

**T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI BİLİM DALI BAŞKANLIĞI**

**İDİYOPATİK HİPOGONADOTROPİK HİPOGONADİZMLİ
ERKEK HASTALARDA KAL1, GNRH1, GNRHR, PROK2 VE
PROKR2'NİN MULTİPLEKS LİGASYON BAĞIMLI PROB
AMPLİFİKASYON (MLPA) YÖNTEMİYLE ANALİZİ**

**Yalçın BAŞARAN
Dz. Tbp. Yzb.**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**ANKARA
2009**

**T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI BİLİM DALI BAŞKANLIĞI**

**İDİYOPATİK HİPOGONADOTROPİK HİPOGONADİZMLİ
ERKEK HASTALARDA KAL1, GNRH1, GNRHR, PROK2 VE
PROKR2'NİN MULTİPLEKS LİGASYON BAĞIMLI PROB
AMPLİFİKASYON (MLPA) YÖNTEMİYLE ANALİZİ**

Yalçın BAŞARAN
Dz. Tbp. Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Askeri Tıp Fakültesi'nin
İç Hastalıkları Tıp Uzmanlığı
için öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Erol BOLU
Doç. Tbp. Kd. Alb.

ANKARA
2009

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığına;

“İdiyopatik Hipogonadotropik Hipogonadizimli Erkek Hastalarda KAL1, GnRH1, GnRHR, PROK2 ve PROKR2’nin Multipleks Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyon (MLPA) Yöntemiyle Analizi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından İç Hastalıkları Bilim Dalı’nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Doç. Tbp. Kd. Alb. Erol BOLU

Üye : Prof. Tbp. Tuğg. Mustafa KUTLU

Üye : Prof. Tbp. Tuğg. Tahir ÜNAL

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Kenan SAĞLAM

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Refik MAS

Üye : Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb. Çağatay ÖKTENLİ

Üye : Doç. Dz. Tbp. Kd. Alb. M. Fatih BULUCU (Yd.)

Üye : Doç. Tbp. Kd. Alb. Bayram KOÇ (Yd.)

ONAY:

Dz. Tbp. Yzb. Yalçın BAŞARAN’ın 25/12/2009 tarihinde savunduğı bu tez Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

M. Zeki BAYRAKTAR

Prof. Tbp. Tümgeneral

GATA Komutanı Bilimsel Yardımcısı

Askeri Tıp Fakóltesi Dekanı ve Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı İç Hastalıkları B.D. 31/10/2006 gün ve 0530-161-06/450 sayılı kararı gereği İç Hastalıkları Bilim Dalı Başkanlığı'nda yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında Kallmann Sendromu ve normosmik İdiyopatik Hipogonadotropik Hipogonadizmin patogeneğinde rol oynayan KAL1, GnRH1, GnRHR, PROK2 ve PROKR2 genlerindeki mutasyonların sıklığının saptanması ve genotip-fenotip arasındaki ilişkinin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu mutasyonların ortaya konması ile üremeyele ilgili basamakların daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır.

Konunun belirlenmesi ve çalışmanın yürütülmesinde yardım ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Doç. Tbp. Kd. Alb. Erol BOLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim boyunca iyi bir hekim olarak yetişmem için değerli katkılarını esirgemeyen başta İç Hastalıkları B.D. Başkanı sayın Prof. Tbp. Kd. Alb. Kenan SAĞLAM olmak üzere, Prof. Tbp. Tuğg. Mustafa KUTLU'ya, Prof. Tbp. Tuğg. M. Tahir ÜNAL'a, Prof. Tbp. Kd. Alb. M. Refik MAS'a, Doç. Tbp. Kd. Alb. Bayram KOÇ'a, Doç. Dz. Tbp. Kd. Alb. M. Fatih BULUCU'ya, Doç. Tbp. Yb. Alper SÖNMEZ'e, Doç. Tbp. Yb. Teoman DOĞRU'ya, Doç. Tbp. Kd. Bnb. İlker TAŞÇI'ya, Yrd. Doç. Dz. Tbp. Kd. Bnb. Gökhan ERDEM'e, tüm asistan arkadaşlarıma ve İç Hastalıkları B.D. klinik personeline teşekkürlerimi arz ederim.

Çalışmanın gerçekleşmesinde yardım ve desteklerini esirgemeyen İmmünoloji A.B.D. Başkanı Doç. Tbp. Alb. Uğur MUŞABAK'a, biyolog Rahşan Ilıkçı SAĞKAN'a, Tıbbi Biyokimya A.B.D. Başkanlığı'ndan Doç. Tbp. Kd. Alb. Taner ÖZGÜRTAŞ'a, Endokrinoloji B.D. Başkanlığı klinik personeline, Geriatri B.D. Başkanlığı'ndan Uzm. Tbp. Kd. Yzb. Mehmet İlkin NAHARCI'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yalçın BAŞARAN

Dz. Tbp. Yzb.

ÖZET

İdiyopatik Hipogonadotropik Hipogonadizimli Erkek Hastalarda KAL1, GnRH1, GnRHR, PROK2 ve PROKR2'nin Multipleks Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyon (MLPA) Yöntemiyle Analizi

Hipogonadizm, gonadotropin sekresyon bozukluğuna (hipogonadotropik hipogonadizm) veya primer testiküler yetmezliğine (hipergonadotropik hipogonadizm) bağlı, gonadal hormonların üretiminde bozukluk olarak tanımlanır. Bunların ayırımı serum gonadotropin konsantrasyonlarının ölçümü ile yapılmaktadır. Subnormal testosteron düzeyleri olan bir bireyde serum LH ve FSH konsantrasyonları normalin üzerindeyse hipergonadotropik hipogonadizmden, serum LH ve FSH konsantrasyonları normal veya azalmış ise hipogonadotropik hipogonadizmden bahsedilir. Hipogonadotropik hipogonadizm anosmi veya hiposmi ile ilişkili olabileceği gibi (Kallmann sendromu), normal koku duyusu ile de ilişkili olabilir (normosmik hipogonadotropik hipogonadizm). Klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalıktır.

Günümüze kadar, hastalığın nedeni olarak bir dizi mutasyon tanımlanmıştır. Ancak bunlar, tüm idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizimli hastaların sadece %10-20'sinin moleküler temelini oluşturmaktadırlar, ki bu da keşfedilmesi gereken ilave genlerin olduğunu düşündürmektedir.

Hipogonadotropik hipogonadizimli 86 erkek hasta (76'sı normosmik idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizimli ve 10'u Kallmann sendromlu) ve 95 sağlıklı kontrol KAL1, GnRH1, GnRHR, PROK2 ve PROKR2 gen mutasyonları yönünden araştırıldı. Beyaz kan hücrelerinden bütün katılımcıların DNA'ları standart teknikler kullanılarak izole edildi. 125 ng DNA, MLPA kitinin prob setleri ile bir gece boyunca hibridize edildi. Hibridizasyonun ardından, bir ligasyon reaksiyonu ve 35 döngülük PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri, kapiller elektroforez aracılığıyla ayrıştırıldı ve bir yazılım programı yardımıyla fragment analizi yapıldı. Her fragmentin pik alanı kontrol grubundakilerle karşılaştırıldı.

Çalışmamızda, Kallmann sendromlu 3 farklı hastada KAL1 geninin 9. ekzonunda heterozigot delesyon ve bu hastaların birinde KAL1 geninin 11. ekzonunda ilave olarak bir duplikasyon saptandı. Ayrıca, normosmik idiopatik hipogonadotropik hipogonadizmlili 3 farklı hastada, PROK2 geninin 3. ekzonunda duplikasyon, GnRHR geninin 2. ekzonda heterozigot delesyon ve aynı genin 1. ekzonunda duplikasyon tespit edildi. Çalışmaya dahil edilen hasta grubunda PROKR2 ve GnRH1 genlerinde mutasyon saptanmadı. Ayrıca, bu mutasyonların hiç biri sağlıklı kontrol grubunda gösterilemedi.

Hastalığın genetik temelini tanımlamak, bu kompleks bozukluğu daha iyi kavramamıza yardımcı olması yanında, genetik danışma ve tedaviyi yönlendirmek amacıyla zorunludur. Ayrıca, genetik mutasyonlar ile hastalık arasındaki ilişkiyi ortaya koymak, normal üreme fonksiyonunu daha iyi anlamamız açısından önemlidir. İlave genetik defektleri aydınlatabilmek için, hipotalamo-hipofizer gelişimini ve fonksiyonlarını düzenleyen genlerle ilgili, daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler : Normosmik İdiopatik Hipogonadotropik Hipogonadizm, Kallmann Sendromu, KAL1, GnRH1, GnRHR, PROK2, PROKR2, mutasyon

Destekleyen Kurumlar : Bu çalışma GATA Komutanlığı Bilimsel Araştırma Kurulu tarafından desteklenmiştir (Proje No: AR-2008/68).

Yazar : Dz. Tbp. Yzb. Yalçın BAŞARAN

Danışman : Doç. Tbp. Kd. Alb. Erol BOLU

SUMMARY

Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) Analysis of KAL1, GnRH1, GnRHR, PROK2 and PROKR2 in Male Patients with Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism

Hypogonadism is defined as the failure in production of gonadal hormones, which may be due to lack of gonadotropin secretion (hypogonadotropic hypogonadism) or due to primary testicular failure (hypergonadotropic hypogonadism). The distinction between these disorders is made by the measurement of the serum concentrations of gonadotropins. An individual with subnormal testosterone levels has hypergonadotropic hypogonadism if the serum LH and FSH concentrations are above normal and has hypogonadotropic hypogonadism if the serum LH and FSH concentrations are normal or reduced. Hypogonadotropic hypogonadism may be associated with anosmia or hyposmia (Kallmann syndrome), or with a normal sense of smell (normosmic hypogonadotropic hypogonadism). This is a clinically and genetically heterogeneous disease.

To date, several mutations have been identified as the underlying cause of disease. However, they account for the molecular basis of only 10-20% of all patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, which suggest that additional genes need to be discovered.

86 unrelated males with hypogonadotropic hypogonadism (76 diagnosed with normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and 10 with Kallmann syndrome) and 95 healthy control individuals were studied for the presence of KAL1, GnRH1, GnRHR, PROK2 and PROKR2 mutations. DNA was extracted from white blood cells in all participants using standard techniques. A total of 125 ng of DNA was hybridized overnight to the probe sets of the MLPA kits. Following hybridization, a ligation reaction and 35 cycles of PCR amplifications were performed. The amplification products were separated by capillary electrophoresis and the fragment analysis was performed using a software program. Peak areas for each fragment were compared with those of the control group.

In the present study, we detected a heterozygous deletion of the KAL1 gene in exon 9 in three different patients with Kallmann syndrome. Additionally, one of these patients also carried a duplication of exon 11. Furthermore, we found a duplication of the PROK2 gene in exon 3, a heterozygous deletion of the GnRHR gene in exon 1 and a duplication of the same gene in exon 2 in three patients with normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. No abnormalities were found in the patient group for the PROKR2 and GnRH1 genes. In addition, no mutations were identified in the healthy control individuals for the described genes.

Defining the genetic basis of disease is essential to improve our understanding of this complex disorder, and can be useful for genetic counseling and for directing therapy. In addition, discovery the association between genetic mutations and disease is important for our better understanding of normal reproductive function. Further studies of genes that regulate hypothalamic-pituitary development and functions should be carried out to clarify the additional genetic defects.

Key words : Normosmic Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism, Kallmann Syndrome, KAL1, GnRH1, GnRHR, PROK2, PROKR2, mutation

Supported by : The study was supported by Gulhane Military Medical Academy Scientific Research Fund (Project No: AR-2008/68).

Author : Yalçın BAŞARAN, M.D.

Counsellor : Erol BOLU, Assoc.Prof.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Puberte	3
2.1.1. Puberte Sırasında Gözlenen Fiziksel Değişiklikler	3
2.1.2. Erkeklerde Gelişim	5
2.2. Erkekde Hipotalamo-Hipofizer-Testiküler Aks	5
2.3. Gonadotropin Sekresyonunun Geri Besleme Mekanizması ile Kontrolü	6
2.4. Androjen Sentezi, Transportu, Metabolizması ve Fonksiyonu	7
2.5. Germinal Hücreler ve Spermatogenez	8
2.6. Erkek Genital Sistemle İlgili Laboratuvar	9
2.6.1. Semen Analizi	9
2.6.2. Biyokimyasal Testler	9
2.6.3. Dinamik Testler	10
2.6.3.1. Korionik Gonadotropin (hCG) Uyarı Testi	10
2.6.3.2. Klomifen Sitrat Uyarı Testi	10
2.6.3.3. Gonadotropin Serbestleştirici Hormon (GnRH) Uyarı Testi	10
2.6.4. Görüntüleme Yöntemleri	11
2.6.4.1. Testiküler USG	11
2.6.4.2. Hipofiz MR	11
2.6.5. Testiküler Biyopsi	11

2.6.6. Genetik Testler	11
2.7. Hipogonadotropik Hipogonadizm	12
2.7.1. Kazanılmış Hipogonadotropik Hipogonadizm	13
2.7.2. Konjenital Hipogonadotropik Hipogonadizm	14
2.7.2.1. KAL1 Gen Mutasyonu	14
2.7.2.2. FGFR1 Gen Mutasyonu	15
2.7.2.3. NELF1 Gen Mutasyonu	15
2.7.2.4. PROKR2 ve PROKR2 Gen Mutasyonları	15
2.7.2.5. KISS1/GPR54 Gen Mutasyonu	16
2.7.2.6. NROB1/DAX1 ve NR5A1/SF1 Gen Mutasyonları	16
2.7.2.7. GnRH1 ve GnRHR Gen Mutasyonları	16
2.7.2.8. LEP, LEPR ve PCSK1 Gen Mutasyonları	17
2.7.2.9. LHB ve FSHB Gen Mutasyonları	17
2.7.2.10. PROP1 Gen Mutasyonu	17
2.7.2.11. HESX1 Gen Mutasyonu	18
2.7.2.12. GSX1 Gen Mutasyonu	18
2.7.2.13. SOX2 ve SOX3 Gen Mutasyonları	18
2.7.2.14. LHX3 ve LHX4 Gen Mutasyonları	19
2.7.2.15. CHD7 Gen Mutasyonu	19
GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Hasta ve Kontrol grubu	20
3.2. Biyokimyasal Testler	27
3.2.1. Hormon Ölçümleri	27
3.2.2. GnRH Uyarı Testi	27
3.2.3. Genetik Testler	28
3.2.3.1. DNA Denatürasyonu ve Salsa MLPA Problarının Hibridizasyonu	28
3.2.3.2. Ligasyon Reaksiyonu	28
3.2.3.3. PCR Reaksiyonu	28
3.2.3.4. Elektroforez ile Amplifikasyon Ürünlerinin Ayrılması	29
3.2.3.5. MLPA Data Analizi	29
3.2.3.6. MLPA Reaksiyonu	30

BULGULAR	33
TARTIŞMA	37
SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
α	: Alfa
β	: Beta
IU	: İnternasyonel Ünite
kb	: Kilobayt
L	: Litre
μ g	: Mikrogram
μ L	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mIU	: Mili İnternasyonel Ünite
mL	: Mililitre
ng	: Nanogram
nmol	: Nanomol
pg	: Pikogram
pmol	: Pikomol
rpm	: Dakikada Tekrar Sayısı
°C	: Santigrad Derece
ACTH	: Adreno Kortiko Trofik Hormon
AİDS	: Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu
cAMP	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
CHD7	: <i>Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 7</i>
CV	: Ölçüm Aralığı
DAX1	: <i>Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 1, NROB1</i>
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FAM	: Flor Antil Maleimid
FGFR1	: <i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>

FSH	: Follikül Uyarıcı Hormon
FSHB	: <i>Follicle Stimulating Hormone Beta Polypeptide</i>
GH	: Büyüme Hormonu
GnRH	: Gonadotropin Serbestleştirici Hormon
GnRH1	: <i>Gonadotropin-Releasing Hormone 1</i>
GnRHR	: <i>Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor</i>
GPR54	: <i>G Protein-Coupled Receptor 54</i>
GSX1	: Genomic Screened Homeobox 1
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
HCL	: Hidroklorür
HESX1	: <i>HESX Homeobox 1, Homeobox Gene Expressed In ES Cells</i>
İHH	: İdiyopatik Hipogonadotropik Hipogonadizm
KAL1	: <i>Kallmann Syndrome 1 Sequence</i>
KİSS1	: <i>Kisspeptin 1</i>
KS	: Kallmann Sendromu
LEP	: <i>Leptin</i>
LEPR	: <i>Leptin Receptor</i>
LH	: Luteinize Edici Hormon
LHB	: <i>Luteinizing Hormone Beta Polypeptide</i>
LHX3	: <i>LIM Homeobox 3</i>
LHX4	: <i>LIM Homeobox 4</i>
MAPK	: Mitojenin Aktive Ettiği Protein Kinaz
MLPA	: Multipleks Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyon
MRG	: Magnetik Rezonans Görüntüleme
NELF1	: <i>Nasal Embryonic LHRH Factor 1</i>
nİHH	: Normozmik İdiyopatik Hipogonadotropik Hipogonadizm
NR5A1	: <i>Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1</i>
NROB1	: <i>Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 1</i>
nt	: Nükleotid
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCSK1	: <i>Proprotein Convertase Subtilisin / Kexin Type 1</i>
PRL	: Prolaktin

