείται από 4 εξόνια (Εικόνα 6Α) (58,59). Το πρώτο εξόνιο αποτελείται από το 5' μη μεταφράσιμο τμήμα (5'-UTR), το εξόνιο 2 κωδικοποιεί το σήμα της GnRH, το δεκαπεπτιδίο της GnRH, το GKR processing signal και τα 11 πρώτα αμινοξέα της GAP (GnRH associated protein) πρωτεΐνης. Το τρίτο εξόνιο κωδικοποιεί τα επόμενα 32 αμινοξέα της GAP ενώ το τέταρτο την υπόλοιπη GAP πρωτεΐνη, το κωδικόνιο που τερματίζει την μεταγραφή και το 3' μη μεταφράσιμο κομμάτι (3'-UTR) (58,60). Μέχρι σήμερα δεν έχουν εντοπιστεί ελλείψεις ή μεταλλάξεις στον άνθρωπο (61-63). Έρευνες διεξήχθησαν σε μεγάλο αριθμό ασθενών χωρίς όμως αποτέλεσμα (61-63, Georgopoulos et al, unpublished data).

Υποκινητής GnRH gene:

Ο υποκινητής του περιέχει GnRH ένα TATA box στην θέση -32/-25 και δύο CAAT boxes στις θέσεις -53/-50 και -162/-159 (61). Καθώς η έναρξη της μεταγραφής είναι διαφορετική στα υποθαλαμικά και κύτταρα του πλακούντα σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά πλακουντιακού όγκου έχει εντοπισθεί ειδική θέση έναρξη μεταγραφής η οποία απέχει 579 βάσεις από την αντίστοιχη υποθαλαμική (58). Από την τελευταία και σε απόσταση 84 βάσεων έχει εντοπισθεί περιοχή με την αλληλουχία GGTCTTGCT η οποία χαρακτηρίζει γονίδια με απουσία TATA box από τον υποκινητή τους (58). Για τους ανωτέρω λόγους η μελέτη του υποκινητή της GnRH πρέπει να περιλαμβάνει

τμήμα 1200 βάσεων από το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής. Με αυτή την μεθοδολογία μελετήθηκαν 28 ασθενείς χωρίς όμως αποτέλεσμα (Georgopoulos et al unpublished data).

Έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου της GnRH του ανθρώπου

- 1) Από πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε κύτταρα εκφράζουν το γονίδιο της GnRH ανευρέθει διπλή δράση όταν εμπλουτίζονται με GnRH ανάλογα. Μεγάλες συγκεντρώσεις των αναλόγων αυτών προκαλούν downregulation των επιπέδων του mRNA του γονιδίου ενώ αντίθετα μικρές συγκεντρώσεις αυξάνουν την έκφρασή του. (64)
- 2) Όταν τα ίδια κύτταρα εμπλουτιστούν με 17β-οιστραδιόλη το mRNA του γονιδίου υποεκφράζεται ενώ άμα προστεθεί ανταγωνιστής του υποδοχέα των οιστρογόνων (tamoxifen) άρρεται η κατασταλτική δράση της 17β-οιστραδιόλης. Έχει διαπιστωθεί επίσης ότι υπερέκφραση του υποδοχέα του πυρηνικού υποδοχέα των οιστρογόνων (ERα) καταστέλλει την έκφραση του υποκινητή της GnRH. Η περιοχή του υποκινητή που ασκείται αυτή η δράση είναι 169 με 548 βάσεις άπω του transcriptional start site του γονιδίου της GnRH (64).
- 3) Την ίδια κατασταλτική δράση έχουν και τα ανδρογόνα. Πιο συγκεκριμένα εμπλουτισμός με 5α διυδροτεστοστερόνη προκαλεί χρονοεξαρτώμενη μείωση της έκφρασης των επιπέδων του mRNA GnRH και αυτή η δράση άρρεται από τον ανταγωνιστή του υποδοχέα του των ανδρογόνων (hydroxyflutamide) (64).
- 4) Η FSH καταστέλλει τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου της GnRH.

Το γονίδιο του υποδοχέα της GnRH και ο υποκινητής του

Το γονίδιο του υποδοχέα της GnRH (4q21):

Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας των GPCR υποδοχέων τα οποία δεν έχουν ιντρόνια, το γονίδιο του υποδοχέα της GnRH αποτελείται από τρία εξόνια τα οποία χωρίζονται από δύο ιντρόνια. Στον άνθρωπο ευρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 στη θέση 4q21.2 και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεγέθους 328 αμινοξέων και επεκτείνεται σε μια περιοχή 15 Kb του χρωμοσώματος (Εικόνα 6B). Το πρώτο εξόνιο αποτελείται από το 5'-UTR μέρος και τα πρώτα 522 νουκλεοτίδια του open reading frame το οποίο κωδικοποιεί τα πρώτα τρία διαμεμβρανικά τμήματα του υποδοχέα και ένα μέρος του τέταρτου διαμεμβρανικού τμήματος. Το εξόνιο 2 κωδικοποιεί τα υπόλοιπα 220 νουκλεοτίδια που συνθέτει το τέταρτο διαμεμβρανικό μέρος, το πέμπτο διαμεμβρανικό μέρος καθώς και μέρος της τρίτης ενδοκυττάριας αγκύλης. Τέλος το εξόνιο 3 περιέχει την υπόλοιπη μεταγραφική αλληλουχία για την υπόλοιπη πρωτεΐνη καθώς και το 3'-UTR. Παρόλο που υπάρχει υψηλή εξελικτική συντήρηση ολόκληρου του γονιδίου στα θηλαστικά στον άνθρωπο το πρώτο ιντρόνιο είναι σχετικά μικρότερο από αυτό του επίμου και την αγελάδα (64). Στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις του υποδοχέα της GnRH σε ασθενείς με ΙΥΥ.

Ο υποκινητής του υποδοχέα της GnRH

Στον υποκινητή της GnRH υπάρχουν πέντε και 18 transcriptional start sites στον εγκέφαλο και την υπόφυση αντίστοιχα (65, 66). Όλες αυτές οι θέσεις εκκίνησης της μεταγραφής βρίσκονται στις περιοχές 579-819 και 1348-1751 άπω της μεθειονίνης απ' όπου ξεκινάει η μεταγραφή (65, 66). Έχουν ανευρεθεί πολλαπλά TATA box μέχρι και 1039 βάσεις άπω (7 στον άνθρωπο και 0 στον επίμυ) ενώ υπάρχουν και πολλαπλά CAAT box τα οποία επιβεβαιώνουν την παρουσία των πολλαπλών θέσεων εκκίνησης της μεταγραφής. Αξιοσημείωτο είναι ότι μόνο στον ανθρώπινο υποκινητή σε αντίθεση με του επίμυ έχουν ανευρεθεί πολλαπλά cis regulatory elements τα οποία δυνητικά ελέγχουν και την μεταγραφή του γονιδίου. Τέτοια cis regulatory elements περιλαμβάνουν τον CRE, PRE/GRE (progesterone-glucocorticoid, TRE (thyroid hormone), AP-1 (activating protein 1), AP-2 και τον πιο σημαντικό τον Pit-1 (pituitary specific response element) (67).

Ο Πρωτεϊνικός υποδοχέας της GnRH και οι οδοί μετάδοσης του σήματος

Το δεκαπεπτίδιο της GnRH το οποίο εκκρίνεται από τον μεσοβασικό υποθάλαμο εισέρχεται στην πυλαία κυκλοφορία υποθαλάμου-υπόφυσης και ασκεί την δράση της στα γοναδοτρόφα κύτταρα. Εκεί ο κύριος εκφραστής και μεταδότης της δράσης της είναι ο υποδοχέας της GnRH (GnRHR). Ο υποδοχέας αυτός έχει το χαρακτηριστικό ότι είναι διαμεμβρανικός και ασκεί την δράση του με την βοήθεια συγκεκριμένων G πρωτεϊνών οι οποίες με την

σειρά τους ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAP κινασών απαραίτητο για την μετάδοση του σήματος στον πυρήνα όπου προάγεται η σύνθεση των γοναδοτροφινών. (68)

Λειτουργικότητα του υποδοχέα της GnRH και ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος.

Ο GnRHR στον άνθρωπο είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας και ανήκει στην οικογένεια των GPCR υποδοχέων (G-protein coupled receptors) και πιο συγκεκριμένα στην οικογένεια της ροδοψίνης (rhodopsin like superfamily). Παραδείγματα άλλων υποδοχέων που ανήκουν στην οικογένεια αυτή είναι ο αδρενεργικός, ο στεροειδικός, ο υποδοχέας της TSH, FSH και LH. Όλοι οι υποδοχείς αυτοί έχουν μερικά κοινά χαρακτηριστικά τα οποία βοηθούν την κατάταξη τους στην οικογένεια της ροδοψίνης. Η τριτοταγής δομή τους απαρτίζεται από επτά διαμεμβρανικά τμήματα (Εικόνα 7) και περιέχουν συγκεκριμένα μοτίβα αμινοξέων μέσα σε αυτές τις περιοχές της πρωτεΐνης τα οποία έχουν διατηρηθεί στο πέρασμα των χιλιετιών σε όλα τα είδη όπου συναντούνται τέτοιοι υποδοχείς (68).

Αποτελείται από 328 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 37730 Da. Η τριτοταγής δομή του δημιουργείται από μία και μόνο πεπτιδική αλυσίδα σχηματίζοντας επτά αλυσίδες. Υδροφοβικές αναλύσεις ανέδειξαν 7 υδρόφοβα πεπτιδικά τμήματα μαζί με ένα εξωκυττάριο αμινοτελικό άκρο ενώ είναι ο μόνος υποδοχέας της οικογένειας των GPCR ο οποίος δεν έχει ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο (68). Έχει αποδειχθεί ότι η φωσφορυλίωση αμινοξέων του καρβοξυτελικού άκρου επάγει την ενδοκύτωση του εκάστοτε υποδοχέα η

οποία διαδραματίζεται στα πρώτα λεπτά μετά την σύνδεση του αγωνιστή με τον υποδοχέα του, πράγμα που δεν συμβαίνει με τον υποδοχέα της GnRH ο οποίος εμφανίζει μικρή απευαισθητοποίηση και ενδοκύττωση μετά την πρόσδεση του αγωνιστή (68).

Διαθέτει τρία εξωκυτάρια και τρία ενδοκυτάρια τμήματα απαραίτητα για την άσκηση της δράσης του. Η ανάλυση μεταλλαξιογένεσης ανέδειξε περιοχές στον υποδοχέα στην δεύτερη και τρίτη ενδοκυτάρια αγκύλη που είναι σημαντικές για την πρόσδεση και δράση των G πρωτεϊνών, την ενδοκύττωση του υποδοχέα, την πρόσδεση του αγωνιστή και την έκφραση του υποδοχέα (68). Αμινοξέα που έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικά για την δράση του υποδοχέα είναι τα εξής: Το αμινοξύ Ala (261) στην τρίτη ενδοκυτάρια αγκύλη παίζει σημαντικότερο ρόλο στην πρόσδεση των G πρωτεϊνών και στην ενδοκύττωση του υποδοχέα (69). Τα αμινοξέα Asp (98), Trp (101), Asn (102), Lys (121), Asn (212), Asp (302) είναι απαραίτητα για την πρόσδεση του αγωνιστή, ενώ η Lys (191) φαίνεται ότι είναι σημαντική για την έκφραση και ενδοκύττωση του υποδοχέα (70).

Μετάδοση του σήματος (Εικόνα 8):

Είναι γνωστό ότι τα μέλη της GPCR οικογένειας μεταδίδουν το σήμα αρχικά μέσω πρωτεϊνών οι οποίες προσδένουν GTP (G-proteins) και έχουν το χαρακτηριστικό ότι είναι ετεροτριμερείς και αποτελούνται από μια α-υποομάδα (Gα) η οποία προσδένεται με νουκλεοτίδια γουανίνης και ένα διμερές το οποίο αποτελείται από τις υπο-ομάδες β και γ (Gβγ). Όταν προσδεθεί ο αγωνιστής και συγκεκριμένα η GnRH στον υποδοχέα, η Gα υπο-ομάδα

αποσυνδέεται από το Gβγ διμερές και δημιουργεί ενεργό σύμπλοκο με την GTP με το οποίο ασκεί την δράση του. Το υπόλοιπο διμερές παραμένει προσκολλημένο στην κυτταρική μεμβράνη και ασκεί παράλληλη δράση ενεργοποιώντας αλλά μονοπάτια μετάδοσης του σήματος (68, 71).

Φαίνεται ότι ο υποδοχέας της GnRH ασκεί την δράση του μέσω της οικογένειας Gq/11 των G πρωτεϊνών (71). Αυτές στη συνέχεια ενεργοποιούν την φωσφολιπάση C και πιο συγκεκριμένα την PLCβ1 η οποία προκαλεί την συρροή της 1,4,5- τριφωσφοινοσιτόλης (IP3), την παραγωγή διακυλογλυκερόλης (DAG) και ενεργοποίηση διάφορων υποτύπων της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Στα υποφυσιακά κύτταρα έχει βρεθεί ότι εκφράζεται κυρίως η κινάση PKCδ και PKCε μαζί με άλλους μη τυπικούς υποτύπους της πρωτεϊνικής κινάσης C οι οποίοι ενεργοποιούνται ανεξάρτητα του DAG και του Ca ++ (71).

Ca++ και η μετάδοση του σήματος (71): Το ασβέστιο είναι ενδοκυττάριος μεταδότης ο οποίος είναι απαραίτητος σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες μέσα στο κύτταρο. Έχει διαπιστωθεί ότι για την μετάδοση του σήματος μετά από την διέγερση με GnRH, το ασβέστιο παίζει πρωταρχικό ρόλο. Έκθεση υποφυσιακών κυττάρων με το ιονοφόρο ασβεστίου, ionomycin, ανέδειξε μεγαλύτερη ενεργοποίηση της έκκρισης γοναδοτροφινών. Η GnRH προκαλεί την άμεση κινητοποίηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου με την δράση της τριφωσφοινοσιτόλης στις αποθήκες ασβεστίου και παράλληλα την είσοδο ασβεστίου από τον εξωκυττάριο χώρο μέσω voltage-gated calcium διαύλους. Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι το ενδοκυττάριο ασβέστιο είναι αυτό το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην έκκριση το γοναδοτροφινών από το κύτταρο ενώ και τα δυο βοηθούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAPK κινασών

και ιδιαίτερα αυτού της ERK. Πράγματι όταν αφαιρείται το ασβέστιο από το κύτταρο παρατηρείται μεγάλη μείωση της ενεργοποίησης του ERK από την GnRH ενώ πρόσφατα έχει βρεθεί σε αT3-1 και υποφυσιικά κύτταρα ότι η αναστολή της εισόδου ασβεστίου από τους δίαυλους του προκαλεί το ίδιο αποτέλεσμα. Ένα άλλο μέρος του μονοπατιού το οποίο έχει παρατηρηθεί είναι η αλληλοσύνδεση του ασβεστίου με την πρωτεϊνική κινάση C και πιο συγκεκριμένα ότι το Ca^{++} αλληλεπιδρά με τα ισοένζυμα της PKC και ενεργοποιεί το μονοπάτι της ERK.

Μονοπάτια των MAPK και GnRH (72):

Τα βασικά μονοπάτια των MAP κινασών είναι τέσσερα από τα οποία αυτό της ERK κινάσης είναι η βασική οδός μετάδοσης του σήματος της GnRH στον πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα έχει ανευρεθεί ότι η ERK1 και η ERK2 ενεργοποιούνται σε σημαντικό βαθμό μετά από χορήγηση GnRH σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα της GnRH. Συνεχής χορήγηση GnRH προκαλεί ενεργοποίηση της ERK για δύο ώρες περίπου, ενώ η κατά ώσεις χορήγησή της προκαλεί ενεργοποίηση της ERK πάνω από 8 ώρες.