PROP1	: <i>Prophet of Pit1, Paired-Like Homeobox 1</i>
PROK2	: <i>Prokineticin 2</i>
PROKR2	: <i>Prokineticin Receptor 2</i>
RIA	: Radio İmmüno Assay
SF1	: <i>Steroidogenic Factor 1</i>
SHBG	: Seks Hormon Bağlayıcı Globülin
SOX2	: <i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2</i>
SOX3	: <i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 3</i>
TE	: Tris Etilen Diamin Tetra Asetat
TSH	: Tiroid Uyarıcı Hormon
UPSİT	: Pensilvaniya Üniversitesi Koku Tanımlama Testi
USG	: Ultrason Görüntüleme
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
4.1. 29 no'lu hastada KAL1 geninin 9. ekzonunda KAL1 probu 5941 L05940 hedef dizisinde heterozigot delesyon	34
4.2. 81 no'lu hastada KAL1 geninin 9. ekzonunda KAL1 probu 5941 L05940 hedef dizisinde heterozigot delesyon ve 11. ekzonunda KAL1 probu 4427 L03813 hedef dizisinde duplikasyon	34
4.3. 84 no'lu hastada KAL1 geninin 9. ekzonunda KAL1 probu 5941 L05940 hedef dizisinde heterozigot delesyon	35
4.4. 43 no'lu hastada PROK2 geninin 3. ekzonunda PROK2 probu 11953 L12773 hedef dizisinde duplikasyon	35
4.5. 65 no'lu hastada GnRHR geninin 2. ekzonunda GnRHR probu 4447 L05586 hedef dizisinde heterozigot delesyon	36
4.6. 76 no'lu hastada GnRHR geninin 1. ekzonunda GnRHR probu 4445 L03831 hedef dizisinde duplikasyon	36

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Hasta Grubunun Biyokimyasal ve Genetik Özellikleri	21
3.2. Kontrol Grubunun Biyokimyasal ve Genetik Özellikleri	24
3.3. Hormon Ölçümünde Kullanılan Kitlerin Ölçüm Aralıkları	27
3.4. KAL1 Gen Probenin Özellikleri	31
3.5. GNRH1 Gen Probenin Özellikleri	31
3.6. GNRHR Gen Probenin Özellikleri	32
3.7. PROK2 Gen Probenin Özellikleri	32
3.8. PROKR2 Gen Probenin Özellikleri	32

GİRİŞ

Hipogonadizm, yetersiz gonadal fonksiyon olarak tanımlanır. Hipotalamik ya da hipofizer düzeyde bozukluk sonucu ortaya çıkarsa sekonder hipogonadizmden, testiküler bozukluk sonucu ortaya çıkarsa primer hipogonadizmden bahsedilir.

Pulsatil gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH), gonadotropin üzerindeki GnRH reseptörlerine etki ederek, gonadotropin gen ekspresyonunu, hormon sentezini ve sekresyonunu stimüle etmektedir. Hipofizer gonadotropinler, luteinize edici hormon (LH) ve follikül uyarıcı hormon (FSH), erkeklerde ve kadınlarda steroid üretiminde ve gametogenezde görev alır. Gonadotropin üretimi, hipotalamik GnRH üreten nöronların ve hipofizer gonadotrop hücrelerin normal gelişim ve fonksiyonlarını gerektirmektedir. Bu akstaki bozulma hipogonadotropik hipogonadizm olarak karşımıza çıkmaktadır. Hipotalamo-hipofizer aksın radyolojik görüntülemesinin ve ön hipofizin diğer endokrin fonksiyonlarının normal olduğunun gösterilmesi ile idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (İHH) tanısı konmuş olur. İHH'de koku duyusu korunmuş olabileceği gibi, bozulmuş da olabilir. Anosmi veya hiposminin eşlik ettiği bu tabloya Kallmann sendromu (KS) denir. KS, İHH'in konjenital formudur.

Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, GnRH ve gonadotropin sentez ya da sekresyonunu bozarak gonadotropin eksikliğine yol açan bir dizi genetik kusur tanımlanmıştır. İHH'li hastaların yaklaşık olarak %5-10'unu oluşturan bu mutasyonlar dört başlık altında özetlenebilir: GnRH nöronlarının migrasyonu ve fonksiyonunu bozanlar (*Kallmann Syndrome 1 Sequence*, KAL1; *Fibroblast Growth Factor Receptor 1*, FGFR1; *Nasal Embryonic LHRH Factor 1*, NELF1; *Prokineticin 2*, PROK2 ve *Prokineticin Receptor 2*, PROKR2 mutasyonları); GnRH sentez ve sekresyonunu bozanlar (*Gonadotropin-Releasing Hormone 1*, GnRH1; *Kisspeptin 1*, KISS1; *G Protein-Coupled Receptor 54*, GPR54; *Steroidogenic Factor 1*, SF1; *Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 1 (NROB1)*, DAX1; *Leptin*, LEP ve *Leptin Receptor*, LEPR mutasyonları); GnRH'ya hipofizer düzeyde cevabı

bozanlar (*Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor*, GnRHR mutasyonu) ve gonadotropin biyosentezini bozanlar (*Luteinizing Hormone Beta Polypeptide*, LHB; *Follicle Stimulating Hormone Beta Polypeptide*, FSHB; *Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 1 (NROB1)*, DAX1 ve *Steroidogenic Factor 1*, SF1 mutasyonları). Bu gen defektlerindeki her bir bozukluk farklı fenotipik veya hormonal özellikler ile ilişkilidir.

Çalışmamızda, üreme ile ilgili basamakların daha iyi anlaşılması amacıyla, KS ve normosmik idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizmin (nİHH) patogenezinde rol oynayan KAL1, GnRH1, GnRHR, PROK2 ve PROKR2 genlerindeki mutasyonların sıklığının saptanması ve genotip-fenotip arasındaki ilişkinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Hipogonadotropik hipogonadizimli 86 erkek hasta (76'sı nİHH'li ve 10'u KS'lu) ile fizik muayene ve laboratuvar sonuçları normal olarak değerlendirilen 95 sağlıklı katılımcı çalışmaya dahil edildi. Genomik delesyon ve duplikasyonların saptanmasında geleneksel yöntemlere göre daha hassas olduğundan MLPA (multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu) yöntemi tercih edildi.

GENEL BİLGİLER

2.1. Puberte

Puberte, seksüel üreme kapasitesinin kazanıldığı dönemdir. Puberte sırasında gözlenen fiziksel değişiklikler boyun ve ağırlığın hızla artışı, ikincil seks karakterlerinin gelişimi, yağ ve kas dokularının dağılımının ve miktarının değişmesi şeklinde sıralanabilir. Sonuç olarak puberte tamamlandığında birey yetişkin görünümü kazanmış olur. Puberte terimi ile genellikle karıştırılan adölesans terimi ise, çocukluk döneminin sonundan erişkinliğe kadar uzanan tüm fiziksel, seksüel ve psikolojik evreleri kapsamaktadır. Kısaca, puberteden farklı olarak, bireyin yetişkin gibi düşünmesi ve davranması ile sonuçlanan psikososyal değişiklikleri içermektedir (1, 2).

Pubertenin tamamlanması bireyden bireye farklılık gösterir ve başlama yaşı büyük ölçüde genetik faktörlerce belirlenmektedir. Puberteyi etkileyen diğer önemli faktörler ise beslenme ve iklim gibi çevresel faktörler, etnik özellikler, fiziksel ve ruhsal stresler ile her türlü hastalık durumudur (2). Bu süreç aynı yaştaki çocuklarda fiziksel açıdan farklı görünümlere neden olabilir.

2.1.1. Puberte Sırasında Gözlenen Fiziksel Değişiklikler

Erkek çocuklarda pubertenin ilk fiziksel bulgusu testis hacimlerinin artmasıdır. Testis volümünün 4 ml'nin üzerine çıkması ya da uzun aksının 2,5 cm veya üzerinde olması puberteye girildiğini gösterir. Testis büyümesi ortalama olarak 12 yaşından önce başlar, ancak 9,5 yaşından itibaren gözlenebilir (1, 2).

Bundak ve ark.'ları tarafından yapılan bir çalışmada 1975-1980 yılları arasında doğmuş ve yüksek sosyoekonomik düzeye sahip Türk erkek çocuklarında 4 ml ve üzerindeki testis volümüne ortalama $11,1 \pm 2,1$ yaşında ulaşıldığı ve 14 yaşındaki olguların %99,9'unda testis volümünün 4 ml ve üzerinde olduğu saptanmıştır (3).

Erkek çocuklarda testis hacimlerinin artması ile birlikte dış genital değişiklikler gözlenmeye başlar. Bu dönemde erektil dokunun boyu yaklaşık olarak 6.2 cm'den 13.2 cm'ye ulaşır. Dış genital değişiklikler 9 yaşından itibaren başlayabilmekle birlikte, 14 yaş veya sonrasına kadar infantil görünüm korunabilmektedir. Dış genital gelişiminin tamamlanması 5 yıl veya daha uzun sürebilir. Genellikle 13 yaşlarında tamamlanabilmekte, ancak bazı çocuklarda bu gelişim süreci 18 yaşına ve hatta daha ileri yaşa kadar devam edebilir. Diğer taraftan, bu gelişim süreci 2 yıldan kısa da olabilir. Ayrıca, pubertenin başlama yaşı ile dış genital değişikliklerinin gerçekleşme hızı arasında doğrudan bir ilişki yoktur.

Pubik kıllanma dış genital gelişiminin başlamasından hemen sonra oluşur, nadiren de öncesinde gözlenebilir. Bazı erkek çocuklarda ise dış genital gelişim 4. evreye ulaşana dek görülmeyebilir. Kınık ve ark.'ları tarafından 1987'de yapılan bir çalışmada, Türk erkek çocuklarında pubik kıllanmanın ortalama başlama yaşının $12,04 \pm 1,74$ olduğu saptanmıştır (4). Bundak ve ark.'larının pubik kıllanma için 2000 yılında bildirdikleri değer ise $12,3 \pm 0,9$ yaş ile benzerdir (3).

Aksiller kıllanma pubertenin ortalarında başlar ve bunu androjene duyarlı bölgelerde (yüz, göğüs, sırt, karın ve uylukların üst bölümü) kılların çıkması takip eder. Bundak ve ark.'ları, aksiller kılların $13,1 \pm 1,0$ yaşında gelişmeye başladığını bildirmişlerdir (3). Bu dönemde pubik kıllanma ve dış genital gelişim oldukça ilerlemiştir.

Sesin “çatlaması” genellikle aksiler kıllanma başladığında ve dış genital gelişim ilerlediğinde olur. Ses ortalama 14,5 yaşlarında “çatlamaya” başlar ve 1 yıl kadar sonra kalınlaşır.

Adölesan büyüme sıçraması erkek çocuğu erişkin boyutuna ulaştırır ve ikincil seks karakteristikleri sayılabilecek beden şekli değişiklikleri ile eş zamanlı olarak gerçekleşir. $14,9 \pm 1,6$ yaşında üst dudağın köşelerinde bıyık gelişimi başlar ve $16,2 \pm 1,3$ yaşında yanaklarda sakal gelişimi gözlenir. Çenede sakal, genellikle dış genital gelişim tamamlandıktan ve pubik kıllanma gelişimi başladıktan 3 yıl kadar sonra gözlenir. Neyzi ve ark.'ları

tarafından yapılan başka bir çalışmada, pubik kıllanma, aksiller kıllanma, bıyık ve sakal gelişimi ile ses kalınlaşmasının zamanlaması açısından sosyoekonomik farklılıkların etkili olduğu gösterilmiştir (5).

Spermatogenez histolojik olarak 11-15 yaş arasında başlayabilir. Erken sabah idrarında spermatozoa belirmesi spermarş olarak adlandırılır ve genellikle evre 3-4'te ortaya çıkar. Aristo 2000 yıl önce spermarşın 14 yaşında gerçekleştiğini "iki kere 7 yaşında olunca erkek tohum oluşturur" sözleriyle ifade etmiştir.

Erkek çocuklarının %75'inde pubertenin ilk evrelerinde değişen derecelerde jinekomasti ve akne gözlenebilir ancak, çoğu olguda meme dokusu 2 yıl içinde geriler.

2.1.2. Erkeklerde Gelişim

Tanner evreleri ile değerlendirilir. Bu değerlendirme yönteminde genital gelişim ve pubik gelişim ayrı ayrı yorumlanır. Ancak, genital bölge değerlendirilmesi görsel yöntemle olduğundan yanılğı payı mevcuttur.

2.2. Erkekde Hipotalamo-Hipofizer-Testiküler Aks

Erkek üreme fonksiyonu, hipotalamus, hipofizer bez ve testislerden oluşan geri besleme sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Median eminens'e yönelen aksonlarla preoptik alanda yerleşmiş hipotalamik nöronlar, hipotalamohipofizer şant ile hipofizer portal sistem içine pulsatil olarak GnRH salgırlar. GnRH sekresyonunda birçok hormon, nörotransmitter ve sitokin görev almaktadır. Ön hipofiz bezi gonadotropin sekresyonu için özelleşmiş olan gonadotropik hücreler içerir ve bu hücreler GnRH tarafından stimüle edilir (6). GnRH hipofizer gonadotropik hücrelerin yüzey reseptörlerine bağlanarak, kalsiyum bağımlı bir mekanizma ile cAMP'den bağımsız olarak gonadotropin salınımına neden olmaktadır (7). Hipofizer gonadotropinler tarafından sekrete edilen gonadotropinler, LH ve

FSH'dır. Gonadotropinlerin sekresyonu için GnRH'nın pulsatil olarak salınımı gereklidir. GnRH veya GnRH agonistlerinin sürekli olarak uygulanması LH ve FSH sekresyonunu baskılamaktadır. GnRH'ya ilave olarak, yapılan çalışmalarda dimerik peptid yapısındaki aktivinin de hipofizdeki lokal üretimini aracılığıyla FSH sekresyonunu uyardığı gösterilmiştir (8). LH ve FSH iki glikoprotein zincirinden oluşmaktadır. Her iki zincirin α subünitleri benzer olup, her iki hormonun farklı immünolojik ve fonksiyonel özellikleri β subünitleri tarafından belirlenir. FSH, Sertoli hücrelerini uyararak seminifer tübül epitelyumunda spermatogenezi uyarırken, LH interstisyumdaki Leydig hücrelerinden testosteron üretimini uyarır. FSH, Sertoli hücre membran reseptörlerine (9); LH, Leydig hücre membran reseptörlerine (10) bağlanmak suretiyle cAMP üretimini arttırarak ve protein kinazları aktive ederek bu fonksiyonları sergilemektedir. Testosteron üretime ve spermatogeneze ilave olarak, androjen bağlayıcı protein ve testosteronu östradiole dönüştüren aromataz enzimini (CYP19) de içeren bir dizi protein sentezlenmektedir (11).

Serum LH ve FSH düzeyleri 6-8 yaşlarında, testosteron düzeyi ise 10-12 yaşlarında artmaya başlar ve LH düzeyi erişkin dönemde 116 kat artış gösterir. GnRH'nın hipotalamustan pulsatil salınımı 12 yaş civarında oturmaya başlar. Puberte döneminde GnRH'nın pulsatil salınımı geceleri daha fazla olup, pineal bezden sekrete edilen melatonin hormonunun gece aktivitesinin azalmasına bağlıdır (12).

2.3. Gonadotropin Sekresyonunun Geri Besleme Mekanizması ile Kontrolü

Testosteron sekresyonu ve sperm üretim hızı ile üreme aksı arasında, negatif geri besleme mekanizması çok iyi bir şekilde düzenlenmiştir. Testosteron ve onun metaboliti olan östradiol birbirinden bağımsız olarak gonadotropin sekresyonunu düzenlerler. Erkeklerde, FSH sekresyonunun düzenlenmesinde östradiol testosterondan daha etkili olmasına rağmen (13), LH sentezinin negatif geri besleme kontrolünde testosteronun aromatzasyonu çok gerekli değildir, çünkü aromatize edilemeyen bir

androjen olan dihidrotestosteron da LH sekresyonunu inhibe edebilmektedir (14).

Testosteron hem hipotalamik düzeyde, muhtemelen endojen opioidleri içeren bir mekanizma ile, GnRH pulsatilitesini ve dolayısıyla LH salınımını azaltmakta (15, 16), hem de hipofizer düzeyde direkt olarak LH salınımını inhibe etmektedir (17). Bu etkilerin bazılarında testosteronun östradiol'e yerel dönüşümü sorumludur. Yetişkin bir erkekte östrojen, hem hipotalamik düzeyde GnRH salınımını azaltarak, hem de hipofizer düzeyde GnRH'a duyarlılığı bozarak LH sekresyonunu inhibe etmektedir (18).

Primer olarak Sertoli hücrelerinden FSH ve androjenlerin etkisiyle sekrete edilen bir glikoprotein olan inhibin de, gonadotroplarda FSH sekresyonunu inhibe eder. İnhibin A ve B olmak üzere iki tane formu vardır. Erkeklerde fizyolojik olarak önemli olan form inhibin B'dir (19). İnhibin B selektif olarak, FSH'nın β subünitini kodlayan genlerin transkripsiyonunu baskılayarak, gonadotropik hücrelerde FSH sekresyonunu inhibe eder (20). İnhibin B'nin bozulmuş testiküler fonksiyonun tanısında bir belirleyici olarak kullanımı tartışmalıdır (21).

Hipotalamo-hipofizer-testiküler aks stressörlere de oldukça duyarlıdır. Akut ve kronik hastalıklar testosteron düzeyini düşürerek GnRH ve sitokin salınımını arttırmaktadır (22, 23). Açlık ise, sağlıklı erkeklerde leptin düzeylerini azaltarak testosteron salınımını inhibe etmektedir (24).

2.4. Androjen Sentezi, Transportu, Metabolizması ve Fonksiyonu

Testosteron ve aktif metabolitleri olan 5- α -dihidrotestosteron ve 17- β -östradiol'ün sentezinde kolesterol önemli rol oynamaktadır. Kolesterol, hem Leydig hücrelerinde sentezlenebilmekte, hem de plazmadaki düşük molekül ağırlıklı lipoproteinler kolesterol kaynağı olarak kullanılabilir. Kolesterolün testostere dönüşümü 5 adet enzimatik süreç ile gerçekleşebilmektedir.

Leydig hücreleri total testosteronun %95'ini üretir, kalanı ise adrenal korteksten üretilir. Normalde, testislerde 25 µg testosteron bulunmaktadır ve günlük olarak LH kontrolünde 8-10 mg testosteron pulsatil olarak sekrete edilmektedir (25). Dihidrotestosteron oluşumu testosteron metabolizmasının %6-8'ini oluşturur. Plazma testosteronun dihidrotestosterona oranı yaklaşık olarak 10-15'e 1'dir. Östradiol ise günlük olarak 50 mg civarında (%15'i testislerde, %85'lik bölümü ise adipoz doku başta olmak üzere ekstraglandüler dokularda) oluşmaktadır.

Normal erkekte, testosteronun %2'si serbest, %44'ü SHBG'e ve %54'ü albümin ve diğer proteinlere bağlı olarak bulunmaktadır (26). Testosteron bağlama kapasitesi SHBG'den çok daha az olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonlarından dolayı, albümin testosteronun yarısından fazlasını bağlamaktadır. Serbest ve albümine bağlı testosteron *bioavailable* testosteronu oluşturmaktadır (27).

Erkeklerde SHBG konsantrasyonları kadınlardakinin 2-3'te 1'i kadardır ve prepubertal ve hipogonadizimli erkeklerde SHBG konsantrasyonları normal erkeklere göre daha yüksektir. Serum SHBG konsantrasyonları androjen uygulanması ve hipotiroidi durumlarında azalmakta, östrojen uygulanması ve hipertiroidi durumlarında ise artmaktadır.

Testosteronun ve metabolitlerinin erkeklerdeki fonksiyonları: hipotalamo-hipofizer sistem aracılığıyla gonadotropin sekresyonu, spermatogenezin başlatılması ve devam ettirilmesi, embriyogenezis sürecinde erkek fenotipin oluşturulması ve puberte döneminde seksüel matürasyonun oluşturulması ve devam ettirilmesi şeklinde özetlenebilir.

İlave olarak, testosteron yağsız vücut kitlesini arttırmakta ve yağlı kitleyi azaltmaktadır (28).

2.5. Germinal Hücreler ve Spermatogenez

Gonositlerden köken alan ilkel spermatogonyumun ileri derecede özelleşmiş spermatozoon haline gelinceye kadar geçirdiği sürece

spermatogenez denir (29). Spermatogenezin başlaması için FSH, ancak tam olgunlaşması için testosteron gereklidir. Sertoli hücrelerinin sağladığı uygun ortam yardımıyla spermatogonyumlardan 74 günde spermatidler meydana gelir. Epididimise kadar geçişin sağlandığı 12 günlük sürede spermatidler fertilizasyon yeteneği kazanırlar. Seminal sıvıya prostat, bulboüretral ve üretral bezlerden de sıvılar karışarak ideal semen oluşur.

Spermiyumların metabolik ihtiyaçları testis içinde Sertoli hücreleri tarafından, testis dışında ise epididimden ve sekonder seks organlarından salgılanan maddelerle sağlanır (30).

2.6. Erkek Genital Sistem ile İlgili Laboratuvar

2.6.1. Semen Analizi

Medikal bilinen bir hastalık yokluğunda ve ilaç kullanımı olmaması durumunda semen analizi gonadal fonsiyonu gösteren en iyi laboratuvar yöntemidir.

Normal semen pH'sı 7,2 ve üzerindedir. Semen analizi sonuçlarının yorumlanmasında kullanılan referans değerleri, Dünya Sağlık Örgütü (WHO 1999) yeterli olan minimum seviye şeklinde tanımlamıştır (31).

2.6.2. Biyokimyasal Testler

Serum testosteron konsantrasyonları sabah saatlerinde en yüksek düzeylerde olup akşam saatlerine doğru azalmaktadır (32). Bundan dolayı, testosteron ölçümleri sabah saatlerinde yapılmalıdır. Ancak total testosteron konsantrasyonlarının SHBG düzeylerindeki değişikliklerden etkilenebildiği unutulmamalıdır. Obezite; nefrotik sendrom; hipotiroidi, glukokortikoid, progestin ve androjenik steroidlerin kullanımı SHBG düzeylerini azaltırken, yaşlanma; karaciğer sirozu; hipertroidi; östrojenler; HIV enfeksiyonu ve birçok sistemik hastalık artmış SHBG düzeyleri ile ilişkilidir (33). Testosteron düzeyinin (nmol/L) SHBG'e (nmol/L) bölünmesi ile hesaplanan serbest

testosteron indeksi de alternatif olarak tanı amaçlı kullanılabilir (34). Serum testosteron düzeyleri düşük olan hastalarda patolojinin primer veya sekonder olup olmadığını saptamak amacıyla gonadotropin düzeyleri ölçülmelidir. Hipogonadotropik hipogonadizm tespit edilen hastalarda mutlaka serum prolaktin seviyelerine de bakılmalıdır (35).

2.6.3. Dinamik Testler

2.6.3.1. Koryonik Gonadotropin (hCG) Uyarı Testi

3 gün süreyle 1500 IU/gün hCG intramüsküler olarak uygulanarak testosteron yanıtına bakılır. Normal erişkin erkeklerde son enjeksiyondan 24 saat sonra testosteron düzeylerinde bazale göre iki kat artış gözlenir. Primer hipogonadizmde testosteron düzeylerinde artış olmazken, sekonder hipogonadizmde artış gözlenir.

2.6.3.2. Klomifen Sitrat Uyarı Testi

10 gün süreyle 2x100 mg/gün klomifen sitrat verilir. Testin 9. ve 10. günlerinde alınan örneklerde FSH ve LH ölçümleri yapılır. Sağlıklı erkeklerde, klomifen sitrat uyarı testi ile negatif geri besleme mekanizması engellenmiş olur ve hipotalamo-hipofizer yanıtın yeterli olduğunu gösteren LH'da iki kat, FSH'da %20-50'lik artışlar gözlenir.

2.6.3.3. Gonadotropin Serbestleştirici Hormon (GnRH) Uyarı Testi

100 µg gonadorelin intravenöz bolus olarak verilir. 0, 30 ve 60. dakikalarda alınan örneklerde FSH ve LH ölçümleri yapılır. Normal erişkin erkeklerde LH'da 2 kat, FSH'da %50'den fazla artış izlenir. Primer hipogonadizmde bu değerlerin üzerinde artış gözlenirken, sekonder hipogonadizmde FSH ve LH yanıtı azalmış veya normale yakındır. Bununla beraber testin tekrarlanması ile daha doğru değerlendirme yapılabilir.

2.6.4. Görüntüleme Yöntemleri

2.6.4.1. Testiküler USG

Testiküler patolojilerin ayırt edilmesinde veya replasman tedavisi yapılması planlanan hipogonadizmli hastalarda tedavinin takibi açısından faydalıdır.

2.6.4.2. Hipofiz MRG

Hipofiz MR görüntülemesi sekonder hipogonadizmde hipotalamo-hipofizer aksın değerlendirilmesinde önemlidir. Özellikle, asemptomatik olsalar bile, testosteron düzeyleri 150 ng/ml olan hipogonadotropik hipogonadizmli hastalarda önerilmektedir (35).

2.6.5. Testiküler Biyopsi

Azospermi tespit edilen hipogonadal erkeklerde normal büyüklükte testis saptanması durumunda spermatogenetik yetmezlik ve duktal tıkanıklığın ayırt edilmesi için biyopsi gerekir. Hafif veya orta derecedeki oligosperminin değerlendirilmesinde biyopsinin yeri olmamasına rağmen, daha ciddi olgularda tedavinin şeklini değiştirmese de, germinal aplazi, hipoplazi, matürasyon durması ve spermatogenezdeki diğer bozuklukların ayırt edilmesi için biyopsi yapılabilir. Yine, testis boyutları birbirinden farklıysa germ hücreli tümör ayırıcı tanısında kullanılabilir.

2.6.6. Genetik Testler

Pulsatil GnRH, gonadotropinler üzerindeki GnRH reseptörlerine etki ederek, gonadotropin gen ekspresyonunu, hormon sentezini ve sekresyonunu stimüle etmektedir. Hipofizer gonadotropinler, LH ve FSH, erkeklerde ve kadınlarda steroid üretiminde ve gametogenezde görev alır. Gonadotropin üretimi, hipotalamik GnRH üreten nöronların ve hipofizer

gonadotrop hücrelerin normal gelişim ve fonksiyonlarını gerektirmektedir. Üreme aksının birçok aşamasında *orphan* nükleer reseptörlerinin eksprese edilmesine neden olan SF1 ve DAX1 genlerindeki mutasyonlar, hipotalamik GnRH üreten nöronların anormal gelişimi ile karakterize X geçişli Kallmann sendromuna yol açan KAL1 gen mutasyonu, GnRH reseptör fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanan *Proprotein Convertase Subtilisin / Kexin Type 1* (PCSK1) gen mutasyonu, gonadotrop hücrelerin anormal gelişimine veya fonksiyonuna yol açan *HESX Homeobox 1, Homeobox Gene Expressed In ES Cells* (HESX1), *LIM Homeobox 3* (LHX3), *Prophet of Pit1, Paired-Like Homeobox 1* (PROP1) gen mutasyonları, hormonlarda yapısal anormalliklere sebep olan LHB ve FSHB gen mutasyonları gonadotropin biyosentezi ve sekresyonunun kompleks kontrolünü bozan tanımlanabilmiş genetik anormalliklerin sadece bir bölümünü oluşturmaktadır. Gonadotropin eksikliğinin moleküler yapısının tanımlanması üreme ile ilgili basamakların daha iyi anlaşılması, tedavinin yönlendirilmesi ve genetik danışma amacıyla önemlidir (36).

2.7. Hipogonadotropik Hipogonadizm

Erkek hipogonadizmi, testislerin iki majör fonksiyonları olan sperm ve testosteron üretiminin bir veya her ikisinin birden azalması ile karakterizedir. Bu durum, testis patolojilerinden (primer hipogonadizm) veya hipotalamo-hipofizer hastalıklardan (sekonder hipogonadizm) kaynaklanabilir. Bunların ayırımı serum FSH ve LH konsantrasyonları ölçülerek yapılabilir. Primer hipogonadizmde, düşük testosteron konsantrasyonları ve/veya azalmış sperm sayısı ile birlikte serum FSH ve LH düzeyleri artmıştır. Sekonder hipogonadizmde ise, düşük testosteron konsantrasyonları ve/veya azalmış sperm sayısı ile birlikte serum FSH ve LH konsantrasyonları da azalmıştır. Sekonder hipogonadizmde düşük serum LH düzeyleri nedeniyle testiküler testosteron üretimi ve dolayısıyla intratestiküler testosteron azaldığından dolayı sperm üretimi de benzer oranlarda azalmaktadır. Oysaki primer hipogonadizmde seminifer tübüllerdeki hasar Leydig hücre hasarından daha

fazla olduğundan dolayı sperm üretimindeki azalma testosteron düzeylerindeki azalmadan daha belirgindir. İlave olarak, sekonder hipogonadizmde düşük FSH ve LH konsantrasyonlarından dolayı testosteronun östradiole dönüşümünden sorumlu testiküler aromataz enzimi uyarılamamakta ve bu olgularda jinekomasti primer hipogonadizmden daha seyrek görülmektedir.

İnfertilite nedeni ile araştırılan erkeklerin %3'ünden azında primer endokrinolojik nedenler olaydan sorumludur (37). Hipogonadotropik hipogonadizm olguları hipotalamus veya hipofiz bezine bağlı bir patoloji sonucu serum gonadotropinlerin ve androjenlerin yetersizliği ile seyreder. Tüm infertil erkeklerin % 0,5-1'inde görülen hipogonadotropik hipogonadizm olgularında spermatogenezde değişen oranlarda bozulmanın yanı sıra, androjen eksikliğinin hafif anemi, koagülasyon parametrelerinde bozulma, kemik dansitesinde azalma, müsküler atrofi, seksüel ve kognitif fonksiyonlarda gerileme gibi sistemik etkileri de olabileceği için bu hastaların teşhis ve tedavisi son derece önemlidir (38). Gonadotropin sekresyonunu azaltan nedenler konjenital olabileceği gibi kazanılmış da olabilir.

2.7.1. Kazanılmış Hipogonadotropik Hipogonadizm

Kazanılmış nedenler arasında hiperprolaktinemi (39); prostat kanserinin tedavisinde de yaygın olarak kullanılan GnRH analogların uzun süreli uygulanması (40); yüksek dozda androjenlerin kullanımı (41); kronik glukokortikoid tedavisi (42); uzun süreli opioid kullanımı (43, 44); cerrahi, miyokard infarktüsü, kafa travması gibi durumlar (45); siroz (46), kronik böbrek yetmezliği (47), akciğer patolojileri (48), kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AİDS) (49), diyabet (50) gibi kronik sistemik hastalıklar; hipofizer adenom (51) veya kisti (52, 53) gibi benign tümörler; primer veya metastatik beyin tümörleri (54, 55); sarkoidoz (56), langerhans hücreli histiyoitoz (Hans-Schuller-Christian disease veya histiocytosis X) (57) veya hemokromatozis gibi infiltratif hastalıklar; tüberküloz (58) gibi infektif hastalıklar; pituitier

apopleksi; subaraknoid kanama (59) ve idiyopatik (60) nedenler bulunmaktadır.

2.7.2. Konjenital Hipogonadotropik Hipogonadizm

Konjenital nedenler hipogonadotropik hipogonadizmli hastaların %5-10'undan sorumludur. Bugüne kadar yapılan araştırmalar GnRH ve gonadotropin sentez ya da sekresyonunu bozarak gonadotropin eksikliğine yol açan bir dizi genetik kusuru ortaya çıkarmıştır. Bu genetik kusurlar dört başlık altında özetlenebilir: GnRH nöronlarının migrasyonu ve fonksiyonunu bozanlar (KAL1, FGFR1, NELF1, PROK2 ve PROKR2 mutasyonları); GnRH sentez ve sekresyonunu bozanlar (GnRH1, KISS1, GPR54, SF1, DAX1, LEP ve LEPR mutasyonları); GnRH'ya hipofizer düzeyde cevabı bozanlar (GnRHR mutasyonu) ve gonadotropin biyosentezini bozanlar (LHB, FSHB, DAX1, ve SF1 mutasyonları). Bütün bu gen defektlerinin gonadotropin eksikliğine neden olmasına rağmen, her bir bozukluk tek bir fenotipik veya hormonal özellik ile ilişkilidir.

2.7.2.1. KAL1 Gen Mutasyonu

Hipotalamik GnRH üreten nöronların anormal gelişimi ile karakterize X geçişli KS'na yol açar. KAL1 geni X kromozomunun kısa kolunda (Xp22.3) bulunan ve bir nöral hücre adezyon molekülü olan Anosmin-1'i kodlayan bir gendir. İn vitro yapılan çalışmalarda, Anosmin-1'in GnRH nöron migrasyonunu direkt olarak uyardığı gösterilmiştir (61). KAL1 geni mutasyonlarında, embriyolojik dönemde olfaktör bulbustan hipotalamusa GnRH salgılayan nöronların migrasyonu ve adezyonu tamamlanamaz ve sonuçta GnRH sekresyonu yetersiz kalarak hipogonadizm ortaya çıkar (62,63). KAL1 mutasyonlarının %33-70'i familial, %3,1-27,8'i sporadik olup (64), bu mutasyona sahip hipogonadizmli bireylerde anosmi / hiposmi, kriptorşidizm, renal agenezi, sensorinöral işitme kaybı, göz hareketlerinde bozukluk, orta hat yüz defektleri görülebilmektedir (65).