Η μετάδοση του σήματος από τον υποδοχέα προς την ERK γίνεται μέσω ενός PTK/RAS ανεξάρτητου μηχανισμού κατά τον οποίο η Raf πρωτεΐνη ενεργοποιείται κατευθείαν από την PKC παρακάμπτοντας την RAS. Οι πιθανότεροι πρωταγωνιστές αυτού του μονοπατιού από την μεμβράνη μέχρι τον πυρήνα είναι οι Gq, PLCβ, PKC, RAF1, MEK και τέλος η ERK, η οποία όπως φαίνεται μετά από 20 λεπτά από την ενεργοποίηση της, εισέρχεται στον πυρήνα και ρυθμίζει την βασική μεταγραφική έκφραση των υπομονάδων των γοναδοτροφινών. Πιο συγκεκριμένα της α-υπομονάδος και της FSH-β, ενώ η έκφραση της LH-β έχει βρεθεί ότι δεν ελέγχεται από την ERK.

Μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα της GnRH

Οι μεταλλάξεις ευρίσκονται σε διπλή ετεροζυγωτία ή ομοζυγωτία και το νόσημα κληρονομείται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Η γονιδιακή μελέτη αυτών των ασθενών ανέδειξε στην πλειοψηφία τους διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις σε κάθε αλληλόμορφο (22), εκτός δυο ασθενών όπου η μετάλλαξη ήταν η ίδια και στα δύο αλληλόμορφα (7, 74). Τέτοιου τύπου μεταλλάξεις απαντώνται σε μικρό αριθμό ασθενών με ΙΥΥ (2-15%) (Εικόνα 9) (22). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότεροι ασθενείς με αυτές τις μεταλλάξεις εμφανίζουν μερική ή ολική αντίσταση στην εξωγενή χορήγηση GnRH και ένα ευρύ φάσμα κλινικών φαινοτύπων (75).

Οι μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα είναι οι εξής (Πίνακας 3) :

1. Οι πρώτες που βρέθηκαν ήταν σε μια οικογένεια από την ομάδα του de Roux και ήταν οι **Arg262Gln** η οποία αλλάζει την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C, **Gln106Arg** και **Ser217Arg** οι οποίες μειώνουν την πρόσδεση της GnRH στον υποδοχέα (21).
2. **Ala129Asp** + **Arg262Gln** προκαλούν πλήρη δυσλειτουργία του υποδοχέα με απουσία παραγωγής φωσφο-ινοσιτόλης (IP3) απαραίτητη για την μετάδοση του δευτερογενούς σήματος (75).
3. **Ser168Arg** είναι η πρώτη ομόζυγη μετάλλαξη η οποία έχει περιγράψει και προκαλεί πλήρη παύση της λειτουργίας του υποδοχέα.(74)
4. **Leu314X** (μερική αποκοπή του 7^{ου} διαμεμβρανικού τμήματος του υποδοχέα κάνοντας τον ανενεργό) (76).

5. **Thr32Ile, Cys200Tyr, Leu266Arg, Cys279Tyr** όλες δημιουργούν ανενεργούς υποδοχείς (22)
6. **Glu90Lys** είναι η δεύτερη ομόζυγη μετάλλαξη η οποία βρέθηκε από τους Soderlund et al (77)
7. **Tyr284Cys** από τους Layman et al (62)
8. **Gln106Arg** η οποία έχει περιγράψει σαν ετερόζυγη μετάλλαξη ενώ εδώ βρέθηκε να είναι ομόζυγη και προκάλεσε σύνδρομο του γόνιμου ευνούχου (74).
9. **Arg139His+Asn10Lys** οι οποίες προκαλούν παύση της λειτουργίας του υποδοχέα και αναστολή της πρόσδεσης της GnRH σε αυτόν και ανακοινώθηκαν από τους Costa et al (73)
10. **Ala171Thr** με απώλεια λειτουργικότητας του υποδοχέα από τους Karges et al (78).
11. **G to A** σημειακή μετάλλαξη στο ιντρόνιο 1 στη θέση επαφής με το εξόνιο 2 (Silveira et al 2002) η οποία προκαλεί μη λειτουργικό mRNA.

Οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν μεταλλάξεις με διπλή ετεροζυγωτία. Δυο από αυτές (Arg262Gln + Gln106Arg) μπορούν να θεωρηθούν ως οι πιο συχνές επειδή έχουν ανευρεθεί τέσσερις και έξι φορές αντίστοιχα, ενώ προκαλούν ήπια συμπτώματα και σημεία υπογοναδισμού. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ασθενείς με ομόζυγες μεταλλάξεις με βαρεία μορφή υπογοναδισμού, ενώ ασθενείς με τις ίδιες διπλά ετερόζυγες μεταλλάξεις, δυνατόν να εμφανίσουν διαφορετικό φαινότυπο και απάντηση στην εξωγενή χορήγηση της GnRH, ασχέτως φύλου (79).

Επίσης έχουν εντοπισθεί και σειρά φυσικών πολυμορφισμών οι οποίοι παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Άλλα ενεχόμενα γονίδια

Πρόσφατα, ένα νέο γονίδιο εντοπίστηκε, υπεύθυνο επίσης για μια μορφή της νόσου κληρονομούμενης με σωματική υπολειπόμενη μετάδοση. Το ενεχόμενο γονίδιο εντοπίστηκε στη θέση 19p13.3 του χρωμοσώματος 19 (11) (Εικόνα 10). Πρόκειται για το γονίδιο GPR54 (G protein-coupled receptor gene). Οι ασθενείς παρουσιάζουν διαταραχή της ενδογενούς έκκρισης της GnRH και καθυστερημένη απάντηση στην εξωγενή χορήγηση GnRH (12,13). Μεταλλάξεις του γονιδίου GPR54 έχουν εντοπιστεί σε πολύ μικρό ποσοστό ασθενών με σποραδικό ΙΥΥ (1-2%).

Θεραπεία της ανεπάρκειας του GnRH .

Η θεραπεία της **ανεπάρκειας του GnRH** στοχεύει στην αποκατάσταση και των 3 βασικών δυσλειτουργιών της νόσου, δηλαδή της ανεπάρκειας ενήβωσης, του υπογοναδισμού και της υπογονιμότητας.

Θεραπεία πρόκλησης εφηβείας.

Αν και διάφορες δοκιμασίες έχουν προταθεί με στόχο την έγκαιρη διαφορική διάγνωση του υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού (ΥΥ) από την απλή καθυστέρηση της εφηβείας, ασφαλής διαφοροδιάγνωση δεν είναι ακόμα εφικτή. Για το λόγο αυτό η προσπάθεια θεραπευτικής πρόκλησης εφηβείας

πρέπει να αρχίζει και για τα δύο φύλα μετά το 16 έτος της ηλικίας (80). Η πιθανότητα θεραπείας μιας απλής καθυστέρησης της εφηβείας ως ΥΥ δεν μπορεί να αποκλειστεί, αλλά δεν συνιστά θεραπευτικό σφάλμα, καθώς η θεραπεία μπορεί να πυροδοτήσει την έναρξη καθυστερημένης πλην όμως φυσιολογικής εφηβείας. Αντιθέτως, η μη θεραπεία ενός ΥΥ εν αναμονή ασφαλέστερης διαφοροδιάγνωσης επιβαρύνει σημαντικά τη ψυχική φόρτιση ενός ατόμου χωρίς σημεία ενήβωσης καθ'όν χρόνο η εφηβεία έχει σχεδόν πλήρως ολοκληρωθεί σε όλα τα άτομα ίδιας ηλικίας.

Η φυσιολογική ενήβωση προκαλείται από τη δράση των στεροειδών του φύλου (Οιστραδιόλης στα κορίτσια και Τεστοστερόνης στα αγόρια). Η θεραπευτική πρόκληση εφηβείας στον ΥΥ μπορεί να συντελεστεί ή με εξωγενή χορήγηση των ελλειπόντων στεροειδών, ή με διέγερση των γονάδων για παραγωγή ενδογενών στεροειδών του φύλου. Στο παρελθόν, η πρώτη μορφή θεραπείας αποτελούσε τη μοναδική δυνατότητα παρέμβασης και τη συχνότερα επιλεγόμενη μορφή θεραπείας και για τα δύο φύλα. Συνίσταται στη κατά αυξανόμενες δόσεις χορήγηση στεροειδών του φύλου στη προσπάθεια απομίμησης της φυσιολογικής έκκρισης των στεροειδών κατά την εφηβεία.

Στα κορίτσια χορηγείται Εθινύλ Οιστραδιόλη ή συνεζευγμένα Οιστρογόνα με σταδιακή αύξηση των δόσεων ανά τρίμηνο-εξάμηνο. Κλινικά η πρόοδος της εφηβείας εκτιμάται από την ανάπτυξη του μαζικού αδένα, καθώς η ανάπτυξη τρίχωσης στο εφηβαίο εξαρτάται κυρίως από τα επινεφριδικά ανδρογόνα και στα άτομα με ΥΥ είναι φυσιολογική. Όταν επιτευχθεί ανάπτυξη μαζικού αδένα σταδίου IV κατά Tanner, τότε προστίθεται Προγεστερόνη για τη πρόκληση εμμηναρχής. Η συνολική διάρκεια θεραπείας κυμαίνεται μεταξύ 1.5-2 χρόνια αναλόγως της ηλικίας έναρξης και της ψυχικής επιβάρυνσης της ασθενούς.

Στα αγόρια χορηγείται Τεστοστερόνη με αντίστοιχη σταδιακή αύξηση των δόσεων. Η θεραπεία με Τεστοστερόνη εξασφαλίζει ικανοποιητική αύξηση του μεγέθους του πέους και ολοκλήρωση της ανάπτυξης των δευτερογενών χαρακτήρων του φύλου σε βάθος χρόνου το οποίο κυμαίνεται από 2-4 χρόνια. Η εξωγενής χορήγηση Τεστοστερόνης όμως διατηρεί το μέγεθος των όρχεων σε προεφηβικό επίπεδο (όγκος < 5 ml στο πλήρες σύνδρομο). Οι μικροί όρχεις δεν επιβαρύνουν μόνο ψυχικά τον ασθενή αλλά νεώτερες μελέτες υποστηρίζουν ότι μειώνουν το προσδόκιμο επίτευξης γονιμότητας στο μέλλον. Για το λόγο αυτό η θεραπεία με Τεστοστερόνη σταδιακά εγκαταλείπεται υπέρ της θεραπείας διέγερσης του άξονα ΥΥΓ για παραγωγή ενδογενών στεροειδών του φύλου.

Η διέγερσης του άξονα ΥΥΓ μπορεί να επιτευχθεί τόσο με κατά ώσεις χορήγηση GnRH μέσω ειδικής αντλίας έγχυσης, όσο και με ενδομυϊκή χορήγηση χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG)(80-80).

Οι δόσεις χορήγησης της GnRH ρυθμίζονται μέσω της ειδικής αντλίας χορήγησης και εξατομικεύονται. Αρχικά οι δόσεις είναι 50-100 ng/kg/2h αυξανόμενες σε 150-300 ng/kg/2h.

Η ενδομυϊκή χορήγηση hCG αρχίζει με δόσεις 500IU/τρεις εβδομαδιαίως, σταδιακά αυξανόμενες έως και σε 2500IU τρις εβδομαδιαίως.

Και με τις δύο θεραπείες επιτυγχάνεται όχι μόνο ανάπτυξη του πέους και των δευτερογενών χαρακτήρων του φύλου αλλά και ικανοποιητική αύξηση του μεγέθους των όρχεων σε όγκο>12 ml σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις στις οποίες δεν συνυπάρχει και ορχική βλάβη. Αν και ο ορχικός όγκος θα υποχωρήσει με την αλλαγή της θεραπείας σε χορήγηση Τεστοστερόνης, σχεδόν ποτέ δεν επανέρχεται στον αρχικό όγκο προ αγωγής. Σειρά μελετών

υποδεικνύει ότι ο κερδηθείς ορχικός όγκος είναι σημαντικός για τη μελλοντική επίτευξη γονιμότητας.

Καμία εκ των δύο μεθόδων δεν φαίνεται να πλεονεκτεί της άλλης ούτε όσον αφορά το τελικό μέγεθος των όρχεων ούτε όσον αφορά τη διάρκεια της αγωγής. Ως εκ τούτου η θεραπεία με hCG, σημαντικά ευκολότερη, προκρίνεται ως θεραπεία εκλογής, εκτός εάν το θεραπευτικό κέντρο έχει ειδική εμπειρία στη κατά ώσεις χορήγηση GnRH.

Τέλος, υπάρχει μία κατηγορία ασθενών στην οποία η κατά ώσεις χορήγηση GnRH είναι αναποτελεσματική. Πρόκειται για σπάνια περιστατικά ασθενών με μεταλλάξεις είτε στο γονίδιο του υποδοχέα της GnRH είτε σε άλλα γονίδια τα οποία επηρεάζουν τη πρόσδεση της GnRH στον υποδοχέα της ή την ενδοκυττάρια μεταφορά του μηνύματος (post GnRH receptor defect). Στις περιπτώσεις αυτές η εξωγενής χορήγηση GnRH είναι αναποτελεσματική ανεξαρτήτως της δόσης χορήγησης (83). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περιπτώσεις αυτές δεν αφορούν το σύνολο των ασθενών με μεταλλάξεις στον υποδοχέα της GnRH, αλλά μόνο εκείνους με τη πλήρη έκφραση του συνδρόμου.

Παραθέτουμε παράδειγμα αδυναμίας πρόκλησης εφηβείας από την εμπειρία του Τμήματος μας σε ασθενή με ΙΥΥ με κατά ώσεις χορήγηση GnRH (Πίνακας 5).

Θεραπεία του υπογοναδισμού.

Η θεραπεία του υπογοναδισμού καθ'όλη τη διάρκεια της ενηλίκου ζωής είναι σχετικά απλή και συνίσταται στην υποκατάσταση των στεροειδών του φύλου.

Υποκατάσταση στεροειδών του φύλου στις γυναίκες

Η πρωταρχική αλλά και η πιο πρακτική εκλογή θεραπείας σε μια γυναίκα όταν δεν επιθυμείται επίτευξη εγκυμοσύνης, είναι η υποκατάσταση με οιστρογόνα και προγεστερόνη. Χορηγείται ορμονική υποκατάσταση με εθινύλ οιστραδιόλη ή συνεζευγμένα οιστρογόνα με τη προσθήκη προγεστερινοειδούς στη β' φάση του κύκλου για επίτευξη σταθερής εμμήνου ρύσης. Χορηγείται δηλαδή από την 1^η έως την 28^η ημέρα του κύκλου οιστρογόνο ενώ η προγεστερόνη (π.χ μεθοξυπρογεστερόνη) από την 15^η έως και την 28^η για να εξασφαλισθεί φυσιολογική έμμηνος ρύση, να αποφευχθεί η υπερπλασία του ενδομήτριου και να περιοριστεί ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου της μήτρας. Καλόν θα είναι το χορηγούμενο προγεστερινοειδές να έχει ήπια ανδρογονική δράση (19-νορ-παράγωγα της τεστοστερόνης) γεγονός που θα υποβοηθήσει την επίτευξη οργασμού κατά την ερωτική επαφή της υπό θεραπεία ασθενούς. Η οδός χορήγησης της οιστραδιόλης είναι είτε σε μορφή δισκίων από του στόματος (per os) είτε με διαδερμικά αυτοκόλλητα με την ίδια θεραπευτική αποτελεσματικότητα.

Υποκατάσταση στεροειδών του φύλου στους άνδρες

Στους άνδρες χορηγείται τεστοστερόνη. Υπάρχουν σκευάσματα για ενδομυϊκή χορήγηση μακράς διάρκειας (Testosterone Enanthate-Depot), για χορήγηση από του στόματος (Testosterone Undecanoate, Mesterolone) καθώς και για διαδερμική χορήγηση (Andropatch) (84).