2.7.2.2. FGFR1 Gen Mutasyonu

FGFR1 reseptöründeki fonksiyonel mutasyonlar KS'nun otozomal dominant varyantına neden olmaktadır. FGFR1 geni (KAL2 olarak da bilinir) 8p11.2-p12 kromozomunda lokalizedir ve mutasyonları hem anosmik / hiposmik hem de nİHH'e neden olmaktadır (66). FGFR1 mutasyonları hem KS hem de nİHH'in %10'undan sorumludur. FGFR1 mutasyonu olan bazı hastalarda X geçişli KS'dakine benzer nörolojik anormallikler ve orta hat yüz defektleri görülebilmektedir. İlave olarak, FGFR1 mutasyonları kraniosinostoz ve kraniyofasiyal displazi (Jackson-Weiss sendromu), Pfeiffer sendromu, trigonosefali, osteoglofonik displazi ve Antley-Bixler sendromu gibi diğer iskelet sistemi anormalliklerine neden olabilmektedir (67-70).

2.7.2.3. NELF Gen Mutasyonu

NELF geni 9q34.3 kromozomunda lokalizedir ve GnRH nöron migrasyonunda, puberte ve üreme fizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (71). Mutasyonları İHH'e neden olmaktadır.

2.7.2.4. PROK2 ve PROKR2 Gen Mutasyonları

Prokinesitin 2 ve reseptörü olan prokinesitin reseptör 2 kalsiyum mobilizasyonunu içeren multiple intrasellüler sinyal yolları aracılığı ile olfaktör bulbusun morfogenezisi ve reproduksiyonunu da içeren birçok farklı biyolojik süreçte rol oynamaktadır. PROK2 geni 3p13 kromozomunda lokalize olup, 10 adet sistein rezidüsü içeren 81 aminoasitten oluşan bir proteindir ve PROKR2 geni 20p12.3 kromozomunda lokalize olup, 384 aminoasitten oluşan G proteine bağlı bir reseptördür. Her ikisi de GnRH eksikliğinin güçlü belirleyicileri olarak karşımıza çıkmaktadır (72-74).

2.7.2.5. KiSS1/GPR54 Gen Mutasyonu

GPR54 hipotalamusta yer alan GnRH nöronlarında bulunur ve KiSS1 geninin ürünleri olan kisspeptinler ile aktive edilmesi sonucu GnRH sekresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (75). GPR54 gen mutasyonu saptanan hastalarda GnRH sekresyonu ve pulsatil GnRH'ya gonadotropin yanıtı bozulmuştur (76, 77). GPR54 geni 19p13.3 kromozomunda lokalize olup, mutasyonları izole hipogonadotropik hipogonadizme neden olmakta ve resesif kalıtım göstermektedir.

2.7.2.6. NROB1/DAX1 ve NR5A1/SF1 Gen Mutasyonları

NROB1 geni Xp21.3-p21.2 kromozomunda bulunmakta ve DAX1 proteinini, NR5A1 (*Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1*) geni ise 9q33 kromozomunda bulunmakta ve SF1 proteinini kodlamaktadır (78). DAX1 ve SF1 üreme aksının birçok aşamasında adrenal bez, gonadlar, ventromedial hipotalamus ve hipofizer gonadotrop hücrelerinde bulunan *orphan* nükleer reseptörlerinin eksprese edilmesine neden olurlar (79-81). Normal adrenal kortikal gelişim ile ilişkilidirler. Bu gen mutasyonları adrenal yetmezlikle sonuçlanan X geçişli konjenital adrenal hipoplaziye ve hipogonadotropik hipogonadizme neden olmaktadır (78, 82). DAX1 mutasyonlu hastalarda düzensiz LH pulsaları görülmektedir. DAX1 genindeki mutasyonlar IHH'in sık olmayan sebebi olup, tüm olguların %1'inden azını oluşturmaktadır. Bu hastalar hCG'ye normal testosteron yanıtı sergilemekte, ki bu Leydig hücre fonksiyonlarının normal olduğunu göstermektedir.

2.7.2.7. GnRH1 ve GnRHR Gen Mutasyonları

GnRH1 geni 8p21-p11.2'de lokalize olup, mutasyonları otozomal resesif kalıtım sergilemektedir. Hayvan çalışmalarında bu gendeki mutasyonların hipogonadotropik hipogonadizme neden olduğu gösterilmiştir (83). GnRH reseptörü hipofizer gonadotropların hücre yüzey membranında bulunmaktadır ve GnRHR geni 4q21.2 kromozomunda lokalizedir. Bu genin

mutasyonları GnRH rezistansı ile ilişkilidir. GnRH tedavisine cevap vermeyen hipogonadizmlı olgularda aklımıza gelmesi gereken bu mutasyon genellikle resesif kalıtım göstermektedir (84). GnRHR gen mutasyonları, İHH tanısıyla takip edilen hastalarda %2-5 oranında saptanabilmektedir ve bunların %60'ında komplet, %40'ında da inkomplet hipogonadizm mevcuttur (85).

2.7.2.8. LEP, LEPR ve PCSK1 Gen Mutasyonları

LEP geni 7q31.3 kromozomunda, LEPR geni ise 1p31 kromozomunda lokalizedir. Her ikisindeki mutasyonlar erken çocukluk döneminde hiperfaji ve morbid obeziteye neden olurlar (86-88). İHH'li obez hastalarda düşünülmesi gereken bu mutasyonlar resesif kalıtım sergilemektedir (87). PCSK1 geni ise 5q15-q21 kromozomunda lokalizedir. PCSK1 gen mutasyonları da otozomal resesif kalıtım göstermekte olup, çocukluk döneminde belirgin obeziteye, hipokortizolemiye, proinsülinin insüline dönüşümünü bozarak hipoglisemiye ve izole parsiyel hipogonadotropik hipogonadizme neden olmaktadır. (89, 90).

2.7.2.9. LHB ve FSHB Gen Mutasyonları

LHB geni 19q13.32 kromozomunda, FSHB geni ise 11p13 kromozomunda lokalizedir. Her iki gen mutasyonu otozomal resesif kalıtım sergilemekte ve sırasıyla izole LH eksikliği (91, 92) ve izole FSH eksikliğine neden olmaktadır (93, 94).

2.7.2.10. PROP1 Gen Mutasyonu

PROP1 geni 5q35.3 kromozomunda lokalize olup bu gendeki mutasyonlar, hem ailesel hem de sporadik konjenital kombine hipofizer hormon eksikliğinin en sık sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. Birçok farklı mutasyon tanımlanmıştır ve tamamı resesif kalıtım göstermektedir. Hipogonadizm, PROP1 mutasyonlu hastalarda çarpıcı bir özelliktir, ancak

linik ve hormonal ekspresyonda çeşitlilik mevcuttur. Hormonal fenotip LH, FSH, GH, PRL TSH ve ACTH'ın eksikliklerini içermektedir (95-97). Etkilenen olguların çoğunda geç puberte, cücelik ve GnRH stimülasyonuna düşük LH ve FSH yanıtı gözlenmektedir (98).

2.7.2.11. HESX1 Gen Mutasyonu

HESX1 geni 3p14.3 kromozomunda lokalizedir ve gonadotrop hücrelerin anormal gelişimine ve fonksiyonuna yol açar. Mutasyonları genelde PROP1 gen mutasyonunda olduğu gibi kombine hipofizer hormon eksikliğine neden olur (99). Septo-optik displazili hastalarda (korpus kallozum agenezisi, panhipopitüitarizm ve hipoplastik optik sinirler) HESX1 genine ait hem homozigot hem de heterozigot mutasyonlar saptanmıştır (100-102). Bununla birlikte, HESX1 gen mutasyonları septo-optik displazili hastaların küçük bir yüzdesini oluşturmaktadır.

2.7.2.12. GSX1 Gen Mutasyonu

13q12.2 kromozomunda lokalize olan *Genomic Screened Homeobox 1* (GSX1) geni normal hipofizer gelişim için gereklidir. Bu genin homozigot mutasyonları belirgin cücelik, seksüel infantilizm ve artmış perinatal mortalite ile ilişkilidir (103).

2.7.2.13. SOX2 ve SOX3 Gen Mutasyonları

SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2 (SOX2) geni 3q26.3-q27 kromozomunda, *SRY (Sex Determining Region Y)-Box 3* (SOX3) geni ise Xq27.1 kromozomunda lokalize olup, her iki gendeki mutasyonlar İHH ve kombine hipofizer hormon eksiklikleri ile karşımıza çıkmaktadır. İlave olarak, otozomal dominant kalıtım gösteren SOX2 gen mutasyonları bilateral anoftalmi / microftalmi, büyüme gecikmesi, kısa boy, genital anormallikler, korpus kallozum defektleri, hipotalamik hamartomlar, sensorinöral işitme

kaybı ve özefagial atrezi ile (104); X geçişli resesif kalıtım gösteren SOX3 gen mutasyonları ise mental retardasyon, fasiyal anormallikler, korpus kallozum defektleri, anterior hipofizer hipoplazi, ektopik posterior hipofiz, infundibulum yokluğu ile karşımıza çıkabilmektedir (105-107).

2.7.2.14. LHX3 ve LHX4 Gen Mutasyonları

9q34.3 kromozomunda lokalize olan LHX3 ve 1q25.2 kromozomunda lokalize olan *LIM Homeobox 4* (LHX4) genleri ön hipofiz gelişiminde rol oynayan transkripsiyon faktörleridir. LHX3 gen mutasyonları otozomal resesif kombine hipofizer hormon yetmezliğine neden olurken, LHX4 gen mutasyonları ise otozomal dominant kombine hipofizer hormon yetmezliği oluşturmaktadır (108, 109). LHX3 gen mutasyonu olan hastalarda ciddi büyüme geriliği, hipogonadotropik hipogonadizm ve ACTH dışında tüm hipofizer hormonların eksiklikleri görülebilmektedir. İlave olarak, servikal omur rotasyonlarında ve omuzların elevasyonu ile anteversiyonunda ciddi kısıtlamaya neden olabilmektedir (108). Hipogonadotropik hipogonadizme neden olduğu teorik olarak kabul edilse de LHX4 gen mutasyonları sadece prepubertal dönemde gösterilebilmiştir (110, 111). Henüz pubertal dönemde yapılan bir çalışma yoktur.

2.7.2.15. CHD7 Gen Mutasyonu

Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 7 (CHD7) geni 8q12.1-q12.2 kromozomunda lokalize olup bu gendeki mutasyonların otozomal dominant veya sporadik bir bozukluk olan CHARGE sendromuna (gözde koloboma, kalp anormallikleri, koanal atrezi, büyüme ve gelişme geriliği, genitoüriner anormallikler ve işitsel veya vestibüler kulak anormallikleri) neden olduğu gösterilmiştir (112). Yapılan çalışmalarda, CHD7 gen mutasyonu olan hastalarda anosmi veya hiposmi (113), mikropenis ve/veya kriptorşidizm, düşük serum testosteron düzeyleri, GnRH stimülasyonuna subnormal FSH ve LH yanıtları (114) saptanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Grubu

Bu çalışmaya, Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları BD. Kliniği'nde 2008-2009 yılları arasında takip edilen ve İHH tanısı konulan hastalar ile herhangi bir yakınması olmayan erişkin kontrol grubu katılımcılar dahil edildi. Katılımcıların önceden ve halen hipogonadizm ile ilgili herhangi bir ilaç kullanmıyor olmalarına dikkat edildi. Kronolojik yaşı 18'in üzerinde olduğu tespit edilen, hipogonadizmin klinik belirti ve bulguları olan, serbest testosteron düzeylerinin düşüklüğü ile birlikte LH ve FSH düzeyleri normal veya normalin altında saptanan, GnRH stimülasyon testinde beklenen yanıt gözlenmeyen, MRG'de hipotalamo-hipofizer ve skrotal USG'de testiküler atrofi dışında primer patolojiler saptanmayan hastalar çalışmaya alındı. Anosmi ve/veya hiposmi tarifleyen hastalar KS'lu, tariflemeyenler ise nİHH'li olarak kabul edildi. Olfaktör fonksiyonları kantitatif olarak değerlendiren ve standardize edilmiş bir test olmadığından dolayı olgularımızın koku duyularını kahve, soğan, sarımsak gibi keskin kokuları sorgulayarak değerlendirdik. Ayrıca, MRG ile hastaların olfaktör bulbus ve traktusları görüntülendi.

Çalışmaya dahil edilen tüm bireylerden, araştırmanın amacı ve yapılacak işlemler hakkında ayrıntılı bilgi verilerek, gönüllü olarak katıldıklarına dair imzalı onay alındı. Hipogonadizm ön tanısı ile yatırılan ve İHH tanı kriterlerini karşılamayan hipogonadizmlili hastalar ile laboratuvar sonuçlarında hipotalamo-hipofizer-testiküler aksta patolojiyi düşündüren herhangi bir anormal sonuç saptanan kontrol grubundaki bireyler çalışmadan çıkartıldı.

Hasta grubunun biyokimyasal ve genetik özellikleri Tablo 3.1'de, kontrol grubunun biyokimyasal ve genetik özellikleri ise Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Hasta Grubunun Biyokimyasal ve Genetik Özellikleri

HASTA GRUBU					
S.No.	Serbest Testosteron (pg/mL)	Total Testosteron (ng/dL)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	Saptanan Mutasyonlar
1	2.90	151.80	1.450	1.480	-
2	3.42	65.94	0.217	0.100	-
3	2.04	33.20	3.980	0.244	-
4	7.25	223.90	3.090	6.890	-
5	2.57	25.06	1.000	0.200	-
6	1.21	14.85	0.760	0.822	-
7	8.33	282.00	0.188	0.100	-
8	1.73	32.87	1.290	1.270	-
9	1.69	26.14	0.561	0.757	-
10	2.12	38.82	1.550	1.100	-
11	3.26	88.07	0.330	0.100	-
12	1.11	15.38	0.372	0.100	-
13	3.00	64.45	1.580	1.020	-
14	6.60	207.70	0.605	0.146	-
15	1.37	4.80	0.231	0.100	-
16	3.20	80.91	0.688	2.240	-
17	3.50	55.38	1.020	0.620	-
18	4.00	83.02	0.298	0.100	-
19	0.97	20.50	0.687	0.100	-
20	3.21	49.71	1.040	0.100	-
21	2.10	15.45	0.474	0.100	-
22	2.24	14.94	0.178	0.100	-
23	4.95	29.63	0.539	0.100	-
24	1.10	18.92	0.203	0.100	-
25	1.62	50.90	1.700	1.130	-
26	2.51	26.22	1.080	0.366	-
27	2.10	61.00	1.770	1.320	-
28	8.10	308.50	0.548	0.126	-
29	2.30	5.00	0.423	0.100	KAL1'de Hdel.
30	9.73	272.50	1.150	1.330	-
31	4.61	30.23	0.410	0.100	-
32	8.03	6.67	0.536	0.100	-

33	6.10	29.49	0.963	0.935	-
34	2.60	37.21	0.823	0.367	-
35	8.30	243.40	0.192	0.100	-
36	1.41	32.44	1.290	0.480	-
37	5.17	112.50	1.410	2.310	-
38	2.19	25.35	0.200	0.100	-
39	3.64	113.70	0.375	0.193	-
40	2.20	13.44	0.600	0.600	-
41	2.30	37.07	0.244	0.100	-
42	1.50	40.43	2.850	1.600	-
43	2.98	30.89	0.660	0.247	PROK2'de Dup.
44	2.10	27.21	0.253	0.100	-
45	5.17	112.50	1.410	2.310	-
46	1.80	21.35	0.160	0.285	-
47	6.50	150.50	0.351	0.100	-
48	1.92	33.95	0.691	0.132	-
49	3.60	68.50	0.817	1.530	-
50	2.87	128.90	1.500	0.755	-
51	1.65	15.85	0.400	0.100	-
52	2.05	17.82	0.530	0.160	-
53	2.50	28.97	0.196	0.100	-
54	2.51	30.21	1.500	0.586	-
55	0.80	24.93	0.373	0.100	-
56	1.79	20.61	0.888	0.499	-
57	2.20	39.16	1.670	0.330	-
58	2.33	17.53	0.240	0.100	-
59	2.70	55.53	0.212	0.100	-
60	3.20	51.21	1.070	1.010	-
61	4.65	30.22	0.339	0.100	-
62	4.00	31.60	0.300	0.100	-
63	8.12	149.40	0.413	0.111	-
64	2.50	35.66	0.370	0.100	-
65	1.70	84.86	0.997	1.220	GnRHR'de Hdel.
66	0.91	29.85	0.100	0.100	-
67	2.60	26.95	0.822	0.330	-
68	0.93	33.96	1.600	0.860	-
69	1.20	17.00	1.590	0.740	-