Ενδομυϊκή χορήγηση: Ο καλύτερος τρόπος επίτευξης του επιθυμητού αποτελέσματος είναι η σταδιακή και σταθερή αύξηση των δόσεων λόγω των δραματικών αλλαγών που επιφέρει η ξαφνική έκθεση του οργανισμού στην τεστοστερόνη. Αρχικά χορηγείται δόση 25 mg testosterone enanthate η

cypionate κάθε δυο εβδομάδες για 6-8 εβδομάδες, μετά 50 mg για το ίδιο χρονικό διάστημα . Ακολουθεί αύξηση της δόσης σε 100mg κάθε δυο εβδομάδες με τελική δοσολογία τα 200 mg κάθε 2-3 εβδομάδες.

Η τελική δόση πρέπει να υπολογίζεται έτσι ώστε να ευρίσκεται συγκέντρωση τεστοστερόνης στο αίμα μεταξύ 250-300 ng /dl (8,7-10,4 nmol/L) όταν χορηγείται η επόμενη δόση ενώ στο μεσοδιάστημα να ανέρχεται στα 600-700 ng/dl (20,8-24,3 nmol/L).

Διαδερμική χορήγηση: Η τεστοστερόνη μπορεί να χορηγηθεί διαδερμικά σε δυο σημεία του σώματος, τους όρχεις και τον κορμό. Κάθε αυτοκόλλητο προσφέρει στον οργανισμό 5 mg τεστοστερόνης την ημέρα, ποσότητα η οποία είναι ικανή να διατηρεί συγκεντρώσεις στα φυσιολογικά όρια ενός ενήλικα άνδρα.

Τα τελευταία δεν κυκλοφορούν στη χώρα μας και πρέπει να παραγγέλλονται στο εξωτερικό. Παλαιότερα ετοποθετούντο αποκλειστικά στο όσχεο με αποτέλεσμα σημαντική ψυχολογική επιβάρυνση του ασθενούς. Τώρα, τα διαδερμικά ένθετα νέας τεχνολογίας τοποθετούνται σε οποιοδήποτε σημείο του δέρματος, κατά προτίμηση στη κοιλιακή χώρα, αλλάζονται κάθε ημέρα, και δεν προκαλούν δερματικά εξανθήματα. Αναμένεται η κυκλοφορία στη χώρα μας, λίαν συντόμως, τεστοστερόνης σε κρέμα (gel) ημερησίας απελευθέρωσης. Εφόσον αποδειχθεί σταθερή η βιοδιαθεσιμότητα της απελευθερούμενης ορμόνης, το gel τεστοστερόνης αναμένεται να βοηθήσει σημαντικά τη καθημερινή ζωή των ασθενών.

Σημαντική σε όλη την διάρκεια της θεραπείας είναι η ψυχολογική υποστήριξη του ασθενούς λόγω των δραματικών ψυχοσωματικών αλλαγών που επιφέρει.

Θεραπεία της υπογονιμότητας.

Οποιαδήποτε μορφή υπογονιμότητας οφείλεται σε ελαττωματική έκκριση της GnRH μπορεί να αποκατασταθεί είτε με κατά ώσεις χορήγηση GnRH μέσω ειδικής αντλίας έγχυσης, είτε με ενδομυϊκή χορήγηση συνδυασμού γοναδοτροφινών.

Θεραπεία υπογονιμότητας στους άνδρες

Υποκατάσταση με κατά ώσεις χορήγηση της GnRH

Η θεραπεία υποκατάστασης με GnRH φαίνεται να πλεονεκτεί θεωρητικά καθώς υποκαθίσταται ο υπαίτιος παράγων, και οι γονάδες διεγείρονται μέσω της φυσιολογικής έκκρισης ενδογενών γοναδοτροφινών.

Η κατά ώσεις χορήγηση GnRH μέσω ειδικής αντλίας έγχυσης έχει δοκιμαστεί για τη θεραπεία της υπογονιμότητας και στα δύο φύλα με ιδιαιτέρως ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Στους άνδρες προτιμάται η υποδόρια έγχυση καθώς το μάκρος της θεραπείας είναι μεγάλο (6-24 μήνες) ενώ στις γυναίκες ενδείκνυται τόσο η υποδόρια όσο και η ενδοφλέβια χορήγηση. Οι δόσεις ποικίλουν από 50-300ng/kg/2h. Κριτήριο αποτελεσματικής δοσολογίας αποτελούν τα επίπεδα τεστοστερόνης και ελεύθερης τεστοστερόνης στον ορό τα οποία πρέπει να διατηρούνται εντός των φυσιολογικών ορίων χωρίς αύξηση των επιπέδων οιστραδιόλης προς αποφυγή της γυναικομαστίας (80). Το ποσοστό επιτυχίας της θεραπείας είναι 85-95%.

Βασική προϋπόθεση για την θεραπεία είναι ο ασθενής να μην εμφανίζει αντίσταση στην δράση της GnRH.

Αυξάνει περισσότερο των όγκο των όρχεων από τις γοναδοτροφίνες (καλύτερο ψυχολογικό αποτέλεσμα). Αν υπάρχει ιστορικό κρυπορχίας απαιτείται μεγαλύτερη διάρκεια θεραπείας

Σε μελέτη όπου χορηγήθηκε μακροχρόνια GnRH κατά ώσεις (79) η αγωγή οδήγησε στην φυσιολογική παραγωγή σπέρματος και ανδρογόνων ενώ ομαλοποίησε περισσότερο την λειτουργία των Leyding κυττάρων παρά των κυττάρων Sertoli.

Παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν την φυσιολογική ανάπτυξη των όρχεων και της σπερματογένεσης είναι το ιστορικό της σεξουαλικής ανάπτυξης του ασθενούς , η ινχιμπίνη >60 pg/ml και η απουσία κρυπορχίας.

Υποκατάσταση με γοναδοτροφίνες

Από μόνη της η θεραπεία με τεστοστερόνη δεν μπορεί να αποκαταστήσει την σπερματογένεση σε άνδρες με ανεπάρκεια της GnRH. Είναι αναγκαία η συνχορήγηση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG) και ανασυνδυασμένης FSH με σκοπό να επιφέρει ταυτόχρονη αύξηση της στεροειδογένεσης από τα κύτταρα Leyding και σπερματογένεσης αντίστοιχα.

Η δόση της hCG είναι αρχικά 1500 με 2000 IU ενδομυϊκά τρεις φορές την εβδομάδα. Όταν η συγκέντρωση της τεστοστερόνης στο αίμα φτάσει μεταξύ 300-1000 ng/dl τότε η δόση μπορεί να μειωθεί τόσο ώστε η συγκέντρωσή της στον ορό να κυμαίνεται μεταξύ 300-500 ng/dl. Συγκεντρώσεις μεγαλύτερες μπορεί να επιφέρουν αύξηση των κυκλοφορούντων οιστρογόνων με συνέπεια την ανάπτυξη γυναικομαστίας .

Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων θα πρέπει να μετράται κάθε 2-4 εβδομάδες. Στόχος είναι ο ασθενής να φτάσει σε φυσιολογικό αριθμό ζώντων και κινητών σπερματοζωαρίων (πάνω από 20×10^6 /εκσπερμάτωση). Οι

περισσότεροι ασθενείς πλησιάζουν το επιθυμητό αποτέλεσμα μετά 6 μήνες ενώ ορισμένοι ασθενείς χρειάζονται θεραπεία 12-24 μήνες ή και περισσότερο. Στην περίπτωση που δεν επιτευχθεί ο ικανός αριθμός σπερματοζωαρίων συνχορηγείται ανασυνδυασμένη FSH. Είναι συνήθως απαραίτητη σε ασθενείς οι οποίοι παρουσιάζουν μικρό όγκο όρχεων (1 έως 5 ml) πράγμα σύνηθες σε αυτές τις ομάδες ασθενών λόγω ανωριμότητας του ορχικού ιστού. Η επαρκής δόση FSH είναι 38 IU καθημερινά για 6-8 εβδομάδες και μετά 100mg κάθε 2 εβδομάδες με τελική δοσολογία τα 200 mg κάθε 2-3 εβδομάδες. Η δόση θα πρέπει να υπολογίζεται έτσι ώστε στην επόμενη δόση η συγκέντρωση της τεστοστερόνης να είναι μεταξύ 250-350 ng/dl (8,7-10,4 nmol/L) και στο μεσοδιάστημα δυο δόσεων να ανέρχεται στα 600-700 ng/dl (20,8-24,3/L).

Και με τα δύο θεραπευτικά σχήματα τα ποσοστά αποτελεσματικότητας εντυπωσιακά υπερβαίνουν το 90-95%. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό είναι συνήθως γόνιμοι με μικρότερο αριθμό άρτιων σπερματοζωαρίων από ότι οι ασθενείς με ιδιοπαθή oligo-ασθενοσπερμία.

Παραθέτουμε παράδειγμα πρόκλησης σπερματογένεσης από την εμπειρία του Τμήματος μας σε ασθενή με σύνδρομο Kallmann τόσο με κατά ώσεις χορήγηση GnRH όσο και με γοναδοτροφίνες (Πίνακας 6). Η θεραπεία με αντλία GnRH είχε καλύτερα αποτελέσματα, με μεγαλύτερη παραγωγή σπέρματος σε μικρότερο χρονικό διάστημα αγωγής συγκριτικά με τη θεραπεία με γοναδοτροφίνες.

Θεραπεία υπογονιμότητας στις γυναίκες

Υποκατάσταση με κατά ώσεις χορήγηση της GnRH

Στις γυναίκες η GnRH μπορεί να χορηγηθεί τόσο ενδοφλεβίως όσον και υποδορίως (87-89) (Εικόνα 11). Η ενδοφλέβια χορήγηση απαιτεί μικρότερες δόσεις είναι όμως δύσχρηστη και γι'αυτό επιλέγεται συνήθως μόνο στα δύσκολα περιστατικά τα οποία απαιτούν μεγάλες δόσεις και στενό έλεγχο (89). Οι ώσεις είναι ανά 90 λεπτά στη φάση διέγερσης των ωοθηκών, αυξάνουν σε ανά 60 λεπτά με στόχο τη πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας (όπου πολλές φορές απαιτείται η συγχορήγηση hCG 10.000IU) και μειώνονται σε ανά 2-4 ώρες ακολούθως για την υποβοήθηση της ωχρινοποίησης (90,91).

Υποκατάσταση με γοναδοτροφίνες

Η θεραπεία με γοναδοτροφίνες ακολουθεί τα κλασικά σχήματα πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας με χορήγηση συνδυασμού LH και FSH (150IU/ημερησίως) ενώ δεν απαιτείται η καταστολή της ενδογενούς έκκρισης με συγχορήγηση GnRH αγωνιστή ή ανταγωνιστή λόγω της ανεπάρκειας των γοναδοτροφινών.

Τα ποσοστά επιτυχίας όσον αφορά τη πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας και με τις δύο μεθόδους αγγίζουν το 97-99%, ενώ κύηση κατά μέσο όρο επιτυγχάνεται μετά 3-4 κύκλους θεραπείας. Η χορήγηση και των δυο πρέπει να γίνεται σταδιακά

Απαιτείται συχνή παρακολούθηση των ωοθηκών και της μήτρας με U/S και μέτρηση των επιπέδων της οιστραδιόλης

Οι επιπλοκές είναι σπάνιες, κυρίως ασκήτης-πλευριτικό υγρό –DIC επί συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών,

Παραθέτουμε παράδειγμα πρόκλησης ωοθυλακιωρρηξίας από την εμπειρία του Τμήματος μας σε ασθενή με υποθαλαμική αμηνόρροια τόσο με κατά ώσεις χορήγηση GnRH όσο και με γοναδοτροφίνες (Πίνακας 7). Η θεραπεία με κατά ώσεις χορήγηση GnRH επέτυχε μεγαλύτερο πάχος ενδομητρίου σε συντομότερο χρονικό διάστημα αγωγής.

Θεραπεία με υποκατάσταση γοναδοτροφινών η GnRH σε γυναίκες

- Έχει το ίδιο ποσοστό επίτευξης ωορρηξίας (95%)
- Απαραίτητο πριν την θεραπεία η διερεύνηση της βατότητας των σαλπίγγων της γυναίκας και η γονιμότητα του συντρόφου.
- Απαραίτητη η χορήγηση FSH + LH

Μελέτες από διάφορα κέντρα προσπαθούν να συγκρίνουν τα αποτελέσματα της θεραπείας με GnRH και με γοναδοτροφίνες. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών αν και ενδεικτικά, αδυνατούν να προκρίνουν σαφώς μία εκ των θεραπειών ως την πλέον ενδεδειγμένη λόγω αφενός του μικρού αριθμού των περιστατικών και αφετέρου της διαφορετικής εξοικείωσης των διαφόρων κέντρων με τις υπό μελέτη θεραπείες (92-101).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Στους άνδρες (92-96):

- Μέγεθος όρχεων προ θεραπείας.
- Ιστορικό κρυπορχίας.
- Κιρσοκήλη.
- Βαθμός έκπτωσης υποθαλαμικής λειτουργίας.

Στις γυναίκες (97,101):

- Ηλικία.
- Σωματικό βάρος.

- Συνύπαρξη υπερπρολακτιναιμίας.
- Συνύπαρξη υπερανδρογοναιμίας.
- Βαθμός έκπτωσης υποθαλαμικής λειτουργίας.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ ΚΑΙ GnRH (92-102)

- Καμία μέθοδος δεν φαίνεται να πλεονεκτεί σαφώς.
- Και οι 2 θεραπείες έχουν συγκρίσιμο κόστος(102).
- Η θεραπεία με GnRH είναι η πλησιέστερη στη φυσιολογική λειτουργία του άξονα Υ-Υ-Γ μορφή θεραπείας.
- Η θεραπεία με GnRH προκαλεί στους άνδρες σημαντικότερη αύξηση του μεγέθους των όρχεων με μικρότερα επίπεδα τεστοστερόνης(92,96).
- Η θεραπεία με GnRH προκαλεί στους άνδρες μικρότερη αύξηση οιστραδιόλης και συνακόλουθα μικρότερο κίνδυνο γυναικομαστίας(92,96).
- Η θεραπεία με GnRH δεν προκαλεί δημιουργία αντισωμάτων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς με υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, κυρίως οι άρρενες, είναι ασθενείς με σημαντική ψυχική επιβάρυνση, απαιτούν αφοσίωση του θεράποντος ιατρού, αφιέρωση αρκετού χρόνου κατά τη διάρκεια των επισκέψεων στη συζήτηση όλων των παραμέτρων τόσο της νόσου όσο και της προτεινόμενης και ακολουθούμενης θεραπείας, και τέλος, αν τούτο κριθεί απαραίτητο, κατάλληλη ψυχιατρική υποστήριξη (103).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της μελέτης

Η ανεπάρκεια GnRH, αν και σπάνια νόσος, αποτελεί οντότητα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος – τόσο κλινικού όσο και ερευνητικού – στον τομέα της αναπαραγωγικής ενδοκρινολογίας. Η νόσος αποτελεί πρότυπο μελέτης των γενετικών και βιολογικών μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη του αναπαραγωγικού άξονα στον άνθρωπο. Σε κλινικό επίπεδο, εξάλλου, η έγκαιρη διάγνωση και εφαρμογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής μπορεί να οδηγήσει σε φυσιολογική σεξουαλική ωρίμανση και αποκατάσταση της γονιμότητας στους πάσχοντες.

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση ύπαρξης μεταλλάξεων στα γονίδια KAL, GnRH, υποκινητή της GnRH, υποδοχέα της GnRH, και υποκινητή του υποδοχέα της GnRH, σε ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH, με στόχο την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη συχνότητα των διαφόρων μορφών μετάδοσης της νόσου στον ελληνικό χώρο, καθώς και η συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου των ασθενών και ειδικών κλινικών φαινοτύπων. Στον σχετικά ομοιογενή ελληνικό πληθυσμό, ο εντοπισμός συγκεκριμένων μεταλλάξεων και πιθανώς «θερμών σημείων» εντός του γονιδίου θα μπορούσε να συμβάλλει στην ταχεία και ασφαλή διάγνωση της νόσου – τόσο στις σποραδικές όσο και στις οικογενείς περιπτώσεις – καθιστώντας δυνατή και την προσυμπτωματική διάγνωση στα υπόλοιπα μέλη στις οικογένειες των πασχόντων. Το θέμα, εξάλλου, της προγεννητικής διάγνωσης του συνδρόμου Kallmann αποκτά σήμερα νέες διαστάσεις υπό το πρίσμα της δυνατότητας αποκατάστασης της αναπαραγωγικής λειτουργίας και της τεκνοποίησης των ασθενών, με την εφαρμογή κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής.

Αν και το γονίδιο KAL έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη ψυχοπαθολογικών εκδηλώσεων, με κύριο εκπρόσωπο τη σχιζοφρένεια, οι εκδηλώσεις από τη ψυχική σφαίρα ασθενών με σύνδρομο Kallmann δεν έχουν μελετηθεί. Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι να περιγράψει αυτές τις διαταραχές και να τις συσχετίσει με το γονότυπο των ασθενών.

Οι ασθενείς με ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό παρουσιάζουν σπανίως μερική ή ολική αντίσταση στη δράση της GnRH. Αν και τέτοιοι ασθενείς αποτελούν θεωρητικά πρότυπα διαταραχής στη μετάδοση του σήματος της GnRH, δεν έχουν επαρκώς μελετηθεί. Ο εντοπισμός τέτοιων ασθενών και η συσχέτιση του γονότυπου τους θα προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες στη κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της νόσου.

Ασθενείς

Μελετήθηκαν συνολικά τριάντα οκτώ (38) ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH, δώδεκα (12) άρρενες με σύνδρομο Kallmann και είκοσι έξι (26) ασθενείς (13 άνδρες και 13 γυναίκες) με ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό (IYY). Σε κάθε ασθενή κατεγράφη το οικογενειακό δένδρο για τον καθορισμό του οικογενούς ή σποραδικού χαρακτήρα της νόσου. Η ανεπάρκεια χαρακτηρίσθηκε ως σποραδική, στις περιπτώσεις όπου η καταγραφή του οικογενειακού δένδρου δεν ανέδειξε παρουσία υπογοναδισμού ή καθυστερημένης ήβης σε οποιοδήποτε συγγενή. Από τους 38 ασθενείς, οι 32 ήταν σποραδικής μορφής και οι 6 οικογενούς (μία οικογένεια με δύο πάσχουσες αδελφές και ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό και δύο οικογένειες με φυλοσύνδετη μετάδοση της νόσου). Και οι 4 ασθενείς με φυλοσύνδετη μετάδοση παρουσίαζαν και ανοσμία (σύνδρομο Kallmann). Η φυλοσύνδετη μορφή κληρονομικότητας καθορίσθηκε βάσει των κάτωθι κριτηρίων:

- παρουσία ασυμπτωματικών θηλέων φορέων
- παρουσία και άλλου προσβεβλημένου άρρενος στην οικογένεια της μητέρας ή μεταξύ των αδελφών
- απουσία πασχόντων θηλέων
- απουσία μετάδοσης από άρρενα σε άρρενα

Οι ασθενείς προέρχονται από τα κέντρα τα οποία συμμετέχουν στην ομάδα μελέτης της ανεπάρκειας GnRH και έχουν επιλεγεί σύμφωνα με τα κοινώς αποδεκτά διαγνωστικά κριτήρια. Τα κριτήρια για τη διάγνωση της ανεπάρκειας GnRH παρατίθενται στο Πίνακα 1.

Κανένας ασθενής δεν παρουσίαζε άλλα κλινικά συμπτώματα (συγκινησία, κοιλοποδία κλπ), πλην του υπογοναδισμού και της ανοσμίας ούτε εκδηλώσεις συνδρόμων γειτονικών γονιδίων της περιοχής Χρ22.3, αν και η κλινική μελέτη των ασθενών δεν έχει ολοκληρωθεί.

Ο φάκελος κάθε ασθενούς καθώς και 10 – 20 ml ολικού αίματος απεστάλησαν από τα εκάστοτε διαγνωστικά κέντρα στο Ενδοκρινολογικό Τμήμα της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

Η μελέτη ενεγκρίθη από την Επιτροπή Δεοντολογίας, ενώ από κάθε ασθενή ελήφθη έγγραφη συγκατάθεση συμμετοχής μετά από σύντομη ενημέρωση σχετικά με τη φύση και τους στόχους του ερευνητικού προγράμματος.

Μέθοδοι προσδιορισμού γονιδιώματος

Η μεθοδολογία της εργαστηριακής έρευνας περιέλαβε τα εξής κύρια στάδια:

- Απομόνωση DNA γονιδιώματος από τους ασθενείς.
- Εκλεκτικό πολλαπλασιασμό της κωδικοποιούσης περιοχής των μελετώμενων γονιδίων και των υποκινητών με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR amplification).
- Προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA στα προϊόντα της PCR.

Απομόνωση DNA

Με τη συγκατάθεση όλων των ασθενών έγινε λήψη ολικού αίματος (10 με 20 ml) για απομόνωση DNA από τα εμπύρηννα κύτταρα του αίματος με τα ακόλουθα βήματα:

- Λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και συνεχείς πλύσεις για τη τελική απομόνωση των εμπύρηννων κυττάρων σε ίζημα.
- Απομόνωση των πυρήνων μετά από ήπια λύση των κυττάρων με απορρυπαντικό NP-40.
- Λύση των πυρήνων με κατιονικό απορρυπαντικό (SDS) και ολονύκτια επώαση με πρωτεϊνάση K στους 37°C.
- Απομάκρυνση των πρωτεϊνικών υπολειμμάτων με διάλυμα φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:24:1).
- Συγκέντρωση του DNA με προσθήκη άλατος (300mM) και 2.5V 100% αιθανόλης.

- Έκπλυση του DNA σε 70% αιθανόλη, τελική διάλυση σε δις-απεσταγμένο νερό (ddH₂O) και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του με μέτρηση της οπτικής απορρόφησής του

Υλικά

Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με απλή διάλυση του αντίστοιχου ποσού σε ddH₂O, ρύθμιση του PH με τη χρήση πυκνού HCL ή NaOH και αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

- Διάλυμα 1% Nonident - P40: διάλυση του NP-40 σε 1X RSB διάλυμα
- Διάλυμα 1X RSB: 10 mM NaCl
10 mM MgCl₂
- Διάλυμα 10% SDS : Διάλυμα 10% σε dd H₂O
- Διάλυμα φαινόλης : άχρωμοι κρύσταλλοι φαινόλης (Merck) ετάκησαν σε υδατόλουτρο στους 60°C και ακολούθως προσετέθη 8-υδροξυκινολίνη (Merck) σε τελική συγκέντρωση 0,1 % κ.ο. Η υγρή φαινόλη εξουδετερώθηκε σε δύο διαδοχικές εκχυλίσσεις σε διάλυμα 1 M Tris HCL pH 8.0 και άλλες τρεις εκχυλίσσεις σε διάλυμα 0,1M Tris HCL pH 8.0. Προσετέθη 250 ml διάλυμα 0,1M Tris HCL pH 8.0 και φυλάχτηκε σε σκοτεινή φιάλη στους 4°C.
- Διάλυμα χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης: Μίγμα χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης 24 : 1 κ.ο.
- Διάλυμα 70% ETOH : Μίγμα 70% κ.ο απόλυτης αιθανόλης σε ddH₂O.

Φωτομετρικός προσδιορισμός DNA

Η συγκέντρωση DNA στο διάλυμα προσδιορίστηκε με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των διαλυμάτων σε μήκος κύματος 260 nm. Στις OD 260 μετράται η οπτική πυκνότητα του καθαρού DNA και στις 280 του DNA με τις ιστόνες, λοιπές πρωτεΐνες και υπολείμματα φαινόλης του δείγματος. Μια μονάδα OD260 αντιστοιχεί σε 50μg/ml δίκλωνου DNA.

Ο βαθμός καθαρότητας του DNA προσδιορίστηκε από το λόγο OD 260nm /OD 280nm, του οποίου οι τιμές από 1,7 έως 1,9 υποδηλώνουν πρόσμιξη πρωτεΐνης ή φαινόλης, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1,9 πρόσμιξη με RNA.

Εκλεκτικός πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας του DNA (PCR amplification) όλων των προς προσδιορισμό γονιδίων

Για την εκλεκτική ενίσχυση, με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), καθενός εξονίου των γονιδίων GnRH του υποδοχέα της GnRH και των υποκινητών τους χρησιμοποιήθηκε 0.3-0.5μg DNA ως μήτρα, και ζεύγη ιντρονικών και μη εκκινητών (primers), τα οποία παρουσιάζονται στους Πίνακες 8 και 9. Το διάλυμα της αντίδρασης περιείχε εκτός του DNA (0.3-0.5μg), 10X διάλυμα επώασης (PCR buffer), ένα ζεύγος ειδικών εκκινητών (25 pmol/εκκινητή), 20 μM dNTPs (τελική συγκέντρωση), Taq DNA πολυμεράση (2,5U) και ddH₂O σε τελικό όγκο 50 μl. Οι αντιδράσεις έγιναν στον MJ Research PTC 200 θερμικό ανακυκλωτή με τις κάτωθι συνθήκες :

- Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, που χρησιμεύει ως «μήτρα» για τη σύνθεση νέων αλύσεων (denaturation) στους 94°C για 5min,
- αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, που χρησιμεύει ως «μήτρα» (denaturation) στους 94°C για 30 sec,
- πρόσδεση του ζεύγους των ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων στις απόλυτα συμπληρωματικές αλληλουχίες στο 3' άκρο της αλύσου-στόχου (annealing) από 55°C-62°C για 30- 45sec
- σύνθεση με τη βοήθεια του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση (extension) στους 72°C για 30sec-1min
- επανάληψη για 30 κύκλους και τέλος παράταση της επιμήκυνσης στους 72°C για 5 min.

Το προϊόν της PCR αντίδρασης ελέγχθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, απομονώθηκε και καθαρίστηκε σε στήλες με ειδικό kit καθαρισμού (Neukleospin Extract της Machery-Nagel).

Οι συνθήκες πρόσδεσης και το μέγεθος κάθε απομονωθέντος τμήματος παρουσιάζονται στους Πίνακες 8 και 9.

Υλικά

10X διάλυμα επώασης : 100mM Tris HCL pH 8.3

500mM KCL

20mM MgCL₂

0,1% κ.ο Gelatin

Διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) : 10mM διάλυμα d NTPs το καθένα

Taq πολυμεράση : 2,5 U/μg DNA

Διαδικασία

Για κάθε αντίδραση αναμίχθηκαν σε πάγο τα κάτωθι:

- 1-2μg DNA γονιδιώματος
- 5 μl 10X διάλυμα επώασης
- 25 pmol από κάθε εκκινητή
- 1 μl μίγματος dNTPs 10 mM το καθένα (τελική συγκέντρωση στην αντίδραση 200 μM ανά δεοξυνουκλεοτίδιο)
- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 μl
- Taq DNA πολυμεράση 2,5U/μg DNA

Έλεγχος προϊόντος

Το προϊόν της PCR αντίδρασης ελέγχεται σε μικρό πήκτωμα αγαρόζης 2%

Υλικά

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE: 40mM Tris- βορικό pH 8.0

2 mM EDTA

Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr): 10 mg/ml

Διάλυμα χρωστικής 10X : 0,25% κ.β κυανούν της βρωμοφαινόλης

0,25% κ.β κυανούν του ξυλολίου

25% κ.β φυκόλη

Διαδικασία

Η αγαρόζη διαλύεται σε διάλυμα 1X TBE με τελική συγκέντρωση 2%. Η διάλυση της αγαρόζης έγινε στους 100°C για 2min σε φούρνο μικροκυμάτων, ακολούθως προσετέθη διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 0,5

μg/ml στο πήκτωμα και η αγαρόζη στερεοποιήθηκε σε γυάλινη επιφάνεια συγκεκριμένων διαστάσεων.

Από την κάθε αντίδραση PCR τελικού όγκου 50 μl χρησιμοποιήθηκαν 5μl στα οποία προσετέθη διάλυμα χρωστικής (10X), το οποίο αφενός επιτρέπει την παρακολούθηση του μετώπου ηλεκτοφόρησης, αφετέρου αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων της PCR. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε σε οριζόντια συσκευή υπό σταθερή τάση 5V/cm μαζί με δύο δείγματα χωρίς DNA για κάθε ανεξάρτητη αντίδραση PCR (reagent control) και ένα δείκτη DNA γνωστών μεγεθών για την εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων της PCR (size marker). Η φωτογράφιση των δειγμάτων έγινε με μηχανή Polaroid και φιλμ Polaroid type 667 πάνω σε φωτιζόμενη με υπεριώδη ακτινοβολία τράπεζα.

Καθαρισμός του δίκλωνου ενισχυμένου τμήματος DNA

(DNA PRECIPITATION)

Ο καθαρισμός του προϊόντος πριν τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γίνεται για την απαλλαγή του δείγματος από την περίσσεια dNTPs και ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών.

Διαδικασία

- Μεταφορά των PCR προϊόντων σε σωληνάρια eppendorf 1,5ml.
- Προσθήκη οξικού Νατρίου 5M.
- Προσθήκη ισοπροπανόλης 100% (τελική συγκέντρωση στην αντίδραση 50%).

- Ήπια ανάδευση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρωση για 10min στις 10.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απόχυση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε ddH₂O και καταβύθιση σε ΕΤΟΗ 99%.
- Φυγοκέντρωση για 10min στις 10.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απόχυση του υπερκείμενου.
- Έκπλυση του ιζήματος σε ΕΤΟΗ 70%.
- Φυγοκέντρωση για 10min στις 10.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απόχυση του υπερκείμενου.
- Στέγνωμα σε κενό αέρος για την απομάκρυνση του υπολείμματος αιθανόλης.
- Διάλυση του DNA σε ddH₂O.

Προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing)

Η κυκλική ταυτοποίηση της αλληλουχίας του DNA συνδυάζει την κλασσική ενζυμική μέθοδο του Sanger για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής του DNA, με τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των αλληλουχιών του, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Ο πρώτος κύκλος είναι ταυτόσημος με την κλασσική ενζυμική διδεοξυ μέθοδο του Sanger, με μόνη διαφορά τη χρήση μιας σταθερής σε υψηλές θερμοκρασίες πολυμεράσης (Taq πολυμεράση). Με τη δράση της πολυμεράσης συντίθεται *in vitro* μια DNA άλυσος χρησιμοποιώντας μια μονόκλωνη μήτρα DNA και ένα 3'OH άκρο. Η σύνθεση τερματίζεται με την ενσωμάτωση στην νεοσχηματιζόμενη

άλυσο ενός νουκλεοτιδικού αναλόγου, το οποίο δεν επιτρέπει την επιμήκυνση της. Τα νουκλεοτιδικά αυτά ανάλογα είναι τριφωσφορικά 2,3-διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs), στα οποία απουσιάζει η υδροξυλική ομάδα στην 3' θέση της δεσοξυριβόζης, η οποία είναι απαραίτητη για το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο δεοξυνουκλεοτίδιο. Όταν χρησιμοποιούνται μίγματα δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) και ενός από τα 4ddNTPs, κάθε φορά ο πολυμερισμός της συντιθέμενης αλυσίδας DNA σταματά για ένα κλάσμα του πληθυσμού σε κάθε θέση που μπορεί να ενσωματωθεί το ddNTP. Η θέση είναι τυχαία και κάθε πιθανή θέση ενσωμάτωσης θα υπάρχει στο τελικό μίγμα των αλυσίδων. Τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις - κάθε μία με διαφορετικό ddNTP (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP) - παρέχουν τη συνολική πληροφορία μιας αλληλουχίας DNA. Μετά την ολοκλήρωση του πρώτου κύκλου της σύνθεσης τα προϊόντα της αντίδρασης αποδιατάσσονται και δίνεται η δυνατότητα εκ νέου στον ραδιοσημασμένο εκκινητή να προσδεθεί στις αποδιαταγμένες μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η κυκλική επανάληψη της αντίδρασης για περίπου 30 φορές καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του DNA ξεκινώντας από μια πολύ μικρή ποσότητα χωρίς να προαπαιτείται η κλωνοποίηση του γονιδιωματικού ή του ενισχυμένου με την PCR DNA.