70	0.25	20.26	0.210	0.100	-
71	2.00	20.06	0.123	0.100	-
72	2.10	40.25	0.289	0.100	-
73	1.50	32.93	0.660	0.114	-
74	1.30	19.48	0.650	0.140	-
75	1.30	45.00	0.700	0.100	-
76	2.30	16.95	0.550	0.100	GnRHR'de Dup.
77	1.20	30.88	0.400	0.060	-
78	3.70	233.90	1.470	1.600	-
79	4.60	188.00	1.200	0.100	-
80	7.70	220.90	0.513	0.680	-
81	2.90	48.12	1.080	0.788	KAL1'de Hdel.+Dup.
82	1.40	25.20	0.478	0.100	-
83	2.50	39.07	0.705	0.111	-
84	3.40	49.60	0.476	0.112	KAL1'de Hdel.
85	0.70	5.20	2.700	2.300	-
86	3.40	4.50	0.150	0.100	-

Kısaltmalar: Hdel, Heterozigot delesyon; Dup, Duplikasyon

Tablo 3.2. Kontrol Grubunun Biyokimyasal ve Genetik Özellikleri

KONTROL GRUBU					
S.No.	Serbest Testosteron (pg/mL)	Total Testosteron (ng/dL)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	Saptanan Mutasyonlar
1	16.45	420.50	1.720	2.810	-
2	16.90	480.50	1.540	2.890	-
3	31.32	571.90	3.800	6.170	-
4	24.68	555.00	2.550	4.480	-
5	26.54	394.40	5.800	4.140	-
6	16.20	465.80	3.150	5.790	-
7	19.35	453.30	2.530	3.230	-
8	20.48	794.40	2.410	5.740	-
9	14.49	484.80	2.430	4.520	-
10	20.37	441.20	7.270	6.180	-
11	20.57	464.70	3.480	4.940	-
12	20.58	396.20	1.500	2.170	-
13	17.87	429.60	4.210	3.630	-
14	14.15	418.90	2.260	3.020	-
15	21.20	475.30	2.680	4.670	-
16	15.07	285.90	2.560	7.270	-
17	19.87	382.50	1.790	3.130	-
18	17.67	505.00	2.530	5.130	-
19	32.04	768.00	4.000	5.510	-
20	24.96	535.00	3.160	5.730	-
21	15.55	578.80	3.900	4.110	-
22	13.46	500.00	3.740	5.560	-
23	13.11	436.90	4.330	3.490	-
24	19.42	690.60	4.700	7.920	-
25	18.97	450.80	2.090	2.910	-
26	19.94	402.60	2.580	4.390	-
27	29.51	780.50	2.350	4.360	-
28	20.87	659.10	3.060	6.820	-
29	13.89	379.00	5.960	1.720	-
30	13.40	388.40	6.170	4.030	-
31	17.16	305.40	3.380	4.010	-
32	25.20	709.00	2.420	6.280	-

33	30.50	700.00	4.410	5.310	-
34	20.81	519.40	5.270	4.270	-
35	18.91	329.90	3.900	4.240	-
36	15.36	372.00	3.220	3.550	-
37	26.09	800.00	1.800	5.190	-
38	16.24	443.50	2.610	4.890	-
39	17.81	489.30	2.100	2.790	-
40	15.96	469.20	4.120	4.330	-
41	14.64	337.40	2.100	5.930	-
42	10.79	376.60	2.680	3.350	-
43	17.09	325.60	2.490	3.950	-
44	37.72	710.00	3.890	6.830	-
45	18.46	388.00	2.860	5.780	-
46	19.64	430.00	1.500	4.430	-
47	19.08	343.90	2.430	3.030	-
48	11.87	370.00	12.340	3.050	-
49	14.01	297.90	2.480	3.390	-
50	22.86	460.50	3.130	2.890	-
51	9.74	288.00	4.790	5.550	-
52	12.19	420.30	3.920	6.510	-
53	13.90	463.90	3.000	5.340	-
54	15.80	525.20	7.060	3.020	-
55	20.38	469.60	2.560	5.240	-
56	16.02	307.00	3.130	3.080	-
57	13.01	610.70	5.130	4.470	-
58	14.26	368.40	1.710	14.270	-
59	17.53	410.60	1.560	6.090	-
60	26.50	763.30	2.160	3.690	-
61	14.90	484.90	2.400	4.500	-
62	14.97	436.10	4.230	3.000	-
63	10.63	470.70	1.500	7.260	-
64	33.32	671.90	3.760	6.270	-
65	25.19	530.60	5.930	7.850	-
66	27.88	697.10	2.680	4.360	-
67	23.15	519.80	3.680	3.280	-
68	26.27	618.80	4.650	5.350	-
69	23.45	721.80	6.970	6.920	-

70	22.29	611.80	1.530	4.160	-
71	19.51	380.10	11.840	5.440	-
72	26.18	572.60	4.800	5.830	-
73	40.91	800.00	4.350	5.310	-
74	17.48	492.10	3.370	6.200	-
75	28.92	723.20	4.310	4.410	-
76	26.54	394.40	5.800	4.140	-
77	16.10	480.30	1.890	4.040	-
78	9.73	309.60	1.790	3.700	-
79	20.05	529.40	4.960	5.190	-
80	13.82	453.30	4.020	2.470	-
81	19.87	393.50	1.790	3.130	-
82	17.87	429.60	4.210	3.630	-
83	21.84	558.30	3.380	3.600	-
84	11.79	472.60	4.790	3.530	-
85	16.45	420.50	1.720	2.810	-
86	18.79	720.00	2.870	4.490	-
87	23.05	376.60	3.400	4.730	-
88	24.68	357.90	2.550	4.480	-
89	20.37	441.20	6.180	7.270	-
90	16.20	465.80	3.150	5.790	-
91	20.48	413.80	2.410	5.740	-
92	20.57	464.70	3.490	4.940	-
93	19.12	459.10	2.200	3.130	-
94	15.89	478.80	10.650	5.320	-
95	11.35	399.00	1.560	3.960	-

3.2. Biyokimyasal Testler

3.2.1. Hormon Ölçümleri

İHH hastalarından ve kontrol grubundan alınan kan örnekleri antikoagülan içermeyen kırmızı kapaklı tüpe (Grainer, Avusturya) konularak GATA Biyokimya Laboratuvarında 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı. Örnekler çalışılincaya kadar -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Alınan örneklerden total testosteron, FSH ve LH düzeyleri GATA Biyokimya immunoassay laboratuvarında Roche E-170 (Hitachi corporation, Osaka, JAPON) hormon analizöründe kemilüminesans yöntemi ile çalışıldı. Serbest testosteron ise DSL-4900 ACTIVE (Texas USA) kiti ile Radioimmüno assay (RIA) yöntemiyle çalışıldı. Kullanılan kitlerin ölçüm aralıkları Tablo 3.3'te belirtilmiştir.

Tablo 3.3. Hormon Ölçümünde Kullanılan Kitlerin Ölçüm Aralıkları

	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	Total Testosteron (nmol/L)	Serbest Testosteron (pmol/L)
Ölçüm aralığı	0.1-200	0.1-200	0.069-52.000	0.87-346.70
Grup içi CV (%)	1.3-2.6	0.6-1.2	1.3-2.7	3.7-6.2
Total CV (%)	3.6-4.5	1.6-2.1	2.5-6	7.3-9.7

3.2.2. GnRH Uyarı Testi

Sekonder hipogonadizm tanısı konan bireylere 100 µg (0,1 mg) gonadorelin (LH-RH Ferring amp) hızlı intravenöz bolus olarak verilip, 0, 15, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda LH ve FSH ölçümleri için kan alındı. FSH ve LH ölçümlerinde subnormal yanıt alınan bireyler çalışmaya dahil edildi.

3.2.3. Genetik Testler

IHH tanısı konulan olgular ve kontrol grubu olgularından beyaz kan hücrelerinden aşağıdaki protokole uygun olarak DNA örnekleri izole edilerek genetik analiz gerçekleştirildi.

3.2.3.1. DNA Denatürasyonu ve Salsa MLPA Problarının Hibridizasyonu

200-500 ng. DNA örnekleri 5 µL de TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) ile dilüe edildi. 5 dakika 98°C'de ısıtılıp, 25°C'ye önceden ayarlanan thermal cycler'da soğutuldu. 1,5 µL SALSA probemix (siyah kapak) ve 1,5 µL MLPA buffer (sarı kapak) karışımı hazırlanarak her tüpe eklendi. Dikkatlice karıştırılıp, 95°C'de 1 dakika inkübe edildi ve ardından 16 saat 60°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.2. Ligasyon Reaksiyonu

Thermal cycler'in sıcaklığı 54°C'ye düşürüldü. 54°C'de iken 32 µL Ligase-65 karışımı her örneğe eklenerek iyice karıştırıldı. 15 dakika 54°C'de inkübe edildikten sonra 5 dakika 98°C'de ısıtıldı.

Ligase-65 karışımı, kullanmadan en az 1 saat önce hazırlandı ve buz üzerinde saklandı. 3 µL Ligase-65 buffer A + 3 µL Ligase-65 buffer B + 25 µL distile su eklenerek karışım hazırlandı. Daha sonra 1 µL Ligase-65 eklenerek tekrar karıştırıldı.

3.2.3.3. PCR Reaksiyonu

Yeni tüplere 4 µL SALSA PCR buffer + 26 µL distile su + 10 µL MLPA ligasyon reaksiyonu eklenerek karıştırıldı. Tüpler 60°C'ye hazırlanan thermal

cycler üzerine yerleştirilip, 10 µL polymerase karışımı ilave edildi ve hemen PCR reaksiyonu başlatıldı.

Polymerase karışımı, kullanmadan en az 1 saat önce hazırlandı ve buz üzerinde muhafaza edildi. 2 µL SALSA PCR-primeri + 2 µL SALSA enzim dilüsyon buffer + 5,5 µL distile su eklenerek karışım hazırlandı. 0,5 µL SALSA polymerase eklenerek iyice karıştırıldı.

PCR protokolü 35 döngü şeklinde uygulandı (30 sn. 95°C; 30 sn. 60°C ve 60 sn 72°C'de). Son olarak 20 dakika 72°C'de inkübe edildi.

3.2.3.4. Elektroforez ile Amplifikasyon Ürünlerinin Ayrılması

Beckman Coulter 8000 Genetik Analyzer kullanılarak analiz yapıldı (Label: SALSA 6-FAM PCR primer-dNTP karışımı). 0,75 µL PCR Reaction + 0,75 µl distile su + 0,5 µl internal standart + 13,5 µL HİDİ formamid ilave edilerek karıştırıldı. 2 dakika 94°C'de karıştırılarak inkübe edildi. Hemen ardından buz üzerinde soğutuldu. Cihaz üzerinde uygun bir programlama yapılarak çalışıldı.

3.2.3.5. MLPA Data Analizi

EZ1 DNA Blood Kit Kullanılarak GenoVision GenoM-6 tipi BioRobotta (Qiagen, Almanya), nHH / KS'li hastalara ve hasta olmayan kontrol grubuna ait beyaz kan hücrelerinden DNA izole edildi. 125 ng DNA, ticari olarak elde edilen kitin prob setleri ile bir gece hibridize edildi. P132 KAL-1 Kiti; Xp, Xq, Yq11 üzerindeki diğer bölgeler için kontrol dizisi ve tüm 14 KAL ekzonu (Tablo 3.4) için 34 prob çifti içermektedir. P133-B1 KAL-2 kiti ise; otozomal genlerin aşağıda belirtilen ekzonlarını kapsayan 39 prob çifti içermektedir: GNRH1 (4 ekzonun 1-3'ü) (Tablo 3.5), GNRHR (3 ekzonun 1-3'ü) (Tablo 3.6), PROK2 (4 ekzonun 1-4'ü) (Tablo 3.7), PROKR2 (2 ekzonun 1, 2'si) (Tablo 3.8), GPR54 (5 ekzonun 1, 4 ve 5'i), FGFR1 (18 ekzonun 1-3, 5, 6, 8,

10, 13, 14 ve 18'i) ve NELF (16 ekzonun 5, 11 ve 15'i). Bu problara, 1-3, 6, 11, 15-17, 19, 20 ve Y kromozomlarının üzerindeki kontrol dizileride dahildir.

Hibridizasyonun ardından bir ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu reaksiyon multipleks PCR için bir kalıp görevi yapmaktadır. Universal primerler kullanılarak 35 döngü gerçekleştirildi. PCR ürünleri GeneScan programı kullanılarak Beckman Coulter oto analizör'de analiz edildi. Veriler, Genotyper 2.0 kullanılarak değerlendirildi. Her ekzon için pik alanları Excel dosyasına çevrilerek, her fragmentin kopya sayıları sağlıklı kontrol grubundaki 2-3 katılımcının aynı fragmentleriyle karşılaştırıldı.

3.2.3.6. MLPA Reaksiyonu

Schouten ve arkadaşları tarafından tanımlanan esaslar ile çalışıldı. Kısaca 5 µL lizat, 5 dakika 98°C'de denatüre edildi. Daha sonra, 3 µL prob mix ilave edilerek 95°C'de 1 dakika ısıtıldı. Ardından 60°C'de 16 saat (gece) inkübasyona bırakıldı. Bütün inkübasyonlar sıcak kapaklı thermal cyclers da yapıldı. Ligasyon Ligase-65 enzimi (MRC Holland) kullanılarak 54°C'de 15 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi. Ardından, 98°C'de 2 dakika ligase inaktivasyonu, sonra da bu ligasyon karışımının 10 µL'sine, dNTPs, Taq polymerase ve PCR primerleri içeren PCR bufferdan 40 µL ilave edildi. Primerler FAM [N-(3-fluoranthyl)maleimide] ile işaretlendi. Reaksiyon karışımı 95°C'de 1 dakika, ardından 32 döngü (30 sn. 95°C; 30 sn. 60°C; 60 sn 72°C) inkübe edildi.

Tablo 3.4. KAL1 Gen Probenun Özellikleri

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	Ekzon	Ligasyon bölgesi NM_0011261 28.1	Sekans dizilimi (Ligasyon bölgesine komşu 20 nt)	Sonraki proba mesafe
		Start codon	151-153		
160	4416-L03802	Ekzon 1	35-34 rev.	GGAAAGTTCA-ATCCTTCAAC	993.6 Kb
211	5944-L03803	Ekzon 1	320-321	TGAGCCTGCA-GATCACTCGC	0.3 Kb
178	4418-L03804	Ekzon 2	391-390 rev.	AACATTGCTT-GTGATTCTGG	32.2 Kb
202	4419-L03805	Ekzon 3	429-430	CAAGGAATCA-GGGGACCTGA	76.1 Kb
256	5942-L03806	Ekzon 4	641-640 rev.	CCATTCGAAC-AACATTTCTT	26.6 Kb
310	5943-L09794	Ekzon 5	737-738	CAGAACTGCA-GTCTGGACAG	9.2 Kb
283	4422-L03808	Ekzon 6	917-916 rev.	TACCATCGGC-TGGGTCTTAT	2.6 Kb
166	4423-L05579	Ekzon 7	1154-1153 rev.	CTGCTGACCA-TCCAGCTCCA	14.9 Kb
184	4424-L03810	Ekzon 8	1280-1279 rev.	CAGTACGTTA-TGGCTTGCAA	2.3 Kb
229	5941-L05940	Ekzon 9	1434-1435	AACCTGCAGT-CTGGAAGTCG	14.4 Kb
238	6402-L09795	Ekzon 10	1547-1548	TTCCTGAAGC-GTGTGCCAC	14.2 Kb
265	4427-L03813	Ekzon 11	1737-1738	TAAGGGGAAG-AGCCACAAGC	2.9 Kb
292	4428-L03814	Ekzon 12	1858-1859	GGTCACTTTT-CTTGAAGAT	1.0 Kb
319	4429-L03815	Ekzon 13	2038-2039	TCTACTCTTT-ACCGACTGGA	1.2 Kb
346	4430-L03816	Ekzon 14	2254-2253 rev.	TGCATGTCTC-GTGGCCGAAG	1.5 Kb
148	4431-L03817	Ekzon 14	5467-5468	GATCTTTACT-GAATTTGCCC	3.2 Kb
		Stop codon	2191-2193		

Tablo 3.5. GNRH1 Gen Probenun Özellikleri

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	Ekzon	Ligasyon bölgesi NM_000825.3	Sekans dizilimi (Ligasyon bölgesine komşu 20 nt)	Sonraki proba mesafe
		Start kodon	1711-1713		
229	4442-L03828	Ekzon 1	964-965	ATGATGTCCT-GTCCTTCACT	2.5 Kb
337	4443-L03829	Ekzon 2	1917-1918	CCAGCCACGT-TCTCCCTCC	2.2 Kb
427	4444-L03830	Ekzon 3	1990-1991	AAGATTTAAA-TCCATTGGGC	
		Stop kodon	1987-1989		

Tablo 3.6. GNRHR Gen Probenun Özellikleri

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	Ekzon	Ligasyon bölgesi NM_000406.2	Sekans dizilimi (Ligasyon bölgesine komşu 20 nt)	Sonraki proba mesafe
		Start kodon	1752-1754		
148	4445-L03831	Ekzon 1	426-427	ACTGGTCTAA-GCTGCTCAAG	1.6 Kb
184	4446-L04844	Ekzon 1	2063-2064	GAACATTACA-GTCCAATGGT	9.4 Kb
283	4447-L05586	Ekzon 2	2415-2416	CTCTTCATCA-TCCCTCTTTT	4.0 Kb
445	4448-L03834	Ekzon 3	2557-2558	TAAAAATGAC-GGTTGCATTT	
		Stop kodon	2736-2738		

Tablo 3.7. PROK2 Gen Probenun Özellikleri

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	Ekzon	Ligasyon bölgesi NM_0011261 28.1	Sekans dizilimi (Ligasyon bölgesine komşu 20 nt)	Sonraki proba mesafe
		Start kodon	155-157		
436	11959-L12779	Ekzon 1	Ekzon 1'den sonra 3 nt	ACCGGGGTAA-GCGGCCCGGG	3.4 Kb
382	11957-L12777	Ekzon 2	317-318	GTCAAGAGCA-TAAGGATTTG	7.1 Kb
154	11953-L12773	Ekzon 3	İntron	CCCAGAAGAA-TTAGCCTTTA	1.6 Kb
244	11956-L12776	Ekzon 4	458-459	CACTTGCCCA-TGTCTGCCAG	
		Stop kodon	542-544		

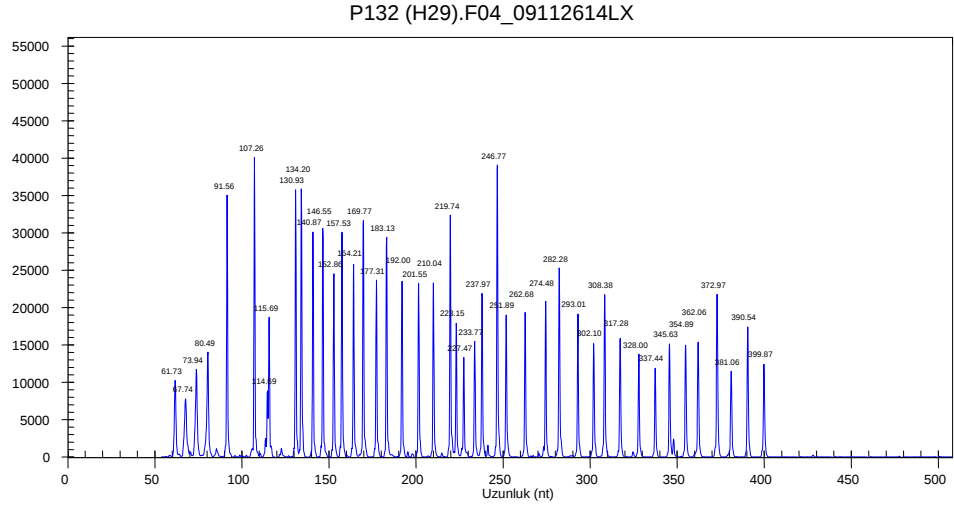
Tablo 3.8. PROKR2 Gen Probenun Özellikleri

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA probu	Ekzon	Ligasyon bölgesi NM_144773.2	Sekans dizilimi (Ligasyon bölgesine komşu 20 nt)	Sonraki proba mesafe
		Start kodon	1-3		
190	11954-L12774	Ekzon 1	183-184	TGCACTGGCA-GGCATCATGC	12.0 Kb
391	11958-L12778	Ekzon 2	1015-1016	GTCAAGAACA-ACACCATGAA	
		Stop kodon	1153-1155		

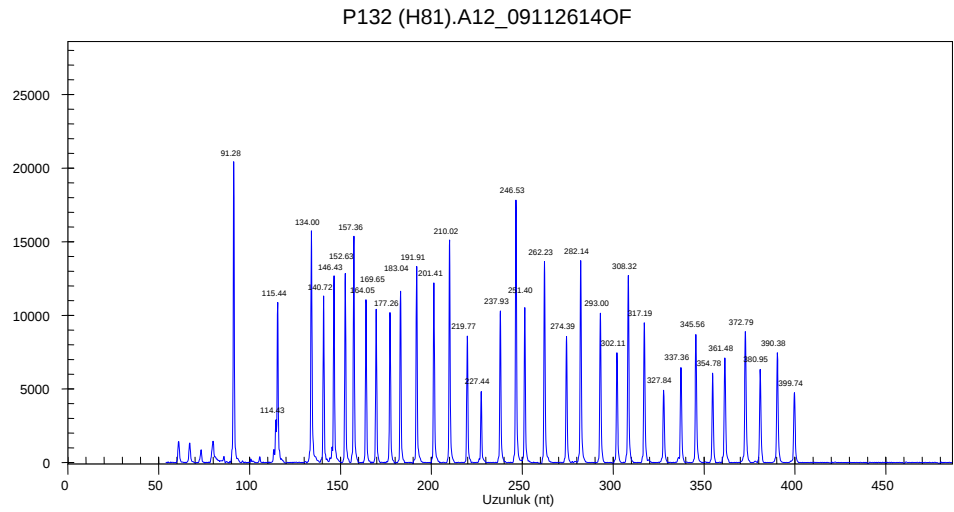
BULGULAR

Çalışmaya yaşları 18-26 arasında değişen, 86'sı İHH'li (10'u KS'lu ve 76'sı nİHH'li) ve 95'i sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 181 erkek alındı. P132 KAL-1 kitinin MLPA problemleri ile KAL1 geni, P133-B1 KAL-1 kitinin MLPA problemleri ile GnRH, GnRHR, PROK2 ve PROKR2 genleri olası mutasyonlar yönünden incelendi. Qiagen kiti kullanılarak İHH'li hastaların ve hasta olmayan kontrol grubunun beyaz kan hücrelerinden DNA'ları izole edildi. İzole edilen DNA, MLPA kitinin prob setleri ile bir gece boyunca hibridize edildi. Hibridizasyonun ardından, bir ligasyon reaksiyonu ve PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri, kapiller elektroforez aracılığıyla ayrıştırıldı ve Beckman Coulter CSQ 8000 cihazında fragment analizi yapıldı. Coffalyser programı kullanılarak fragment analizinden alınan sonuçlar, MLPA kitinin referans değerleriyle karşılaştırıldı.

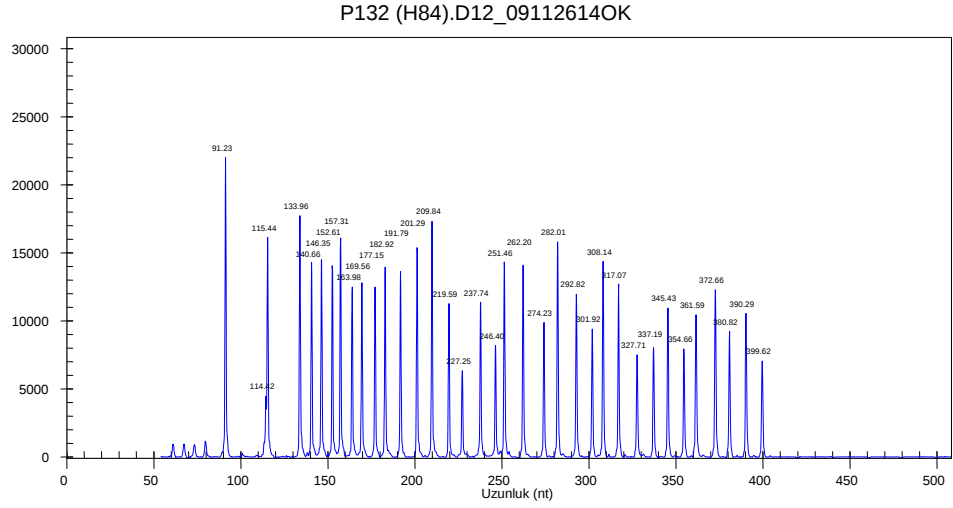
Sonuç olarak, KS'lu 3 farklı hastada (29, 81 ve 84 no'lu hastalarda) KAL1-Ekzon 9'da KAL1 probu 5941-L05940 hedef dizisinde heterozigot delesyon ve bu hastalardan birinde (81 no'lu hastada) ilave olarak KAL1-Ekzon 11'de KAL1 probu 4427-L03813 hedef dizisinde duplikasyon saptandı (Şekil 3.1-3.3). Ayrıca, nİHH'li 3 farklı hastada (sırasıyla 43, 65 ve 76 no'lu hastalarda) PROK2-Ekzon 3'te PROK2 probu 11953-L12773 hedef dizisinde duplikasyon (Şekil 3.4), GnRHR-Ekzon 2'de GnRHR probu 4447-L05586 hedef dizisinde heterozigot delesyon (Şekil 3.5) ve GnRHR-Ekzon 1'de GnRHR probu 4445-L03831 hedef dizisinde duplikasyon gösterildi (Şekil 3.6). PROKR2 ve GnRH1 genlerinde ise çalışmaya dahil edilen hasta grubunda mutasyon tanımlanmadı. İlave olarak, bu mutasyonların hiç biri sağlıklı kontrol grubunda saptanmadı.



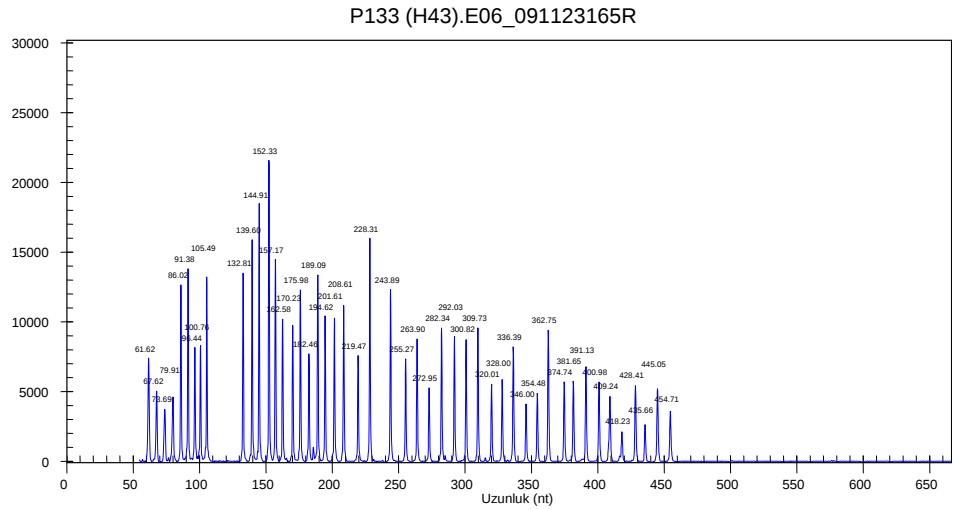
Şekil 4.1. 29 no'lu hastada KAL1 geninin 9. ekzonunda KAL1 probu 5941-L05940 hedef dizisinde heterozigot delesyon



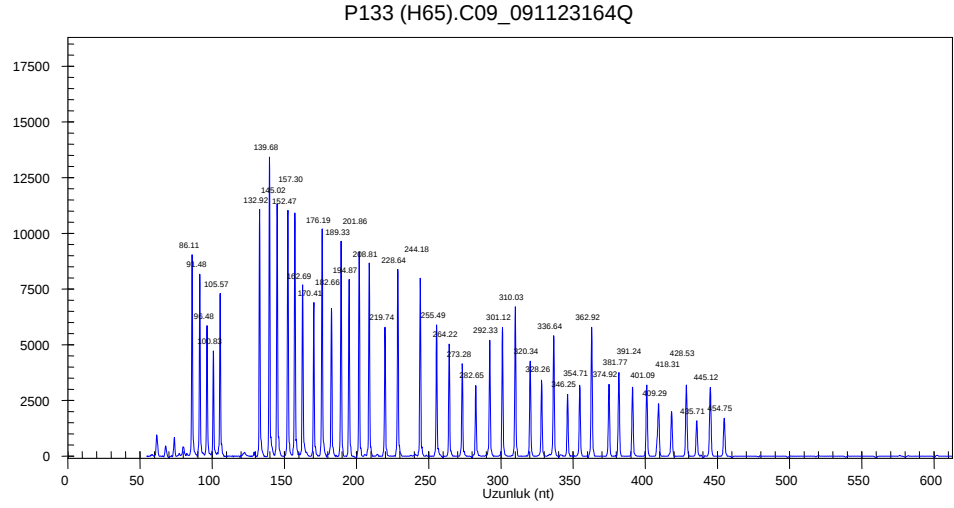
Şekil 4.2. 81 no'lu hastada KAL1 geninin 9. ekzonunda KAL1 probu 5941-L05940 hedef dizisinde heterozigot delesyon ve 11. ekzonunda KAL1 probu 4427-L03813 hedef dizisinde duplikasyon



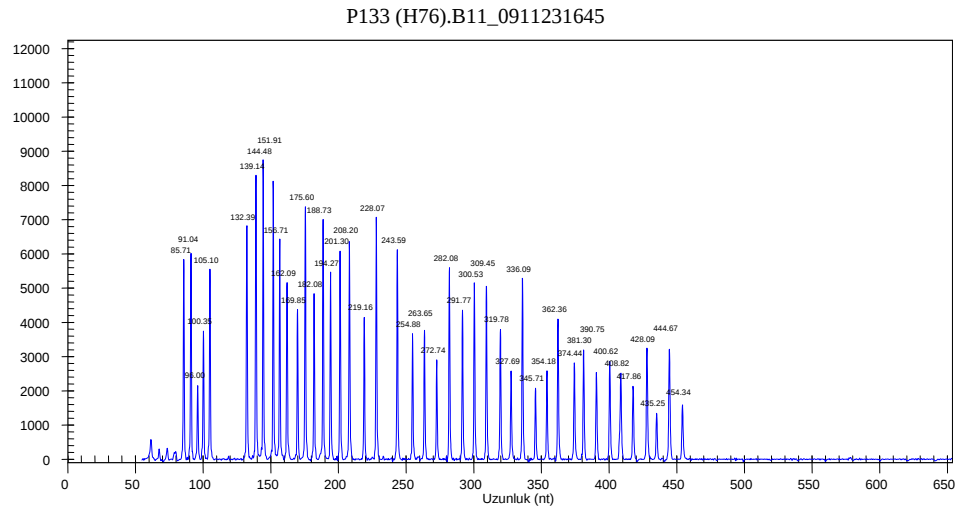
Şekil 4.3. 84 no'lu hastada KAL1 geninin 9. ekzonunda KAL1 probu 5941-L05940 hedef dizisinde heterozigot delesyon



Şekil 4.4. 43 no'lu hastada PROK2 geninin 3. ekzonunda PROK2 probu 11953-L12773 hedef dizisinde duplikasyon



Şekil 4.5. 65 no'lu hastada GnRHR geninin 2. ekzonunda GnRHR probu 4447-L05586 hedef dizisinde heterozigot delesyon



Şekil 4.6. 76 no'lu hastada GnRHR geninin 1. ekzonunda GnRHR probu 4445-L03831 hedef dizisinde duplikasyon

TARTIŞMA

Hipogonadizm, yetersiz gonadal fonksiyon olarak tanımlanır. Hipotalamik ya da hipofizer düzeyde bozukluk sonucu ortaya çıkarsa hipogonadotropik hipogonadizmden, testiküler bozukluk sonucu ortaya çıkarsa hipergonadotropik hipogonadizmden bahsedilir. Normal radyolojik görüntüleme ile birlikte ön hipofizin diğer endokrin fonksiyonlarının normal olduğunun gösterilmesi ile İHH tanısı konmuş olur. İHH'de koku duyusu korunmuş olabileceği gibi, azalmış da olabilir.

KS, İHH'in konjenital formu olup anosmi veya hiposmi ile karakterize defektif koku duyusu ile ilişkilidir (115). Anosmi veya hiposmi olfaktör bulbus ve traktuslarının yokluğu veya hipoplazisi sonucu gelişmektedir (116). Hipogonadizm GnRH eksikliğinden kaynaklanmakta olup (117), patogenezinin muhtemelen GnRH sentezleyen nöronların embriyonik dönemdeki migrasyon defektleri sorumludur (118). Bu hücreler normalde fetal dönemde olfaktör epitelden olfaktör sinir trasesi boyunca hipotalamusa göç ederler (119) ve bu hücrelerin göçü KAL1 tarafından üretilen 680 aminoasitten oluşan nöronal hücre adezyon molekül proteini olan anosminin ekspresyonuna bağlıdır (120). Bazı KS'lu hastalarda orta hat kraniyofasiyal defektler (yüksek damak, yarık dudak ve/veya damak), dental agenezi, bimanüel sinkinezi, renal agenezi, sensorinöral işitme kaybı ve okülomotor defektler gibi diğer gelişimsel anomaliler bulunabilmektedir (121). KS erkeklerde daha sık görülebilen genetik olarak heterojen bir hastalıktır. Bildirilen olguların çoğunluğu sporadik olmalarına rağmen, X kalıtlı, otozomal dominant ve resesif geçişler rapor edilmiştir. Günümüze kadar, KS'undan sorumlu 5 farklı gen tanımlanmıştır: Xp22.3 kromozomu üzerinde lokalize olan ve X geçişli formundan sorumlu olan KAL1 geni (122), 8p11.2-12 ve 10q24 kromozomları üzerinde bulunan ve otozomal dominant formu oluşturan FGFR1 (KAL2) ve FGF8 genleri (66), otozomal resesif formu oluşturan 20p12.3 kromozomu üzerindeki PROKR2 ve 3p13 kromozomu üzerinde lokalize olan PROK2 genleri (123).