Ο απ'ευθείας προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA έγινε με σήμανση του 5' άκρου με Texas Red ενός εκάστου εκκινητή (Πίνακας 1) που χρησιμοποιήθηκε , με την χρήση θερμικού κυκλοποιητή και την ανάλυση της αλληλουχίας με αυτόματο αναλυτή (Sequencer Vistra 725 Amersham). Κάθε ανιχνευθείσα μετάλλαξη επιβεβαιώθηκε με επανάληψη της PCR και του

προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA τόσο με τον ευθύ (forward) όσο και με τον αντίστροφο (reverse) εκκινητή.

Σήμανση εκκινητού

Η σήμανση του εκκινητού γίνεται στο 5' άκρο του με τη βοήθεια της T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης με ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP (3000 μCi / mmol).

Διαδικασία

Για κάθε αντίδραση αναμίχθηκαν σε πάγο τα εξής:

- 12,5pmol ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή
- 10X διάλυμα T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης (τελική συγκέντρωση στη αντίδραση 1X):

500 mM Tris-HCl pH 7.5

80 mM MgCl_2

20 mM DTT (dithiothreitol)
- 5U T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση
- ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 25 μl
- 30 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ ATP

Επώαση της αντίδρασης σε υδατόλουτρο στους 37°C για 30min.

Παύση της αντίδρασης με ταχεία ψύξη στους 4°C.

Η ανάλυση της αλληλουχίας με αυτόματο αναλυτή (Sequencer Vistra 725 Amersham).

Ορμονικοί προσδιορισμοί

Στους ασθενείς με αντίσταση στην GnRH ο πλήρης ορμονικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο του Ενδοκρινολογικού Τμήματος της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Πατρών. Στους ασθενείς αυτούς οι LH, FSH, T3 και T4 προσδιορίστηκαν με την μέθοδο της ραδιοανοσομετρίας (RIA) σε ημιαυτόματο αναλυτή IMX της Abbott χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια CIS bio international, Gif Sur Yvette, Cedex, France για τις LH και FSH, με όριο ευαισθησίας για την LH και την FSH τα 0,5mIU/mL, και DiaSorin, Minnesota, USA για τις T3 και T4. Η Προλακτίνη, Οιστραδιόλη, Τεστοστερόνη, ελεύθερη Τεστοστερόνη, DHEA-S και TSH προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο IRMA χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια CIS bio international, Gif Sur Yvette, Cedex, France για την Προλακτίνη, DSL-4900, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA για την Τεστοστερόνη, Ελεύθερη Τεστοστερόνη, DHEA-S και Οιστραδιόλη, DiaSorin Minnesota, USA για την TSH.

Χαρακτηριστικά προσωπικότητας

Η μελέτη των χαρακτηριστικών της προσωπικότητας ασθενών με ανεπάρκεια

GnRH περιέλαβε 10 άρρενες ασθενείς

(7 με σύνδρομο Kallmann και

3 με Ιδιοπαθή Υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό).

Οι ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH συγκρίθηκαν με

40 άρρενες ασθενείς με χρόνια μη ενδοκρινική νόσο, ως μάρτυρες

με στάθμιση ως προς το εκπαιδευτικό επίπεδο και την ηλικία.

(10 με σταθεροποιημένο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II, 10 με Ελκώδη Κολίτιδα σε Ύφεση, 10 με Νόσο του Crohn σε Ύφεση και 10 με Νεφρική Ανεπάρκεια, 5 σε Αιμοκάθαρση και 5 σε Περιτοναϊκή Διάλυση).

Ένας ασθενής με σύνδρομο Kallmann παρουσίαζε σχιζοφρένια και μελετήθηκε ξεχωριστά από τους υπόλοιπους.

Ο έλεγχος των χαρακτηριστικών της προσωπικότητας έγινε με τη χρήση των κάτωθι ερωτηματολογίων:

- SCL-90 (Hopkins' Symptom Check-List), για διερεύνηση της ψυχοπαθολογίας.
- MMPI (Minnesota Multiphasic Personality Inventory) για τη μελέτη των χαρακτηριστικών της προσωπικότητας.
- HDHQ (Hostility and Direction of Hostility Questionnaire) για την μελέτη της δομής της επιθετικότητας.
- DSQ (Defense Style Questionnaire) για την μελέτη του αμυντικού προφίλ.

Οι ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH υπεβλήθησαν και σε ψυχιατρική συνέντευξη.

Στατιστική Επεξεργασία:

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τις δοκιμασίες t-test διπλής κατεύθυνσης και one-sample t-test για τις συγκρίσεις με τις τιμές από τις σταθμίσεις των ερωτηματολογίων.

Ανάλυση ερωτηματολογίων:

SCL-90

Διερευνά την ύπαρξη ψυχοπαθολογίας στη διάρκεια των τελευταίων δύο εβδομάδων, και ελέγχει:

1. Συμπτώματα Σωματοποίησης
2. Ψυχαναγκαστικότητα – Καταναγκαστικότητα
3. Δυσκολίες από υπερβολική ευαισθησία στις διαπροσωπικές σχέσεις
4. Κατάθλιψη
5. Άγχος
6. Επιθετικότητα – Εχθρότητα γενικά στις διαπροσωπικές σχέσεις, όπως αυτή εκφράζεται μέσω συμπτωμάτων ή και συμπεριφορών
7. Φοβικό Άγχος
8. Παρανοϊκό Ιδεασμό
9. Ψυχωτική συμπτωματολογία

Δίνει επιπλέον έναν Γενικό Δείκτη Συμπτωματολογίας (ΓΔΣ) που είναι το άθροισμα των επιμέρους απαντήσεων στις παραπάνω υποκλίμακες, και είναι ένας δείκτης της γενικότερης «αναταραχής» (Distress)

MMPI (Διάγραμμα προσωπικότητας)

Ελέγχει τα εξής χαρακτηριστικά της προσωπικότητας:

- 1.Υποχονδρίαση
- 2.Κατάθλιψη
- 3.Υστερία
- 4.Ψυχοπαθητικότητα
- 5.Ταυτότητα Φύλου
- 6.Παρανοϊκότητα
- 7.Ψυχαναγκαστικότητα
- 8.Ψυχωτική Δομή - Σχιζοφρενικότητα
- 9.Μανιακή Δομή – Οργάνωση Μανιακών Αμυνών
- 10.Κοινωνική Ενδοστρέφεια

ΗΔΗQ (Επιθετικότητα)

Διερευνά την έκταση και την φύση της Επιθετικότητας, όχι ως σωματικά εκφραζόμενη επιθετικότητα, ούτε ως συμπτωματολογία, αλλά κυρίως ως εσωτερικής αντίδρασης σε καταστάσεις ματαίωσης.

Ελέγχει τα εξής χαρακτηριστικά της Επιθετικότητας:

- 1.Την Συνολική Έκταση (Μέγεθος) της Επιθετικότητας
- 2.Την Κατεύθυνσή της, αν είναι δηλαδή Εξωστρεφόμενη ή Ενδοβαλλόμενη
- 3.Τα Επιμέρους Χαρακτηριστικά της:
 - i. Την Εκδραματιζόμενη Επιθετικότητα
 - ii. Την Τάση Κριτικής των Άλλων
 - iii. Την Παρανοειδή Επιθετικότητα
 - iv. Την Τάση Αυτοκριτικής
 - v. Την Τάση προς Ενοχή

DSQ - 1: Αμυντικό προφίλ

Διερευνά την γενικότερη Αμυντική Οργάνωση της προσωπικότητας, μέσο της σύνθεσης επιμέρους Μηχανισμών Άμυνας του Εγώ.

Ελέγχει τις εξής Αμυντικές Οργανώσεις της Προσωπικότητας:

1.Δυσπροσαρμοστικότητα: Χρήση κυρίως ανώριμων μηχανισμών άμυνας, όπως η απόσυρση (withdrawal), η παλινδρόμηση (regression), η εκδραμάτιση (acting out), η αναστολή (inhibition), η παθητική επιθετικότητα (passive aggression) και η προβολή (projection).

2.Διαστρέβλωση της Αναπαράστασης: Επικρατούν η Παντοδυναμία (omnipotence), η Διάσχιση (splitting) και η Ανώριμη Εξιδανίκευση (primitive idealization). Χαρακτηρίζει τις Οριακές Οργανώσεις και την Ναρκισσιστική Οργάνωση της προσωπικότητας.

3.Αυτοθυσία: Επικρατούν οι μηχανισμοί της Αντίδρασης δια του Αντιθέτου (reaction formation) και του Ψευδοαλτρουϊσμού (pseudoaltruism).

4.Προσαρμοστικότητα: Επικρατούν οι περισσότερο ώριμοι μηχανισμοί της Καταστολής (suppression), της Μετουσίωσης (sublimation) και του Χιούμορ (humor).

5.

DSQ (και DSQ/DMRS): Εκτίμηση των Μηχανισμών Άμυνας του Εγώ

Ελέγχει πολλούς μηχανισμούς, οι σπουδαιότεροι των οποίων είναι:

A) «Ψυχωτικές» Άμυνες

1.Παραληρητική Προβολή

2.Ψυχωτική Άρνηση

3.Διαστρέβλωση (Distortion)

B) «Ανώριμες» Άμυνες

- 1.Προβολή (Projection)
- 2.Σχιζοειδής Φαντασίωση
- 3.Υποχονδρίαση
- 4.Παθητική Επιθετικότητα
- 5.Εκδραμάτιση (Acting Out)
- 6.Αποσύνδεση (Dissociation)

Γ) «Νευρωτικές» Άμυνες

- 1.Απώθηση (Repression)
- 2.Μετάθεση (Displacement)
- 3.Σχηματισμός εξ Αντιδράσεως (Reaction Formation)
- 4.Διανοητικοποίηση (Intellectualization)

Δ) «Ωριμες» Άμυνες

- 1.Αλtruισμός (Altruism)
- 2.Χιούμορ (Humor)
- 3.Καταστολή (Suppression)
- 4.Μετουσίωση (Sublimation)
- 5.Προβλέπειν – Προσδοκάν (Anticipation)

Αποτελέσματα

Αποτελέσματα γονιδιακού ελέγχου

Μελέτη του γονιδίου KAL

Καμία αλλαγή βάσεων δεν ανευρέθη, αναδεικνύοντας πλήρη «συντήρηση» όλων των εξονίων του γονιδίου KAL στους ασθενείς που μελετήθηκαν.

Μελέτη των γονιδίων της GnRH, του υποδοχέα της GnRH και των υποκινητών τους.

Σε πέντε ασθενείς με ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό που αφορούν σποραδικές περιπτώσεις, στο γονίδιο της GnRH εντοπίστηκε η μετάλλαξη (g→c στο κωδικόνιο 16). Ο ένας ασθενής φέρει την μετάλλαξη (g→c) και στα δύο του αλληλόμορφα, ενώ οι άλλοι 4 ασθενείς είναι ετερόζυγοι. Η μετάλλαξη προκαλεί αλλαγή στο αμινοξύ 16 της πρωτεΐνης από σερίνη σε τρυπτοφάνη (Πίνακας 10). Η μετάλλαξη αποτελεί φυσικό πολυμορφισμό καθώς έχει εντοπιστεί και σε φυσιολογικό πληθυσμό (Γεωργόπουλος NA, αδημοσίευτα δεδομένα, ποσοστό εμφάνισης 30% σε έλεγχο 100 χρωμοσωμάτων).

Στο γονίδιο του υποδοχέα της GnRH εντοπίστηκαν δύο μεταλλάξεις. Η μετάλλαξη (c→t στο κωδικόνιο 146), ανιχνεύτηκε σε δύο ασθενείς με οικογενή κληρονομικότητα. Η μετάλλαξη προκαλεί αλλαγή του αμινοξέος στη θέση 146

της πρωτεΐνης από προλίνη σε σερίνη (Πίνακας 10) την οποία φέρουν και οι δύο ασθενείς σε ετεροζυγωτία (Εικόνα 13). Επίσης η μητέρα των δύο ασθενών είναι ετεροζυγώτης για την συγκεκριμένη μετάλλαξη (Εικόνα 13), ενώ ο πατέρας τους έχει αποβιώσει προ ετών. Η μητέρα έφερε επίσης τη μετάλλαξη (c→t στο κωδικόνιο 151). Η ίδια μετάλλαξη εντοπίστηκε σε έναν ασθενή και η αλλαγή της βάσης δεν προκαλεί καμία αμινοξική αλλαγή στη θέση 151 της πρωτεΐνης (Πίνακας 10).

Δεν εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στους υποκινητές των υπό μελέτη γονιδίων.

Μελέτη των ασθενών με αντίσταση στην GnRH.

Από το σύνολο των 26 ασθενών με ιδιοπαθή υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, σε 3 ασθενείς εντοπίστηκε αντίσταση στη δράση της GnRH. Πρόκειται για μία σποραδική περίπτωση ενός άρρενος και μία οικογενής περίπτωση δύο θηλέων αδελφών.

Στον άνδρα η αντίσταση στη δράση της GnRH εντοπίστηκε μετά από αδυναμία πρόκλησης εφηβείας με υποδόρια, κατά ώσεις χορήγηση GnRH μέσω ειδικής αντλίας και σε δόση σταδιακά αυξανόμενη μέχρι τη μέγιστη δόση των 300ng/kg/2h για χρονικό διάστημα τριών μηνών. Αντιθέτως, ο ασθενής ανταποκρίθηκε στη χορήγηση hCG σε δόση 2500IU x 3/εβδ τόσο εργαστηριακά με αύξηση των επιπέδων τεστοστερόνης και ελεύθερης τεστοστερόνης, όσο και κλινικά με αύξηση του μεγέθους των όρχεων από 3 σε 9 ml (Πίνακας 3). Στο συγκεκριμένο ασθενή δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στα μελετώμενα γονίδια.

Οι δύο γυναίκες παρουσιάστηκαν με πρωτοπαθή αμηνόρροια και ατελή ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτήρων του φύλου (Μαζικός αδένας: Tanner II, Τρίχωση εφηβαίου: Tanner II). Η έμμηνος ρύσης προκλήθηκε με ορμονική υποκατάσταση με εθινύλ Οιστραδιόλη και προγεστερινοειδές. Στις δύο ασθενείς ανιχνεύτηκε σε ετεροζυγωτία η μετάλλαξη στον υποδοχέα της GnRH, που προκαλεί την αλλαγή της προλίνης σε σερίνη στη θέση 146.

Μετά από διακοπή της αγωγής, και στους 3 ασθενείς ελήφθησαν δείγματα αίματος ανά 10 λεπτά για χρονικό διάστημα 12 ωρών (από 8μ.μ-8π.μ) για το προσδιορισμό των βασικών επιπέδων έκκρισης της LH. Ακολούθως επιχειρήθηκε διέγερση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση με υποδόρια κατά ώσεις χορήγηση GnRH μέσω ειδικής αντλίας με δόση 300ng/kg/2h για χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας. Μετά τη συμπλήρωση της διέγερσης, στους ασθενείς ελήφθησαν δείγματα αίματος ανά 10 λεπτά για χρονικό διάστημα 12 ωρών (από 8μ.μ-8π.μ) και ακολούθως η διέγερση με GnRH τερματίστηκε. Στα δείγματα προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ορού της LH και συγκρίθηκαν με αντίστοιχα δείγματα υγιούς άρρενος. Τα επίπεδα της LH παρέμειναν μηδενικά τόσο προ όσο και μετά τη διέγερση με GnRH. Δείγμα των ανωτέρω τιμών μετά τη διέγερση με GnRH, ανά 30 λεπτά, για χρονικό διάστημα 6 ωρών παρατίθεται στην Εικόνα 2.

Μελέτη των χαρακτηριστικών της προσωπικότητας

1. Οι ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH δεν διαφέρουν σημαντικά στις κλίμακες ψυχοπαθολογίας ούτε από τις μέσες τιμές φυσιολογικού

πληθυσμού, ούτε από τις τιμές που έδωσε η ομάδα ελέγχου με χρόνιες σωματικές παθήσεις.