KS'lu hastalarda KAL1 geninin defektif olduğu ilk olarak 1991 yılında Franco ve ark.'ları (124) ve Legouis ve ark.'ları (62) tarafından rapor edilmiştir. Ancak, bu gendeki ilk intragenik delesyon 1992 yılında Bick ve ark.'ları tarafından tanımlanmıştır (125). Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada, KAL1 geninin 14 ekzonunda da farklı mutasyonlar saptanmıştır. Ancak, ailesel KS'lu hastaların yaklaşık olarak sadece %50'sinde bu genetik defektler tanımlanabilmiştir (126). Başlangıçta, KS'a en sık X geçişli formun neden olduğu kabul edilirken, sonraki çalışmalarda hem ailesel hem de sporadik KS'lu hastaların çoğunda otozomal genlerdeki mutasyonların daha sık görüldüğü tespit edilmiştir (127). Maya-Nunez ve ark.'larının X geçişli KS'lu 12 erkek hastada yaptıkları bir çalışmada 7 hastanın KAL1 geninde genetik defektler saptamışlardır (1'inde ekzon 3-5'te delesyon ve diğer 6'da ekzon 11'de *missense* mutasyon) (128). İlginç olan, bu oranın daha önce rapor edilenlerden daha yüksek oluşudur. Ancak, bu mutasyonların hiçbirinin KAL1 geninin kodlayıcı sekanslarında bulunmayışı bir başka X geçişli genin bu bozukluktan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. İHH'in sporadik formlarında ise (anosmi olsun ya da olmasın) KAL1 gen mutasyonlarının prevalansı %3,1-27,8 arasında bulunmuştur (129, 130). Bhagavath ve ark.'ları ise 138 İHH'li hastada (109'u erkek ve 29'u kadın) yaptıkları bir çalışmada normosmik erkek bireylerde KAL1 mutasyon prevalansını %3,7; anosmik / hiposmik erkek bireylerdeki prevalansını ise %6,3 oranında saptayıp, İHH'li hastalarda KAL1 gen mutasyonlarının görülme sıklığının önceki çalışmalarda rapor edilenden daha az oranda olduğunu belirtmişlerdir (64). Bizim çalışmamızda da, 86 İHH'li (76 nİHH'li ve 10'u KS'lu) hastadan sadece 3'ünde (29, 81 ve 84 no'lu hastalar) KAL1 mutasyonu saptanmış olup, bu oran %3,4 civarında tespit edildi. Her 3 hastada ekzon 9'un KAL1 probu 5941-L05940 hedef dizisinde heterozigot delesyon saptandı. İlave olarak, 81 no'lu hastada ekzon 11'in KAL1 probu 4427-L03813 hedef dizisinde duplikasyon olduğu gösterildi (*compound* heterozigot mutasyon). KAL1 mutasyonu saptanan hastaların tamamında hiposmi ile uyumlu bulgular saptandı. Hiposmi tarifleyen ve KS'lu kabul edilen bu hastalar arasındaki oran ise %30 olarak tespit edildi. Defektif koku duyusunu kantitatif

olarak değerlendiren bir test olmadığından dolayı, olgularımızın olfaktör fonksiyonlarını kahve, soğan, sarımsak gibi keskin kokuları sorgulayarak değerlendirdik. Ayrıca, MRG ile hastaların olfaktör bulbus ve traktusları görüntülendi. Çalışmamızda, olguların hiç birinde (KS'lu hastalar dahil) olfaktör bulbus ve traktuslarda patoloji saptanmadı. Koku duyusunun değerlendirilmesinde yanılığı payının yüksek olması KS'lu hastalarda saptadığımız yüksek oranı açıklayabilir. Mutasyon saptanan KS'lu olguların aile anamnezlerinde gecikmiş puberte, hipogonadotropik hipogonadizm veya defektif koku duyusu olan bireylerin olmaması nedeniyle bu mutasyonların sporadik olarak geliştiği kabul edildi. Koku duyusunu değerlendirmede en sık kullanılan testlerden biri *University of Pennsylvania smell identification test* (UPSİT)'idir (131). Ancak, klinik pratikte bu testin uygulanışı standardize edilmemiştir. Olfaktor bulbus, traktus ve sulkusun da yer aldığı olfaktör kompleks patolojilerinin değerlendirilmesinde görüntüleme yöntemlerinden en çok tercih edileni ise MRG'dir.

Matsuo ve ark.'ları, aynı KAL1 mutasyonu olan erkek homozigot ikizlerde yaptıkları bir çalışmada farklı fenotipik özellikler ve GnRH'ya farklı LH ve FSH yanıtları rapor etmişlerdir (132). KS'nun genetik ve klinik olarak heterojen bir hastalık olduğunu destekleyen bu bulgular genotip ve fenotip arasında ilişki kurmayı zorlaştırmaktadır. Bizim çalışmamızda, olgularımızın hiç birinde kraniyofasiyal defektler, dental agenezi, bimanüel sinkinezi, sensorinöral işitme kaybı, okülomotor defektler gibi gelişimsel anomaliler saptanmadı.

Farelerde yapılan çalışmalarda, PROKR2 ve ligandı olan PROK2 genlerinin olfaktör bulbusun ve reproduktif sistemin gelişiminde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (133, 134). Bu transmembran reseptörü bulunmayan homozigot mutant bir farede olfaktör bulbusta anormal gelişim ile birlikte reproduktif sistemde ciddi düzeyde atrofi saptanması bunu desteklemektedir. Ancak, PROKR2 ve PROK2 genlerinde heterozigot mutasyonlar saptanan farelerde bu gelişim defektleri rapor edilmemiştir (134). Anosmin-1 düzeylerinin heterozigot mutant farelerde daha yüksek saptanmasının bu defektlerin oluşmasında koruyucu rol oynadığı belirtilmiştir

(135). Daha sonraları, Dode ve ark.'ları KS'u tanısıyla takip edilen 192 hastatadan (144'ü erkek ve 48'i kadın) değişen derecelerde olfaktör ve reproduktif disfonksiyonu olan 14'ünde PROKR2 geni ile ilişkili olan 10 farklı mutasyon tanımlamışlardır (biri *frameshift* mutasyon, diğer dokuz tanesi *missense* mutasyon). Bu mutasyonların 10 tanesi heterozigot, 2 tanesi homozigot ve diğer 2 tanesi *compound* heterozigot olarak rapor edilmiştir. İlave olarak, hastaların 4 tanesinde PROKR2 ligandı olan PROK2'de de 2'si ailesel, 2'si sporadik ve tamamı heterozigot olan mutasyonlar saptamışlardır (iki tane *missense*, bir tane *frameshift* ve bir tane tek nükleotid mutasyonu) (123). Ancak, PROK2 ve PROKR2 gen mutasyonları ile ilgili prokinetisin ileti yollarındaki defektleri tanımlayan fonksiyonel çalışmalar ilk olarak Lindsay ve ark.'ları tarafından tanımlanmıştır. 170 KS'lu ve 154 nİHH'li hastada (257'si erkek ve 67'si kadın) yaptıkları bir çalışmada hastaların 5'inde PROK2 (4'ü KS'lu ve 1'i nİHH'li), 11'inde PROKR2 (7'si KS'lu ve 4'ü nİHH'li) mutasyonları saptamışlardır. Ayrıca, KS'lu hastalardan 1'inde PROK2 ve PROKR2 mutasyon birlikteliği gösterilmiştir. PROK2 mutasyonlarının 1'i homozigot delesyon ve 4'ü heterozigot *missense* mutasyon; PROKR2 mutasyonlarının tamamı ise heterozigot *missense* mutasyon olarak rapor edilmiştir. Tüm mutant allellerde intrasellüler kalsiyum mobilizasyonunun, 7'sinde MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) ileti yolağının, 6'sında da reseptör ekspresyonunun azaldığı ortaya konmuştur. İlginç olarak, PROKR2 gen mutasyonu saptanan bir bayan hastada spontan olarak göğüs gelişimi (Tanner evre IV) ve bir erkek hastada testosteron replasman tedavisi sonrası hipogonadizmde düzelme saptanmıştır (testislerde büyüme, fertilité ve normal serum testosteron düzeyleri) (72). Canto ve ark.'ları, daha önceden 10'unda KAL1 gen mutasyonu saptanan, 18-54 yaşları arasında olan, tamamında anosmi veya hiposmi tespit edilen ve aile hikayesi olmayan hastalarda yaptıkları bir çalışmada 24 KS'lu hastadan 2'sinde PROKR2 geninde heterozigot nükleotid transversyonu rapor etmişlerdir. PROKR2 gen mutasyonu olan hastalardan birinde ilave olarak KAL1 geninin 11. ekzonunda da mutasyon saptanmıştır (136). Ayrıca, Dode ve ark.'larının PROKR2 geninde aynı heterozigot mutasyon saptanan bir hastanın KAL1 geninin 8.

ekzonunda da nokta mutasyonu saptamaları (123) digenik kalıtımın KS'nun patogenezeninden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Pitteloud ve ark.'ları KS'lu iki erkek kardeş ile nİHH'li kız kardeşlerinde PROK2 geninin 2. ekzonunda homozigot ve aseptomatik olan diğer erkek kardeşte de aynı bölgede heterozigot delesyon tanımlamışlardır. Heterozigot mutasyona sahip erkek kardeşle karşılaştırıldığında, homozigot mutasyonu olan kardeşlerde İHH kliniğinin daha şiddetli seyrettiğini göstermişlerdir. Buna dayanarak, KS / nİHH oluşumu için her iki PROK2 allelde de mutasyon oluşması gerektiği ya da alternatif olarak, GnRH nöronal sistemin bütünlüğünde rol oynayan diğer gen defekti / defektlerinin mutant PROK2 alleli ile sinerjistik etki göstermesi gerektiği hipotezlerini ortaya atmışlardır (74). Bu hipotez, Abreu ve ark.'larının, 63 KS'lu ve 44 nİHH'li hastada (87'i erkek ve 20'si kadın) yaptıkları bir çalışmada desteklenmiştir. PROK2 geninde biri homozigot (4. ekzonda T insersiyonu), diğeri heterozigot (2. ekzonda tek baz çiftlik delesyon) olan toplam 2 mutasyon ve PROKR2 geninde biri homozigot (*nonsense*), diğeri heterozigot (*missense*) olan toplam 4 mutasyon saptanan çalışmada, heterozigot mutasyonların İHH fenotipinin oluşması için yeterli olmadığı, KS veya nİHH fenotipi için biallelik fonksiyonel mutasyonların olması gerektiği belirtilmiştir (73). Bizim çalışmamızda, nİHH'li olarak kabul edilen sadece bir hastada (43 no'lu hasta) PROK2 geninin 3. ekzonunun PROK2 probu 11953-L12773 hedef dizisinde duplikasyon saptandı. nİHH'li hastalar arasında bu oran %1,3, tüm İHH'li hastalar arasında ise %1,1 olarak tespit edildi. Anamnez ve MRG ile olfaktör fonksiyonları normal olarak değerlendirilen bu olguda İHH fenotipinin olması tanımlanmamış başka bir mutasyonun varlığını düşündürmektedir.

GnRH geni 8p21-p11.2 kromozomunda lokalize olup, bir hayvan modelinde GnRH gen delesyonunun otozomal resesif geçişli hipogonadotropik hipogonadizme neden olduğu rapor edilmiştir (83). İlginç olarak, insanlarda yapılan çalışmalarda henüz bu gende herhangi bir mutasyon saptanmamış olmasıdır. GnRHR geni 4q21.2 kromozomunda lokalize olup 18.9 Kb uzunluğundadır. 328 aminoasitlik bir proteini kodlayan 3 ekzon içermektedir (137). 7 tane transmembran domaini bulunan *G protein-*

coupled receptor ailesinden olup, ekstrasellüler amino terminali içeren ve intrasellüler karboksi terminali olmayan bir reseptördür. Bu reseptörün aktivasyonu fosfolipaz C'nin aktivasyonuna ve intrasellüler kalsiyumun mobilizasyonuna neden olmaktadır (138). GnRHR genindeki mutasyonlar ilk olarak Roux ve ark.'ları tarafından 1997 yılında tanımlanmıştır (139). Günümüze kadar, sporadik veya ailesel İHH'i olan hastalarda yaklaşık olarak 20 farklı homozigot veya *compound* heterozigot mutasyon rapor edilmiştir (140). En sık GnRHR mutasyonları Q106R ve R262Q olup rapor edilmiş olan GnRHR mutasyonlarının neredeyse yarısını oluşturmaktadırlar (141). Her iki mutasyonun *compound* heterozigot özellikte olup in vitro çalışmalarda reproduktif fonksiyonlarda parsiyel kayıplara neden oldukları gösterilmiştir (142). Yaklaşık olarak otozomal resesif İHH olgularının %40'ı ve sporadik İHH olgularının %16'sı GnRHR genindeki mutasyonlar sonucudur (143). Bizim çalışmamızda, nİHH'li olarak kabul edilen 2 hastada (sırasıyla 65 ve 76 no'lu hastalar) GnRHR geninin 2. ekzonunun GnRHR probu 4447-L05586 hedef dizisinde heterozigot delesyon ve aynı genin 1. ekzonunun GnRHR probu 4445-L03831 hedef dizisinde duplikasyon saptandı. Aile anamnezleri olmadığı için her iki olgu sporadik olarak kabul edildi ve nİHH'li hastalar arasındaki GnRHR mutasyon oranı %2,6 olarak saptandı. GnRHR mutasyonu olan nİHH'li hastaların fenotipik spektrumu parsiyel hipogonadizmden komplet hipogonadizme kadar değişkenlik gösterebilir. Lin ve ark.'ları tarafından GnRHR'ünde parsiyel fonksiyon kaybına neden olan bir mutasyon sonucu pubertede gecikme ve sınırda oligospermi rapor edilmiştir (144). Daha önceki çalışmalardan farklı olarak, Cerrato ve ark.'larının 38'i Türk olan 166 nİHH'li hastada (138'i erkek ve 28'i kadın) yaptıkları bir çalışmada GnRHR geni ile ilgili 2'si otozomal dominant geçişli toplam 24 adet mutasyon tanımlamışlardır. GnRHR geninin heterozigot varyantlarının da karşı allelede mutasyon olmadan hastalık fenotipine neden olabileceğini belirtmişlerdir (145).

Çalışmamızda da kullandığımız MLPA, genomik dizideki delesyon ve duplikasyonları saptayan yeni ve etkili bir yöntemdir (146). Yakın geçmişe kadar, İHH'li hastalarda tanımlanan mutasyonların birçoğu PCR yöntemiyle

yapılan DNA dizilimi ile ortaya konmaktaydı (147). Ancak bu yöntem ile normal allelin de amplifiye edilip dizilenebileceğinden dolayı, heterozigot gen delesyonları her zaman saptanamayabilir. Bundan dolayı, hastalığın patogenezinin sorumlu henüz tanısı konmamış mutasyonların olması muhtemeldir. Geleneksel yöntemlerle mutasyon saptanmayan meme / over kanserli (148) ve kistik fibrozisli hastalarda (149) MLPA yöntemiyle heterozigot intragenik mutasyonların saptanabilmiş olması bunu desteklemektedir. Pedersen-White ve ark.'ları, 14'ü nİHH'li ve 40'ı KS'lu olan 54 İHH'li hastada (45'i erkek ve 9'u kadın) MLPA yöntemini kullanarak yatıkları bir çalışmada, KAL1 gen delesyonlarının sıklığını geleneksel yöntemler ile yapılan daha önceki çalışmalarda rapor edilmiş oranlar ile benzer bulmuşlardır (150).