2. Δίνουν σημαντικά χαμηλότερες τιμές σε όλες τις κλίμακες ψυχοπαθολογίας από ότι οι ψυχιατρικά ασθενείς, εκτός από την υποκλίμακα του «Θυμού» (Εικόνα 15).
3. Το διάγραμμα προσωπικότητάς τους (MMPI) δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες αιχμές ή βυθίσεις και όλες οι κλίμακες είναι κοντά στον μέσο όρο, με παρουσία στοιχείων «Μετατροπής». Εντύπωση προκαλεί η πολύ κοντά στον μέσο όρο τιμή της κλίμακας Mf, που εκφράζει την ταυτότητα του φύλου (Εικόνα 16).
4. Και οι δύο ομάδες ασθενών δίνουν αρκετά υψηλές τιμές «Επιθετικότητας-Θυμού-Αντίδρασης στην Ματαίωση» και ομοιάζουν στο τρόπο διαχείρισής του (Εικόνα 17).
5. Οι ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH δείχνουν αμυντική οργάνωση προσωπικότητας Ναρκισσιστικού τύπου και συχνά υιοθετούν μια στάση «αυτοθυσίας», σε σχέση με τους Υγιείς, δεν διαφέρουν όμως σε αυτές τις παραμέτρους από τους άλλους ασθενείς με χρόνια σωματική νόσο (Εικόνα 18).
6. Συνολικά, οι ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH δεν παρουσιάζουν διαταραχές στην προσαρμογή, αν και δείχνουν δυσκολία στο μοίρασμα της επώδυνης εμπειρίας με άλλους ανθρώπους (Εικόνες 19-20).

Ο ασθενής με σύνδρομο Kallmann παρουσίαζε ένα εντελώς διαφορετικό ψυχοπαθολογικό χαρακτήρα από το σύνολο των υπολοίπων ασθενών που μελετήθηκαν. Ο ασθενής αυτός παρουσίαζε μεγαλύτερη ανασφάλεια ως προς τη σεξουαλική του ταυτότητα, και οι μηχανισμοί αμύνης του ήταν ανώριμοι

(Εικόνα 21). Είχε persecutory delusions, ακουστικές παραισθήσεις, διαταραχές στην δομή της σκέψης καθώς και αποπροσωποποίηση. Στον ασθενή αυτόν δεν ανευρέθησαν μεταλλάξεις και στα 14 εξόνια του γονιδίου KAL.

Συζήτηση

Ο ιδιοπαθής υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός είναι μία νόσος η μελέτη της οποίας εγείρει ερωτήματα για τους ερευνητές. Πρόκειται για σπάνιο νόσημα, κληρονομούμενο τόσο με τον επικρατούντα όσο και με τον υπολειπόμενο χαρακτήρα σε οικογένειες αυτοπεριοριζόμενου μεγέθους λόγω του υπογοναδισμού. Κατά συνέπεια η πλειοψηφία αφορά σποραδικά περιστατικά, ενώ τα μέχρι σήμερα γνωστά ενεχόμενα γονίδια καλύπτουν μικρό μόνο μέρος της αιτιοπαθογένειας του (17).

Το πρότυπο του υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού στον επίμου (hrg) οφείλεται σε μία μεγάλη εξονική έλλειψη στο γονίδιο της GnRH, η οποία μεταδίδεται με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Αντίστοιχο πρότυπο στον άνθρωπο δεν έχει εντοπιστεί. Το σπάνιο σύνδρομο συνεχόμενων γονιδίων με πολλαπλές συγγενείς ανωμαλίες, σφαιροκυτταρική αναιμία, πνευματική καθυστέρηση και υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, το οποίο οφείλεται σε έλλειψη στη περιοχή 8p11-p21.4 δεν αφορά το γονίδιο της GnRH. Πρόσφατα, ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός του ανωτέρω συνδρόμου, ο οποίος σημειωτέον περιλαμβάνει και ανοσμία, απεδείχθη ότι οφείλεται σε μεταλλαγές στο γονίδιο FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1), υπεύθυνο για μία μορφή του συνδρόμου Kallmann, το οποίο μεταβιβάζεται με επικρατούσα κληρονομικότητα (104). Αν και το γονίδιο της GnRH έχει μελετηθεί σε ασθενείς με ΙΥΥ (61), ο υποκινητής του έχει μελετηθεί μόνο σε έναν ασθενή με ΙΥΥ και σε έναν με πρώιμη ήβη (63). Για το λόγο αυτό, αποφασίσαμε να επεκτείνουμε τη μελέτη του γονιδίου της GnRH και σε ένα τμήμα του υποκινητή το οποίο να συμπεριλαμβάνει τη περιοχή TATA (θέση -

32/-25) και τις δύο περιοχές CAAT (θέσεις -53/50 και 0-162/-159) οι οποίες είναι σημαντικές για την έναρξη της μεταγραφής. Τόσο στο τμήμα του μελετηθέντος υποκινητή όσο και στο γονίδιο της GnRH, στους ασθενείς με ΙΥΥ της μελέτης αυτής, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις που αφορούν πολυμορφισμούς, με δεδομένο ότι οι συγκεκριμένες αλλαγές βάσεων έχουν εντοπιστεί και σε φυσιολογικά άτομα.

Στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις του υποδοχέα της GnRH σε ασθενείς με ΙΥΥ (21, 76, 74, 79). Οι μεταλλάξεις είναι αδρανοποιητικές, συνήθως σε διπλή ετεροζυγωτία ή σε ομοζυγωτία, υπάρχει όμως ασυμφωνία μεταξύ των ερευνητών ως προς τη συχνότητα εμφάνισής τους (2-15%) (17). Στη δική μας μελέτη εντοπίστηκε μία μετάλλαξη σε ετερόζυγη μορφή, η οποία δεν είχε προηγουμένως εντοπιστεί, καθώς και ένας φυσικός πολυμορφισμός. Είναι γνωστό ότι για την εκδήλωση του κλινικού υπογοναδοτροφικού υπογοναδισμού απαιτείται η παρουσία αδρανοποιητικής μετάλλαξης και στα δύο χρωμοσώματα, καθώς η ύπαρξη ενός φυσιολογικού γονιδίου φαίνεται να επαρκεί για την ενδοκυττάρια προώθηση του μηνύματος (17). Στις δύο ασθενείς της παρούσης μελέτης, η ίδια μετάλλαξη (Pro146Ser) εντοπίστηκε επίσης σε ετερόζυγη μορφή και στη μητέρα των πασχόντων αδελφών, γεγονός το οποίο πιστοποιεί ότι η παρουσία μόνο αυτής της μετάλλαξης δεν είναι ικανή να δώσει τον κλινικό φαινότυπο του ΙΥΥ.

Οι δύο ασθενείς με ΙΥΥ και τη μετάλλαξη Pro146Ser, καθώς και ένας άνδρας με ΙΥΥ και φυσιολογική αλληλουχία του υποδοχέα της GnRH παρουσίαζαν αντίσταση στη δράση της GnRH. Η παρουσία αντίστασης στη GnRH σε ασθενείς με ΙΥΥ είναι εξαιρετικά σπάνια (83). Ασθενείς με ΙΥΥ και αντίσταση στη δράση της GnRH αποτελούν φυσικά πρότυπα για τη μελέτη και τον

εντοπισμό των πολλαπλών γονοτυπικών συνδυασμών οι οποίοι έχουν ως κατάληξη την εμφάνιση του συγκεκριμένου φαινότυπου. Θεωρητικά, τέτοιοι ασθενείς αποτελούν τον ιδανικό κλινικό φαινότυπο της διαταραχής του γονότυπου του υποδοχέα της GnRH. Προκειμένου να ελέγξουμε όσο πληρέστερα ήταν δυνατόν τη λειτουργικότητα του υποδοχέα επεκτείναμε τη μελέτη και σε ένα μεγάλο τμήμα του υποκινητή του γονιδίου (μεγαλύτερο των 2000 βάσεων), ο οποίος επίσης δεν έχει μελετηθεί σε ασθενείς με ΙΥΥ. Ο μη εντοπισμός νοσογόνων μεταλλάξεων ομοζυγωτίας ή διπλής ετεροζυγωτίας στους συγκεκριμένους ασθενείς αποδεικνύει την ύπαρξη διαταραχών στην έκφραση γονιδίων τα οποία επηρεάζουν ή την ενδοκυττάρια μετάδοση του μηνύματος ή την ίδια την έκφραση του υποδοχέα της GnRH.

Ο υποδοχέας της GnRH ανήκει στην οικογένεια των διαμεμβρανικών υποδοχέων οι οποίοι αντιδρούν με G πρωτείνες (G-protein coupled receptors). Αποτελείται από 7 διαμεμβρανικά τμήματα και ασκεί την δράση του μέσω G πρωτεϊνών, οι οποίες με την σειρά τους ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAP κινασών απαραίτητο για την ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος στο πυρήνα όπου προάγεται η σύνθεση των γοναδοτροφινών. Όταν προσδεθεί η GnRH στον υποδοχέα, η Gα υποομάδα αποσυνδέεται από το Gβγ διμερές και δημιουργεί ενεργό σύμπλοκο με την GTP. Σε κάθε ιστό ενεργοποιείται διαφορετική G- πρωτεΐνη. Στα υποφυσιακά κύτταρα έχει βρεθεί ότι εκφράζεται κυρίως η κινάση PKCδ και PKCε μαζί με άλλους μη τυπικούς υπότυπους της πρωτεϊνικής κινάσης C, οι οποίοι ενεργοποιούνται ανεξάρτητα του DAG και του Ca⁺⁺. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα της GnRH χρησιμοποιεί και τα τέσσερα μονοπάτια των MAP κινασών (ERK, JNK, p38MAPK, BMK) μέσω PCK. Τα κυριότερα μόρια μετάδοσης του σήματος

είναι η τυροσινική κινάση c-SRC και οι μικρές GTPάσες (CDC42, RAC, RAS) (71, 72).

Είναι προφανής ο εξαιρετικά πολύπλοκος μηχανισμός μετάδοσης του ενδοκυττάριου μηνύματος ο οποίος ελέγχεται από πλειάδα γνωστών και άγνωστων γονιδίων. Οποιαδήποτε διαταραχή του πολύπλοκου αυτού γονότυπου μπορεί να οδηγήσει στο φαινότυπο των ασθενών με αντίσταση στη GnRH και φυσιολογικό γονότυπο του υποδοχέα της GnRH.

Ο ίδιος φαινότυπος θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα γονοτυπικής διαταραχής σε γονίδια τα οποία ενέχονται στην έκφραση του υποδοχέα της GnRH. Πρόσφατα εντοπίστηκαν για πρώτη φορά μεταλλάξεις στο γονίδιο GPR54 σε ασθενείς με ΙΥΥ (24, 25). Ο υποδοχέας GPR54 ανήκει στην ομάδα των αντιδρώντων με G πρωτεΐνη υποδοχέων. Η kisspeptin-1 (ή metastatin λόγω της ικανότητας της να καταστέλλει τις μεταστάσεις του μελανώματος) δεσμεύεται στον GPR54. Φαίνεται ότι η kisspeptin-1 ρυθμίζει την απαντητικότητα της υπόφυσης στη δράση της GnRH, γεγονός το οποίο ενισχύεται από τη διαπίστωση ότι στο διαγονιδιακό ποντίκι με αδυναμία έκφρασης του GPR54, η παρουσία GnRH στον υποθάλαμο ήταν φυσιολογική (24). Πλειάδα γονιδίων τα οποία εκφράζονται κυρίως στο ΚΝΣ, τον υποθάλαμο και την υπόφυση πιθανόν ρυθμίζουν την έκφραση του υποδοχέα της GnRH και φαίνεται ότι οδηγούν στο φαινότυπο των ασθενών με αντίσταση στη GnRH και φυσιολογικό γονότυπο του υποδοχέα της GnRH.

Αν και το γονίδιο KAL έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη ψυχοπαθολογικών εκδηλώσεων, με κύριο εκπρόσωπο τη σχιζοφρένεια, οι εκδηλώσεις από τη ψυχική σφαίρα ασθενών με σύνδρομο Kallmann δεν έχουν μελετηθεί. Επιπλέον σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να περιγράψει αυτές τις

διαταραχές και να τις συσχετίσει με το γονότυπο των ασθενών. Ένας εκ των ασθενών με σύνδρομο Kallmann παρουσίαζε και σχιζοφρένεια χωρίς όμως να αναδειχθούν μεταλλάξεις στο γονιδίωμά του αποδεικνύοντας ότι ουδεμία σχέση έχουν οι δύο αυτές οντότητες παρά μόνο ως μια σπάνια κλινική συνύπαρξη. Παράλληλα, οι ασθενείς με ανεπάρκεια GnRH δεν διαφέρουν σημαντικά στις κλίμακες ψυχοπαθολογίας ούτε από τις μέσες τιμές φυσιολογικού πληθυσμού, ούτε από τις τιμές που έδωσε η ομάδα ελέγχου με χρόνιες σωματικές παθήσεις ενώ δίνουν σημαντικά χαμηλότερες τιμές σε όλες τις κλίμακες ψυχοπαθολογίας από ότι οι ψυχιατρικά ασθενείς, εκτός από την υποκλίμακα του «θυμού».

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη ανέδειξε σε ασθενείς με ΙΥΥ την απουσία αδρανοποιητικών μεταλλάξεων σε ομοζυγωτία ή σε διπλή ετεροζυγωτία στα γονίδια της GnRH, του υποδοχέα της GnRH και των υποκινητών τους. Ο μη εντοπισμός μεταλλάξεων στα ανωτέρω γονίδια σε ασθενείς με ΙΥΥ και αντίσταση στην GnRH προσφέρει ένα δημιουργικό ερέθισμα στη μελέτη της πολυγονιδιακής αιτιοπαθογένειας του ΙΥΥ.

Βιβλιογραφία

1. Maestre de San Juan: Teratologia: falta total de los nervios olfactorios con anosmia en un individuo en quien existia una atrofia congenita de los testiculos y miembro viril. El siglo medico, Madrid. 1856: 211.
2. F. Weidenreich: über partiellen Riechlappendefect und Eunuchoidismus beim Menschen. Zeitschrift fur Morphologie und Anthropologie, Stuttgart, 1914, 18: 157.
3. F. J. Kallmann, W. A. Schonfeld, S. E Barrera: The genetic aspects of primary eunuchoidism. American Journal of Mental Deficiency 1943-1944, 48: 203-236.
4. G. De Morsier: Etudes sur les dysraphies cranio-encephaliques. I. Agénésie des lobes olfactifs (telencéphaloscizis latéral) et des commissures calleuse et antérieure (telencéphaloscizis median). La dysplasie olfacto-génitale. Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie, Zurich, 1954, 74: 309-361.
5. G. De Morsier: Median cranioencephalic dysraphias and olfactogenital dysplasia. World Neurology, Minneapolis, 1962, 3: 485-506.
6. G. Gauthier: La dysplasie olfacto-génitale (agénésie des lobes olfactifs avec absence de développement gonadique u la puberté) Acta neurovegetativa, Wien, 1960, 21: 345-394.
7. Truwit CL, Barkovich AJ, Grumbach MM, Martini M. 1993 Mr imaging of Kallmann syndrome, a genetic disorder affecting the olfactory and genital systems. Am J Neuroradiol 14:827

8. Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinising hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1971 Jul 2;44(1):205-10.
9. Schally AV, Nair RM, Redding TW, Arimura A. Isolation of the luteinising hormone and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami. *J Biol Chem.* 1971 Dec 10;246(23):7230-6.
10. Ballabio A, Parenti G, Tipett P, Mondello C, Di Maio S, Tenore A, Andria G. 1986. 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
11. Gillard EF, Affara NA, Yates JRM, et al: Deletion of a DNA sequence in eight of nine families with X-linked ichthyosis. *Nucleic Acids Res.* 1987;15; 3977-3985.
12. Dakou-Voutekakis C, Drakopoulou M. 1988. Ichthyosis and hypogonadism in two brothers with deletion of the short arm of the X chromosome. *Horm Res.* 30: 173
13. Meitinger T, Heye B, Petit C, Levilliers J, Golla A, Moraine C, Dalla Piccola B, Sippel WG, Murken J, Ballabio A. 1990. Definitive localization of X-linked Kallmann syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia) to Xp22.3: close linkage to the hypervariable repeat sequence CRI- 5232. *Am J Hum Genet.* 47:664

14. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. 1989. Origin of luteinising hormone-releasing hormone neurons. *Nature*. 338: 161
15. Petit C, Levilliers J, Weissenbach J. 1990. Long-range restriction map of the terminal part of the short arm of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 3680
16. Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, Carrozo R, Maestrini E, Pierretti M, Taillon-Miller P, Brown CJ, Williard HF, Lawrence C, Persico MG, 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
17. Seminara SB, Hayes FJ, Crowley WF Jr. 1998 Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's Syndrome) ; Pathophysiological and genetic considerations. *Endocrine reviews* 19(5) :521-539.
18. Georgopoulos NA, Pralong FP, Seidman CE, et al. 1997 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.
19. Dode C, Levilliers J, Dupont JM, et al 2003 Loss of function mutations in FGFR 1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nature Genetics* 33:1-3.
20. Vermeulen S, Messiaen L, Scheir P, De Bie S, Speleman F, de Paepe A 2002 Kallmann Syndrome in a patient with congenital spherocytosis and an interstitial 8p11.2 deletion. *Am J Med Genet* 108:315-318.

21. De Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Milgrom E, Schaison G. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med*. 337:1597-1602, 1997.
22. Beranova M, Oliveira MB, Bedecarrats GY, et al. Prevalence, phenotypic spectrum and modes of inheritance of Gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86 :1580-1588
23. Acierno JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Crowley WF, Seminara SB 2003 A locus for autosomal recessive idiopathic hypogonadotropic hypogonadism on chromosome 19p13.3 *J Clin Endocrinol Metab* 88(6):2947-2950.
24. Seminara S, Messenger S, Chatzidaki EE, et al. 2003 The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614-1627.
25. De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda P, Chaussain JL, Milgrom E. 2003 Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *PNAS* 100 (19):10972-10976.
26. Schwankhaus JD, Currie J, Jaffe MJ, Rose SR. 1989. Neurologic findings in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Neurology*. 39: 223
27. Mayston MJ, Harrison LM, Quinton R, Stephens JA, Krams M, Bouloux PMG. 1997. Mirror movements in X-linked Kallmann's syndrome. A neurophysiological study. *Brain*. 120: 1199
28. Wray S, Grant P, Gainer H. 1989. Evidence that cells expressing luteinising hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:8132

29. Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. 1989. Luteinising hormone – releasing hormone (LHRH)- expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Mol Brain Res.* 6: 311
30. Lutz B, Kuratani S, Rugarli E, Wawerskik S, Wong C, Bieber FR, Ballabio A, Eichele G. 1994. Expression of the Kallmann syndrome gene in human fetal brain and in the manipulated chick embryo. *Hum Mol Genet.* 3: 1717
31. Rugarli EI, Lutz B, Kuratani SC, Wawersik S, Borsani G, Ballabio A, Eichele G. 1993. Expression pattern of the Kallmann syndrome gene in the olfactory system suggests a role in neuronal targeting. *Nat Genet.* 4: 19
32. White BJ, Rogol AD, Brown KS, Lieblich JM, Rosen SW. 1983. The syndrome of anosmia with hypogonadotropic hypogonadism: a genetic study of 18 new families and a review. *Am J Med Genet.* 15: 417
33. Hermanussen M, Sippel WG. 1985. Heterogeneity of Kallmann's syndrome. *Clin Genet.* 28: 106
34. Chaussain JL, Toublane JE, Feingold J, Naud C, Vassal J, Job JC. 1988. Mode of inheritance in familial cases of primary gonadotropic deficiency. *Horm Res.* 29:202
35. Dean JCS, Johnston AW, Klopper AL. 1990. Isolated hypogonadotropic hypogonadism: a family with autosomal dominant inheritance. *Clin Endocrinol.* 32:341
36. Pawlowitzki IH, Diekstall P, Schadel A, Miny P. 1987. Estimating frequency of Kallmann syndrome among hypogonadic and among anosmic patients. *Am J Med Genet.* 26: 473

37. Ballabio A, Zoghbi HY. 1995. Kallmann syndrome. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: Mc Graw-Hill. vol 3: 4549.
38. Waldstreicher J, Jameson JL, Holmes L, Geyer A, Seminara S, Crowley Jr. 1996. The genetic and clinical heterogeneity of gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 81(12):4388
39. Best LG, Wasdahl WA, Larson LM, Sturlaugson J. 1990. Chromosome abnormality in Kallmann syndrome. *Am J Med Genet*. 35: 306
40. Schinzel A, Lorda-Sanchez I, Binkert F, Carter NP, Bebb CE, Ferguson-Smith MA, Eiholzer U, Zachmann M, Robinson W. 1995. Kallmann syndrome in a boy with a t(1;10) translocation detected by reverse chromosome painting. *J Med Genet*. 32(12): 957
41. Ballabio A, Sebastio G, Carrozo R, Parenti G, Piccitillo A, Persico MG, Andria G. 1987. Deletions of the steroid sulphatase gene in classical X-linked ichthyosis and in X-linked ichthyosis associated with Kallmann syndrome. *Hum Genet*. 77:338
42. Munke M, Kruse K, Goos M et al. 1983. Genetic heterogeneity in the ichthyosis, hypogonadism, mental retardation and epilepsy syndrome. *Eur J Pediatr*. 141: 8
43. Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderie V, Millasseau P, Le Paslier D, Cohen D, Caterins D, Bouguelerst L, Luttala G, Weissenbach J, Petit C. 1991. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell*. 67: 423
44. Hardelin JP, Levilliers J, Blanchard S, Carel JC, Leutenegger M, Pinard-Berteilleto JP, Bouloux P, Petit C. 1993. Heterogeneity in the mutations

responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum Mol Genet.* 4: 373

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

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

47. Del Castillo I, Cohen-Salmon M, Blanchard S, Lutfalla G, Petit C. 1992. Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome. *Nat Genet.* 2: 305

48. Hardelin JP, Petit C. 1995. A molecular approach to the pathophysiology of the X chromosome-linked Kallmann's syndrome. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 9(3): 489

49. Letourneau PC, Condic ML, Snow DM. 1992. Extracellular matrix and neurite outgrowth. *Curr Opin Genet Dev.* 2: 625

50. Hynes RW, Lander AD. 1992. Contact and adhesive specificities in the association, migration and targeting of cells and axons. *Cell.* 63: 303

51. Schwanzel – Fukuda M, Abraham S, Crossin KL, Edelman GM, Pfaff DW. 1992. Immunocytochemical demonstration of neural cell adhesion molecule (NCAM) along the migration route of luteinizing hormone- releasing hormone (LHRH) neurons in mice. *J Comp Neurol.* 321: 1

52. Cremer H, Lange R, Cristoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R. 1994. Inactivation of the NCAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*. 367: 455
53. Maya-Nunez G, Cuevas-Covarrubias S, Zenteno JC, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alforo S, Mendez JP. 1998. Contiguous gene syndrome due to deletion of the first three exons of the Kallmann gene and complete deletion of the steroid sulphatase gene. *Clin Endocr*. 48: 713
54. Maya-Nunez G, Zenteno JC, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Mendez JP. 1998. A recurrent missense mutation in the KAL gene in patients with X-linked Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 83: 1650
55. Gu WX, Colquhoun – Kerr JS, Kopp P, Bode HH, Jameson JL. 1998. A novel aminoterminal mutation in the KAL – 1 gene in a large pedigree with X-linked Kallmann syndrome. *Mol Genet Metab*. 65(1):59
56. Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young III WS, Phillips HS, Nikolics K, Seeburg PH 1986. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 234:1366–1371
57. Mason AJ, Pitis SL, Nikolics K, Szonyi E, Wilcox JN, Seeburg PH, Stewart TA 1986b The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy. *Science* 234: 1372-1378
58. Radovick S, Wondisford FE, Nakayama Y, Yamada M, Cutler GB, Weintraub BD 1990 Isolation and characterization of the human gonadotropin-releasing hormone gene in the hypothalamus and placenta. *Mol Endocrinol* 4:476-480

59. Yang-Feng TL, Seeberg PH, Francke U 1986 Human luteinising hormone-releasing hormone (LHRH) is located on short arm of chromosome 8 (region 8p11.2-p21). *Somat Cell Mol Genet* 12:95-100
60. Adelman JP, Mason AJ, Hayflick JS, Seeberg PH 1986 Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:179-183
61. Weiss J, Adams E, Whitcomb RW, Crowley Jr WF, Jameson JL 1991 Normal sequence of the gonadotropin-releasing hormone gene in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Biol Reprod* 45:743–747
62. Layman LC, Wilson JT, Huey LO, Lanclos KD, Plouffe Jr L, McDonough PG 1992 Gonadotropin-releasing hormone, follicle stimulating hormone beta, luteinising hormone beta gene structure in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 57:42–49
63. Nakayama Y, Wondisford FE, Lash RW, Bale AE, Weintraub BD, Cutler Jr GB, Radovick S 1990 Analysis of gonadotropin-releasing hormone gene structure in families with familial central precocious puberty and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1233–1238
64. Cheng CK, Leung PC. 2005 Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev.* 26(2):283-306.
65. Fan NC, Peng C, Krisinger J, Leung PC. 1995 The human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiple promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signals. *Mol Cell Endocrinol*. 107(2):R1-8.

66. Kakar SS. 1997 Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol.* 137(2):183-92.
67. Norwitz ER, Jeong KH, Chin WW. 1999 Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone receptor gene regulation. *J Soc Gynecol Investig.* 6(4):169-78.
68. Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. 1994 Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev.* 15(4):462-99.
69. Myburgh DB, Pawson AJ, Davidson JS, Flanagan CA, Millar RP, Hapgood JP. 1998 A single amino acid substitution in transmembrane helix VI results in overexpression of the human GnRH receptor. *Eur J Endocrinol.* 139(4):438-47.
70. Arora KK, Chung HO, Catt KJ. 1999 Influence of a species-specific extracellular amino acid on expression and function of the human gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol.* 13(6):890-6.
71. Kraus S, Naor Z, Seger R. 2001 Intracellular signaling pathways mediated by the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor. *Arch Med Res* 32:499-509.
72. Naor Z, Benard O, Seger R. 2000 Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled Receptors: The case of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor. *Trends Endocrinol Metab* 3(111); 91-94.
73. Costa EMF, Latronico AC, Arnhold IJP, Mendonca BB. 1999 A novel compound heterozygous mutations in the GnRH receptor gene in a Brazilian family with hypogonadotropic hypogonadism. The 81st Annual Meeting of the Endocrine Society. San Diego CA 1999 p.3

74. Pralong FP, Gomez F, Castillo E, Cotecchia S, Abuin L, Aubert ML, Portmann L and Gaillard RC 1999 Complete Hypogonadotropic Hypogonadism Associated with a Novel Inactivating Mutation of the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3811-3816.
75. Caron P, Chauvin S, Christin-Maitre S, Bennet A, Lahlou N, Counis R, Bouchard P, Kottler ML. 1999 Resistance of hypogonadic patients with mutated GnRH receptor genes to pulsatile GnRH administration. *J Clin Endocrinol Metab*. 84(3):990-6.
76. Kottler ML, Counis R and Bouchard P 1999 Mutations of the GnRH Receptor Gene: A new cause of autosomal-recessive hypogonadotropic hypogonadism. *Archives of Medical Research* 30: 481–485.
77. Soderlund D, Canto P, de la Chesnaye E, Ulloa-Aguirre A, Mendez JP. 2001 A novel homozygous mutation in the second transmembrane domain of the gonadotrophin releasing hormone receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 54(4):493-8.
78. Karges B, Karges W, de Roux N. 2003. Clinical and molecular genetics of the human GnRH receptor. *Hum Reprod Update*. 9(6):523-30.
79. De Roux N, Young J, Brailly-Tabard S, Misrahi M, Milgrom E and Schaison G 1999 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.
80. Santoro N, Filikori M, Crowley Jr WF. 1986 Hypogonadotropic disorders in men and women: diagnosis and therapy with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev*. 7:11-23.

81. Valk TW, Corley KP, Kelch RP, et al. 1980 Hypogonadotropic hypogonadism: Hormonal responses to low dose administration of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 51:730-738.
82. Aulitzky W, Frick J, Galvan G. 1998 Pulsatile luteinizing hormone releasing hormone treatment of male hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 50(3) :480-486.
83. Layman LC, McDonough PG, Cohen DP, et al 2001 Familial gonadotropin-releasing hormone resistance and hypogonadotropic hypogonadism in a family with multiple affected individuals. *Fertil Steril* 75(6) :1148-1155.
84. Zitzmasnn M, Nieschlag E. 2000 Hormone substitution in male hypogonadism. *Mol Cell Endocrinol* 161 (1-2) :73-88.
85. Pitteloud N, Hayes FJ, Boepple PA, et al. 2002 The role of prior pubertal development, biochemical markers of Testicular maturation, and genetics in elucidating the phenotypic heterogeneity of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 87 :152-160.
86. Bouloux P, Wzarne DW, Loumaye E. 2002 Efficacy and safety of recombinant human follicle-stimulating hormone in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 77(2):270-273.
87. Santoro N, Elzahr D. 1993 Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone therapy for ovulatory disorders. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 36:3, 727-736.
88. Schoemaker J. 1996 The role of the GnRH dose and the route of administration on treatment outcome and complications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 65 Suppl:S13-16.

89. Riolo A, Carioni E, Lerro S, et al. 1987 Induction of ovulation with pulsatile GnRH: comparison between subcutaneous and intravenous administration in the same patients. *Acta Eur Fertil.* 18(4):271-275.
90. Mais V., Melis GB., Strigini F. et al. 1991 Adjusting the dose to the individual response of the patient during the induction of ovulation with pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone. *Fertil Steril* 55:80-85.
91. Letterie GS., Coddington CC., Collins RL., et al. 1996 Ovulation induction using s.c. pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone: effectiveness of different pulse frequencies. *Human Reproduction* 11:19-22.
92. Liu L, Banks SM, Barnes KM, 1988 Two year comparison of testicular responses to pulsatile gonadotropin-releasing hormone and exogenous gonadotropins from the inception of therapy in men with isolated gonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 67(6) ;140-145.
93. Kliesch S, Behre HM, Nieschlag E. 1994 High efficacy of gonadotropin or pulsatile gonadotropin-releasing hormone treatment in hypogonadotropic hypogonadal men. *Eur J Endocrinol* 131(4) :347-354.
94. Buchter D, Behre HM, Kliesch S, et al. 1998 Pulsatile GnRH or human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin as effective treatment for men with hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 139 :298-303.
95. Marci R, Dessole S, Senn A, et al. 1999 Follow-up of 32 hypothalamo-hypopituitary patients treated with pulsatile gonadotropin-releasing hormone or human menopausal gonadotrophins *Gynecol Endocrinol.* 13(6):375-381.

- 96.Scopohl J, Mehlretter G, von Zumbusch R, et al. 1991 Comparison of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin therapy in male patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 56(6):143-149.
- 97.Martin KA, Hall JE, Adams JM, et al. 1993 Comparison of exogenous gonadotropins and pulsatile gonadotropin-releasing hormone for induction of ovulation in hypogonadotropic amenorrhea *J Clin Endocrinol Metab.* 77(1):125-129.
- 98.. Georgopoulos N A, Markou KB, Pappas A.P, et al 2001 Ovulation induction with pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or gonadotropins in a case of hypothalamic amenorrhea and diabetes insipidus. *Gynecol Endocrinol* 15:421-425.
- 99.Kousta E, Piazzzi AS, Loumaye E, et al. 1996 Successful induction of ovulation and completed pregnancy using recombinant luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in a women with Kallmann's syndrome. *Hum Reprod* 1 :70-710
100. Santoro N, Elzahr D. 1993 Pulsatile gonadotropin-releasing hormone therapy for ovulatory disorders. *Clin Obstet Gynecol.* 36; 727-736.
101. Filikori M, Flamigni C, Dellai P, et al. 1994 Treatment of anovulation with pulsatile gonadotropin-releasing hormone: Prognostic factors and clinical results in 600 cycles. *J Clin Endocrinol Metab.* 79:1215-1220.
102. Sueldo CE, Swanson JA. 1986 The economics of inducing ovulation with human menopausal gonadotropins versus pulsatile subcutaneous gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril.* 45:128-129.
103. Υφαντής Θ, Βαγενάκης ΓΑ, Πρωτοναταρίου Α, και συν. 2002 Ψυχοπαθολογία και χαρακτηριστικά της προσωπικότητας σε ασθενείς με

ανεπάρκεια GnRH. 29ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Ιωάννινα, 21-24.3.2002, σ.76.

104. Acierno JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Crowley WF, Seminara SB 2003 A locus for autosomal recessive idiopathic hypogonadotropic hypogonadism on chromosome 19p13.3 J Clin Endocrinol Metab 88:2947-2950.

Πίνακας 1. Κριτήρια διάγνωσης συνδρόμου Kallmann και ΙΥΥ

Ηλικία μεγαλύτερη των 18 ετών
Επίπεδα στεροειδικών ορμονών στον ορό προεφηβικού σταδίου (Τεστοστερόνη <100 ng/dl (3 nmol/L) στους άνδρες, Οιστραδιόλη <20 pg/ml /73 pmol/L στις γυναίκες)
Κλινικά σημεία και συμπτώματα υπογοναδισμού (καθυστέρηση ενήβωσης, υπογοναδισμός, αμηνόρροια στις γυναίκες)
Επίπεδα LH και FSH φυσιολογικά ή χαμηλότερα των φυσιολογικών ορίων (LH: 1,4-4,3 IU/L, FSH: 1,7-3,7 IU/L)
Φυσιολογικές δοκιμασίες των υπολοίπων ορμονών της αδενουπόφυσης
Φυσιολογική απεικόνιση της περιοχής υποθαλάμου-υπόφυσης με αξονική τομογραφία (CT scan) ή μαγνητική τομογραφία (MRI)
Διάγνωση υποσμίας ή ανοσμίας με την δοκιμασία UPSIT (για το σ. Kallmann)

Πίνακας 2. Πιθανή συσχέτιση του μοντέλου έκφρασης του γονιδίου KAL και φαινοτυπικών εκδηλώσεων συνδρόμου Kallmann.

<i>Ιστική έκφραση γονιδίου KAL</i>		<i>Κλινικές εκδηλώσεις συνδρόμου Kallmann</i>
οσφρητικός βολβός	→	ανοσμία / υποσμία
παρεγκεφαλίδα	→	<ul style="list-style-type: none"> • παρεγκεφαλιδική αταξία • οπτικοκινητικός νυσταγμός
αμφιβληστροειδής	→	διαταραχές όρασης
μεσόνεφρος – μετάνεφρος	→	<ul style="list-style-type: none"> • νεφρική απλασία • αγενεσία σπερματικού πόρου
καταβολές άκρων	→	κοιλοποδία
οφθαλμοκινητικοί πυρήνες	→	Διαταραχή οφθαλμικής κινητικότητας
προσωπικό μεσέγχυμα εγκέφαλος	→	λυκόστομα / λαγόχειλος εκδηλώσεις ψυχικής σφαίρας

Πίνακας 3. Μεταλλάξεις στον υποδοχέα της GnRH.

Συγγραφέας	Περιοδικό	Εξόνιο	Αμινοξύ	Βάση
Beranova M	JCEM 86:1580-1588, 2001	1	32 Thr- Ile	95 C-T
		2	200 Cys-Tyr	599 G-A
Beranova M	JCEM 86:1580-1588, 2001	1	106 Gln-Arg	A-G
		3	266 Leu-Arg	797G-A
Beranova M	JCEM 86:1580-1588, 2001	3	279 Cyst-Tyr	836G-A
Beranova M	JCEM 86:1580-1588, 2001	1	106 Gln-Arg	317 A-G
	JCEM 84:567-572, 1999	3	262 Arg-Gln	G-A
De Roux N	NEJM 22:1597-1602, 1997			
Beranova M	JCEM 86:1580-1588, 2001	1	32 Thr-Ile	
		2	200 Cys-Tyr	
Pitteloud N	JCEM 86:2470-2475, 2001	1	106 Gln-Arg	317 A-G
Pralong FP	JCEM 84:381-3816, 1999		168 Ser-Arg	504 A-T
Costa EMF	JCEM 86:2680-2686, 2001	1	139 Arg-His	416G-A
Costa EMF	JCEM 86:2680-2686, 2001	1	10 Asn-Lys	A-T
		1	106 Gln-Arg	317 A-G
Kottler ML	JCEM 85:3002-3008, 2000	1	106 Gln-Arg-	317G-A
		3	314 Leu-stop	941T-A

Πίνακας 4. Πολυμορφισμοί στον υποδοχέα της GnRH.

Συγγραφέας	Περιοδικό	Εξόνιο	Αμινοξύ	Βάση
Beranova M	JCEM 86:1580-1588, 2001		262 Arg-Gln	
Beranova M	JCEM 86:1580-1588, 2001	2	247 His	741 C-T
Beranova M	JCEM 86:1580-1588, 2001	1	106 Gln-Arg σε υγιή	317 A-G
Kottler ML	JCEM 85:3002-3008, 2000		151Ser	453 C-A

Πίνακας 5. Αδυναμία πρόκλησης εφηβείας με κατά ώσεις χορήγηση GnRH και επιτυχής διέγερση με γοναδοτροφίνες σε άνδρα ασθενή με ΙΥΥ και αντίσταση στην GnRH.

	LH (mU/ml)	FSH (mU/ml)	Τεστοστερόνη (ng/ml)	Ελ.Τεστοστερόνη (ng/dl)
GnRH (300ng/kg/2h)	0.01	0.01	0.1	1.5
hCG (2500IUx3/εβδ)	-	-	3.4	18.8

Πίνακας 6. Πρόκλησης σπερματογένεσης με γοναδοτροφίνες (μετά 20 και 27 μήνες θεραπείας) και με κατά ώσεις GnRH (μετά 9 μήνες θεραπείας).

Όγκος	4 ml	3 ml	7 ml
Αριθμός/ml	4.25 εκατ	1 εκατ	2.5 εκατ
Ολικός Αριθμός	17 εκατ	3 εκατ	14.5 εκατ
Ζωηρά	8%	10%	35%
Νωθρά	30%	50%	30%
Ακίνητα	62%	40%	35%
Ζώντα	100%	100%	88%
Νεκρά	0%	0%	12%
Άρτια	52%	65%	92%
Ανώμαλα	48%	35%	8%
Θεραπεία	LH-FSH	LH-FSH	GnRH
Διάρκεια θεραπείας	20 μηνες	27 μηνες	9 μηνες
Τεστοστερόνη	10 ng/ml	8.5 ng/ml	3.5 ng/ml

Πίνακας 7. Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας με GnRH και γοναδοτροφίνες.

Α. Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας με LH/FSH (150 IU/ημέρα).					
Χρόνος (ημέρες)	0	18 ^η	21 ^η	25 ^η	27 ^η
E2 (pg/ml)	32	98	112	145	126
Ανάπτυξη ωοθυλακίου	-	6 -7 mm	13 mm	19 mm	ωορρηξία
Ενδομήτριο	-	-	<5 mm	-	12 mm
Β. Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας με GnRH (150 ng/kg/60-120 min.).					
Χρόνος (ημέρες)	0	7 ^η	14 ^η	15 ^η	18 ^η
E2 (pg/ml)	11	25	45	100	246
Ανάπτυξη ωοθυλακίου	-	12 mm	18 mm	19 mm	ωορρηξία
Ενδομήτριο	-	9 mm	11 mm	12 mm	14 mm

Πίνακας 8. Ειδικοί ιντρονικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers), συνθήκες πρόσδεσης και μέγεθος κάθε απομονωθέντος τμήματος του γονιδίου KAL.

Exon	temperature (°C)		product (bp)	Primers (5'- 3')
	Annealing	DMSO	Amplified	
1 (coding)	63	10%	329	CCTCGCCTCGCCCTCGACCCGCAG GAACTTTGCGAGCCCAGGCTGGGAG
2	58	10%	230	TTGGAAGGGAAGGACAGCAGG GCACCATTTCATACAGGTATAG
3	58	10%	174	TCTCAGCTTTGTTTGTTTCCA CGTAAGCATAGTCAGATTTGG
4	55	-	334	ATGTCTTGGAATCAGACTTC ATGTGACACTGCATGTGTCTT
5	55	-	267	CAGATTGTTTTAATTGATACG GCAGACACTACCTCCAGGATG
6	55	-	218	AGTGACATGTTCCCTGTGCTC CTGGTAGCAAGGATAGTATTC
7	55	-	269	ATGATGTGTCTTTGTACTGGG TGGAATAACAATCCTTCCTC
8	55	-	237	GACGTGGAAGGTTTGTAACGC ATCATGTCACAATCATCTTGA
9	55	-	266	TGCCCAGGAATCTATAATTAC ACTATCTCTATATTACTGTGC
10	55	-	293	ACCTGGAATGTAACATCCAGC ACCATTCTGCTTCCACTTCC
11	55	-	272	AATATGATTTCAATTCTTGCC GATGTAGAAGTCCTTCAGGTG
12	55	-	302	TCTCCAGTCGCCTAATCCTGG CCAATGACACAGACATAGTAC
13	55	-	241	GTGCATTGCATGTTGTCTCTG TGACAGGATGGCTTAATGCCC
14 (coding)	55	-	147	ATGTTACTGACATATTTTGTG GGCCGAAGTTCAACAAGCTTA

Πίνακας 9. Ειδικοί ιντρονικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers), συνθήκες πρόσδεσης και μέγεθος κάθε απομονωθέντος τμήματος των γονιδίων της GnRH, του υποδοχέα της GnRH και των υποκινητών τους.

GnRH + Υποκινητής	Αλληλουχία εκκινητή	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Θερμοκρασία πρόσδεσης (°C)
1S	GCTCCCAGACATCCTGAC	565	58
1A	CGTCACACCTGGATTTAGCC	565	58
2S	GGGTTAGTGATACAGATGCTAGCTT	265	55
2A	GGCTATCCTGAATGTTTAATATAGTTA	265	55
3S	AGTCCCTATGCTAATCCTGCAACTT	275	55
3A	AGGTAGCTGTCCTAAGTGATCCCCA	275	55
4S	CTCCCTAGCACTAACTAGAGCACAA	361	55
4A	CTCCCTTTGGTGGGTTTACAGTGATC	361	55
Υποδοχέας GnRH +υποκινητης	Αλληλουχία εκκινητή	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Θερμοκρασία πρόσδεσης
Pf1	TACCTACCGTATATTACTCC	1324	54
Pr1	GATCATTTCAAATTGGGACC	1324	54
Pf2	ATTGTACCTGCTTTGGCTGC	1295	57
Pr2	GGACTGTAATGTTCCACATCC	1295	57
2GS	CCACTCTGACCTTGTCTGGAAAG	320	52
2GA	AGCTTTAGATAACTGAGAACTTTGC	320	52

3GS	AAACATCTGACCTTAGCCAACCTG	485	54
3GA	CAAGGTAACAGAACAGAGCCAGAA	485	54
4GS	AGGAGCTTAGAAATTGCTTTAGGTA	425	52
4GA	TGCTATTTAAAACTGCCCACAA	425	52
5GS	GCTGTCTTCCTTTTTGTCCACTTTG	246	52
5GA	CAATACCAAATCCTAGGACATAG	246	52
6GS	CACTTCATTTACTGTCTGCTGGAC	257	52
6GA	ATTCATTACCTTACCCTTCTTCATA	257	52

Πίνακας 10. Μεταλλάξεις στα γονίδια της GnRH και του υποδοχέα της GnRH σε ασθενείς με ΙΥΥ.

	Μετάλλαξη	Αλλαγή αμινοξέους	No Ασθενων	Γονίδιο
1	tgg→tcg	Trp16Ser	4 (1 ομοζυγη-3 ετεροζυγες)	GnRH (εξόνιο 2)
2	ccc→tcc	Pro146Ser	2 (δυο αδελφες)	Υποδοχέας GnRH (εξόνιο 2)
3	agc→agt	Ser 151Ser	1	Υποδοχέας GnRH (εξόνιο 2)

Εικόνα 1. Η θεωρία του Fukuda της μετανάστευσης των νευρώνων της GnRH

Εικόνα 2 . Το γονίδιο KAL

Εικόνα 3 . Μεταλλάξεις του γονιδίου KAL

Εικόνα 4. Εντοπισμός του γονιδίου FGFR-1 στη περιοχή 8p11.2

Εικόνα 5. Μεταλλάξεις του γονιδίου FGFR-1 και συσχετίσεις τους με κλινικές εκδηλώσεις συνδρόμου Kallmann.

Table 1 • Mutations in <i>FGFR1</i> associated with Kallmann syndrome		
Mutation	Exon/Intron	Kallmann syndrome associated symptoms
G97D	exon 3	
Y99C	exon 3	
303-304insCC	exon 3	
A167S	exon 5	cleft palate, corpus callosum agenesis, unilateral hearing loss, fusion of the fourth and fifth metacarpal bones
C277Y	exon 7	
936G→A	exon 7 (donor splice site)	multiple dental agenesis
V607M	exon 13	bimanual synkinesis
R622X	exon 14	cleft lip or palate
1970-1971delCA	exon 14	
W666R	exon 15	cleft palate
IVS15+1G→A	intron 15 (donor splice site)	
M719R	exon 16	
P772S	exon 18	cleft palate, unilateral absence of nasal cartilage, iris coloboma

Εικόνα 6Α. Το γονίδιο της GnRH και ο υποκινητής του.

Εικόνα 6Β. Το γονίδιο του υποδοχέα της GnRH και ο υποκινητής του.

Εικόνα 7. Ο υποδοχέας της GnRH

Εικόνα 8 . Ο υποδοχέας της GnRH και η ενδοκυτάρια μετάδοση του σήματος

Εικόνα 9. Μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα της GnRH

Εικόνα 10. Εντοπισμός του γονιδίου GPR54 στη θέση 19p13.3

Εικόνα 11 . Αντλία κατά ώσεις χορήγησης GnRH

Εικόνα 12. Παράδειγμα PCR και Cycle sequencing ενός εξωνίου του γονιδίου του υποδοχέα της GnRH

Εικόνα 13. Η μετάλλαξη PRO 146 SER στο υποδοχέα της GnRH στις δύο ασθενείς και στη μητέρα τους

Ασθενείς

Μητέρα

Εικόνα 14. Έκκριση LH ανά 10 λεπτά των ασθενών με αντίσταση στη δράση της GnRH

Εικόνα 15. SCL-90 (Ψυχοπαθολογία) ασθενών με ανεπάρκεια GnRH.

Εικόνα 16. MPPI (Διάγραμμα προσωπικότητας) ασθενών με ανεπάρκεια GnRH.

**Εικόνα 17. HDHQ (Μέγεθος της Επιθετικότητας και Κατεύθυνσή της)
ασθενών με ανεπάρκεια GnRH.**

Εικόνα 18. DSQ-1 (Αμυντικό προφίλ) ασθενών με ανεπάρκεια GnRH.

Εικόνα 19. DSQ/DMRS (Μηχανισμοί Άμυνας του Εγώ) ασθενών με ανεπάρκεια GnRH.

Εικόνα 20. DSQ/DMRS (Μηχανισμοί Άμυνας του Εγώ) ασθενών με ανεπάρκεια GnRH.

Εικόνα 21. MPPI ασθενούς με σύνδρομο Kallmann και σχιζοφρένια συγκριτικά με ασθενείς με σύνδρομο Kallmann και μη εμφανή ψυχική νόσο.