Sonuç olarak, 76'sı nİHH'li ve 10'u KS'lu olan 86 hastanın 3'ünde KAL1 gen mutasyonu (29 ve 84 no'lu hastalarda heterozigot delesyon, 81 no'lu hastada *compound* mutasyon olarak değerlendirilen heterozigot delesyon ve duplikasyon birlikteliği), 2'sinde GnRHR gen mutasyonu (65 no'lu hastada heterozigot delesyon ve 76 no'lu hastada duplikasyon) ve 1'inde PROK2 gen mutasyonu (43 no'lu hastada heterojen duplikasyon) saptanmıştır. Bu genetik defektlere sahip hastaların ailesel anamnezleri negatif olarak değerlendirildi. Bu da tanımlanan bu mutasyonların sporadik olduklarını göstermektedir. Çalışmaya dahil edilen hastaların hiç birinde PROKR2 ve GnRH1 genlerinde mutasyon saptanmamıştır. Ayrıca, bu mutasyonların hiç biri sağlıklı kontrol grubunda gösterilememiştir. 86 hastanın sadece 6'sında genetik defektlerin tanımlanabilmiş olması hipogonadizmin patogenezinin sorumlu olan ve tanımlanması gereken başka genlerin de olduğunu düşündürmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Üreme ile ilgili bozukluklar hem hasta hem de toplum açısından önemli sosyal, medikal ve ekonomik problemler oluşturmaktadır. Son yıllarda hipotalamo-hipofizer-testiküler aksın gelişimi ve fonksiyonlarında rol oynayan bir dizi gen tanımlanmıştır. Bu genler, bu aksın farklı basamaklarında eksprese olan transkripsiyon faktörlerini, hormonları, reseptörleri ve enzimleri kodlayıp, gelişim için gerekli olan kompleks parakrin ve endokrin etkileşimler sergilemektedirler. Üreme ile ilgili fizyolojik ve patofizyolojik basamakların daha iyi kavranması, genetik danışma, yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve bunların bireyselleştirilmesi amacıyla önemlidir. Örneğin, gonadotropinlerin fizyolojik rolünün anlaşılması ile günümüzde tedavi amaçlı yaygın olarak kullanılan rekombinant gonadotropinler üretilmiştir. Bu süreçte rol oynayan diğer faktörlerin keşfedilmesi klinik tecrübe kazanmamız açısından da önemlidir.

Genomik delesyon ve duplikasyonların saptanmasında geleneksel yöntemlere göre daha hassas olduğundan MLPA yöntemi tercih edilmelidir. Kullanımının daha basit, maliyetinin daha ucuz ve analiz sonuçlarının daha verimli olması bu yöntemin diğer avantajlarıdır.

Özellikle yoğun hasta akışı olan merkezlerde genetik çalışmaların rutin olarak uygulanması gereklidir. İHH'e neden olan bu genetik defektlerdeki kliniğin oldukça heterojen oluşu, çevresel faktörlerin veya başka genlerin de bu süreçten sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ercan, O., Adölesanın fiziksel gelişimi, Adölesan sağlığı II Sempozyum dizisi, 63, 13-18, 2008.
2. Büyükgediz, A., Puberte, Endokrinoloji el kitabı, İzmir, III. Baskı, İzmir Güven Kitabevi, 135-148, 2004.
3. Bundak, R., Günöz, H., Darendeliler, F., Baş, F., Saka, N., Neyzi, O., Testicular volume in healthy Turkish children and its relation with pubertal parameters, Hormone Research, 53 (suppl 2), 96, 2000.
4. Kınık, E., Büyükgebiz, A., Karaman, Ö., Determination of various parameters of sexual maturity in adolescent boys in Ankara, The Turkish Journal of Pediatrics, 29, 217-226, 1987.
5. Neyzi, O., Alp, H., Yalçındağ, A., Yakacıklı, S., Orhan, A., Sexual maturation in Turkish boys, Annals of Human Biology, 2, 251-259, 1975.
6. Veldhuis, J.D., Rogol, A.D., Johnson, M.L., Endogenous opiates modulate the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man, J. Clin. Invest. 72(6), 2031-2040, 1983.
7. Conn, P.M., The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action, Endocr. Rev., 7, 3, 1986.
8. de Kretser, D.M., Meihardt, A., Meehan, T., et al., The roles of inhibin related peptides in gonadal function, Mol. Cell. Endocrinol., 161, 43-46, 2000.
9. Wahlstrom, T., Huhtaniemi, I., Hovatta, O., Seppala, M., Localization of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and their receptors in human and rat testis using immunohistochemistry and radioreceptor assay, J. Clin. Endocrinol. Metab. 57(4), 825-830, 1983.
10. Dufau, M.L., Catt, K.J., Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in the testis and ovary, Vitam. Horm., 36, 461, 1978.
11. Means, A.R., Fakunding, J.L., Huckins, C., et al., Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis, Recent. Prog. Horm. Res., 32, 477, 1976.

12. Barthke, A., Role of growth hormone and prolactin in the control of reproduction: what are we learning from transgenic and knock-out animals?, *Steroids*, 64(9), 598-604, 1999.
13. Hayes, F.J., DeCruz, S., Seminara, S.B., Boepple, P.A., Crowley, W.F. Jr., Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86(1), 53-58, 2001.
14. Santen, R.J., Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men?, *J. Clin. Invest.*, 56(6), 1555-1563, 1975.
15. Matsumoto, A.M., Bremner, W.J., Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in man, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58(4), 609-614, 1984.
16. Veldhuis, J.D., Rogol, A.D., Samojlik, E., Ertel, N.H., Role of endogenous opiates in the expression of negative feedback actions of androgen and estrogen on pulsatile properties of luteinizing hormone secretion in man, *J. Clin. Invest.*, 74(1), 47-55, 1984.
17. Sheckter, C.B., Matsumoto, A.M., Bremner, W.J., Testosterone administration inhibits gonadotropin secretion by an effect directly on the human pituitary, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 68(2), 397-401, 1989.
18. Hayes, F.J., Seminara, S.B., Decruz, S., Boepple, P.A., Crowley, W.F. Jr., Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85(9), 3027-3035, 2000.
19. O'Connor, A.E., De Kretser, D.M., Inhibins in normal male physiology, *Semin. Reprod. Med.*, 22(3), 177-185, 2004.
20. Clarke, I.J., Rao, A., Fallest, P.C., Shupnik, M.A., Transcription rate of the follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit gene is reduced by inhibin in sheep but this does not fully explain the decrease in mRNA, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 91, 211-216, 1993.

21. Kolb, B.A., Stanczyk, F.Z., Sokol, R.Z., Serum inhibin B levels in males with gonadal dysfunction, *Fertil. Steril.*, 74, 234-238, 2000.
22. Williams, C.L., Nishihara, M., Thalabard, J.C., Grosser, P.M., Hotchkiss, J., Knobil, E., Corticotropin-releasing factor and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey, *Electrophysiological studies, Neuroendocrinology*, 52(2), 133-137, 1990.
23. Baigrie, R.J., Lamont, P.M., Kwiatkowski, D., Dallman, M.J., Morris, P.J., Systemic cytokine response after major surgery, *Br. J. Surg.*, 79(8) 757-760, 1992.
24. Chan, J.L., Heist, K., DePaoli, A.M., Veldhuis, J.D., Mantzoros, C.S., The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men, *J. Clin. Invest.*, 111(9), 1409-1421, 2003.
25. Winter, S.J., Troen, P.E., Testosterone and estradiol are co-secreted episodically by the human testis, *J. Clin. Invest.*, 78, 870, 1987.
26. Dunn, J.F., Nisula, B.C., Rodbard, D., Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53(1), 58-68, 1981.
27. Pardridge, W.M., Landaw, E.M., Testosterone transport in brain: primary role of plasma protein-bound hormone, *Am. J. Physiol.*, 249,534-542, 1985.
28. Herbst, K.L., Bhasin, S., Testosterone action on skeletal muscle, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 7(3), 271-277, 2004.
29. Weiss, L., *Histology, Cell and Tissue Biology*, Fifth Edition, Elsevier Biomedical, 1983.
30. Johnson, L., Spermatogenesis and aging in the human, *J. Androl.*, 7, 331-354, 1986.

31. WHO laboratory Manuel for the examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th ed., Cambridge, England, Cambridge University Press, 1999.
32. Plymate, S.R., Tenover, J.S., Bremner, W.J., Circadian variation in testosterone, sex hormone-binding globulin, and calculated non-sex hormone-binding globulin bound testosterone in healthy young and elderly men, *J. Androl.*, 10, 366-371, 1989.
33. Rosner, W., Sex steroids and the free hormone hypothesis, *Cell*, 124, 455-456, 2006.
34. Harman, S.M., Metter, E.J., Tobin, J.D., Pearson, J., Blackman, M.R., Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men: Baltimore Longitudinal Study of Aging, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 724-31, 2001.
35. Petak, S.M., Nankin, H.R., Spark, R.F., Swerdloff, R.S., Rodriguez-Rigau, L.J., American Association of Clinical Endocrinologists, American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of hypogonadism in adult male patients-2002 update, *Endocr. Pract.*, 8(6), 440-456, 2002.
36. Achermann, J.C., Weiss, J., Lee, E.J., Jameson, J.L., Inherited disorders of the gonadotropin hormones, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 179(1-2), 89-96, 2001.
37. Sigman, M., Jarow, J.P., Endocrine evaluation of infertile men, *Urology*, 50, 659-664, 1997.
38. Zitzmann, M., Nieschlag, E., Hormone substitution in male hypogonadism, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 161, 73-88, 2000.
39. Carter, J.N., Tyson, J.E., Tolis, G., Van Vliet, S., Faiman, C., Friesen, H.G., Prolactin-screening tumors and hypogonadism in 22 men, *N. Engl. J. Med.*, 299(16), 847-852, 1978.
40. Conn, P.M., Crowley, W.F. Jr., Gonadotropin-releasing hormone and its analogues, *N. Engl. J. Med.*, 324(2), 93-103, 1991.

41. Knuth, U.A., Maniera, H., Nieschlag, E., Anabolic steroids and semen parameters in bodybuilders, *Fertil. Steril.*, 52(6), 1041-1047, 1989.
42. MacAdams, M.R., White, R.H., Chipps, B.E., Reduction of serum testosterone levels during chronic glucocorticoid therapy, *Ann. Intern. Med.*, 104(5), 648-651, 1986.
43. Abs, R., Verhelst, J., Maeyaert, J., Van Buyten, J.P., Opsomer, F., Adriaensen, H., Verlooy, J., Van Havenbergh, T., Smet, M., Van Acker, K., Endocrine consequences of long-term intrathecal administration of opioids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85(6), 2215-2222, 2000.
44. Finch, P.M., Roberts, L.J., Price, L., Hadlow, N.C., Pullan, P.T., Hypogonadism in patients treated with intrathecal morphine, *Clin. J. Pain.*, 16(3), 251-254, 2000.
45. Woolf, P.D., Hamill, R.W., McDonald, J.V., Lee, L.A., Kelly, M., Transient hypogonadotropic hypogonadism caused by critical illness, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60(3), 444-450, 1985.
46. Foresta, C., Schipilliti, M., Ciarleglio, F.A., Lenzi, A., D'Amico, D., Male hypogonadism in cirrhosis and after liver transplantation, *J. Endocrinol. Invest.*, 31(5), 470-478, 2008.
47. Zofková, I., Bubeníček, P., Sotorník, I., Hypogonadism, a serious complication of chronic renal insufficiency, *Vnitr. Lek.*, 53(6), 709-714, 2007.
48. Rodríguez, E., Nubiola, A., Luna, M., Hypogonadotropic hypogonadism and gynecomastia as a form of manifestation of squamous carcinoma of the lung, *Arch. Bronconeumol.*, 30(10), 518-519, 1994.
49. Unachukwu, C.N., Uchenna, D.I., Young, E.E., Endocrine and metabolic disorders associated with human immune deficiency virus infection, *West. Afr. J. Med.*, 28(1), 3-9, 2009.
50. Ding, E.L., Song, Y., Malik, V.S., Liu, S., Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *JAMA*, 295(11), 1288-1299, 2006.

51. Newnham, H.H., Rivera-Woll, L.M., Images in clinical medicine, Hypogonadism due to pituicytoma in an identical twin, *N. Engl. J. Med.*, 359(26), 2824, 2008.
52. Nishioka, H., Haraoka, J., Izawa, H., Ikeda, Y., Magnetic resonance imaging, clinical manifestations, and management of Rathke's cleft cyst, *Clin. Endocrinol.*, 64(2), 184-188, 2006.
53. Cohan, P., Foulad, A., Esposito, F., et al., Symptomatic Rathke's cleft cysts: a report of 24 cases, *J. Endocrinol. Invest.*, 27(10), 943-948, 2004.
54. De Vries, L., Lazar, L., Phillip, M., Craniopharyngioma: presentation and endocrine sequelae in 36 children, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 16(5), 703-710, 2003.
55. Sklar, C.A., Grumbach, M.M., Kaplan, S.L., Hormonal and metabolic abnormalities associated with central nervous system germinoma in children and adolescents and the effect of therapy: report of 10 patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52, 9-16, 1981.
56. Stuart, C.A., Neelon, F.A., Lebovitz, H.E., Hypothalamic insufficiency: the cause of hypopituitarism in sarcoidosis, *Ann. Intern. Med.*, 88, 589-594, 1978.
57. Kaltsas, G.A., Powles, T.B., Evanson, J., et al., Hypothalamo-pituitary abnormalities in adult patients with Langerhans cell histiocytosis: clinical, endocrinological, and radiological features and response to treatment, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85(4), 1370-1376, 2000.
58. Flannery, M.T., Pattani, S., Wallach, P.M., Warner, E., Case report: hypothalamic tuberculoma associated with secondary panhypopituitarism, *Am. J. Med. Sci.*, 306(2), 101-103, 1993.
59. Schneider, H.J., Kreitschmann-Andermahr, I., Ghigo, E., Stalla, G.K., Agha, A., Hypothalamopituitary dysfunction following traumatic brain injury and aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review, *JAMA*, 298(12), 1429-1438, 2007.

60. Nachtigall, L.B., Boepple, P.A., Pralong, F.P., Crowley, W.F.J., Adult-onset idiopathic hypogonadotropic hypogonadism--a treatable form of male infertility, *N. Engl. J. Med.*, 336(6), 410-415, 1997.
61. Cariboni, A., Pimpinelli, F., Colamarino, S., et al., The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons, *Hum. Mol. Genet.*, 13, 2781-2791, 2004.
62. Legouis, R., Hardelin, J.P., Levilliers, J., Claverie, J.M., Compain, S., Wunderle, V., Millasseau, P., Le Paslier, D., Cohen, D., Caterina, D., et al., The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules, *Cell*, 67(2), 423-435, 1991.
63. Hardelin, J.P., Levilliers, J., Blanchard, S., Carel, J.C., Leutenegger, M., Pinard-Bertelletto, J.P., Bouloux, P., Petit, C., Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome, *Hum. Mol. Genet.*, 2(4), 373-377, 1993.
64. Bhagavath, B., Xu, N., Ozata, M., Rosenfield, R.L., Bick, D.P., Sherins, R.J., Layman, L.C., KAL1 mutations are not a common cause of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism in humans, *Mol. Hum. Reprod.*, 13(3), 165-170, 2007.
65. Duke, V., Quinton, R., Gordon, I., Bouloux, P.M., Woolf, A.S., Proteinuria, hypertension and chronic renal failure in X-linked Kallmann's syndrome, a defined genetic cause of solitary functioning kidney, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 13(8), 1998-2003, 1998.

66. Dode, C., Levilliers, J., Dupont, J.M., De Paepe, A., Le Du. N., Soussi-Yanicostas, N., Coimbra, R.S., Delmaghani, S., Compain-Nouaille, S., Baverel, F., Pecheux, C., Le Tessier, D., Cruaud, C., Delpech, M., Speleman, F., Vermeulen, S., Amalfitano, A., Bachelot, Y., Bouchard, P., Cabrol, S., Carel, J.C., Delemarre-van de Waal, H., Goulet-Salmon, B., Kottler, M.L., Richard, O., Sanchez-Franco, F., Saura, R., Young, J., Petit, C., Hardelin, J.P., Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome, *Nat. Genet.*, 33(4), 463-465, 2003.
67. White, K.E., Cabral, J.M., Davis, S.I., et al.. Mutations that cause osteoglophonic dysplasia define novel roles for FGFR1 in bone elongation, *Am. J. Hum. Genet.*, 76, 361-367, 2005.
68. Hurley, M.E., White, M.J., Green, A.J., Kelleher, J., Antley-Bixler syndrome with radioulnar synostosis, *Pediatr. Radiol.*, 34, 148-151, 2004.
69. Kress, W., Petersen, B., Collmann, H., Grimm, T., An unusual FGFR1 mutation (fibroblast growth factor receptor 1 mutation) in a girl with non-syndromic trigonocephaly, *Cytogenet. Cell. Genet.*, 91, 138-140, 2000.
70. Muenke, M., Schell, U., Hehr, A., et al., A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome, *Nat. Genet.*, 8, 269-274, 1994.
71. Miura, K., Acierno, J.S. Jr., Seminara, S.B., Characterization of the human nasal embryonic LHRH factor gene, NELF, and a mutation screening among 65 patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH), *J. Hum. Genet.*, 49, 265-268, 2004.
72. Cole, L.W., Sidis, Y., Zhang, C., Quinton, R., Plummer, L., Pignatelli, D., Hughes, V.A., Dwyer, A.A., Raivio, T., Hayes, F.J., Seminara, S.B., Huot, C., Alos, N., Speiser, P., Takeshita, A., Van Vliet, G., Pearce, S., Crowley, W.F. Jr., Zhou, Q.Y., Pitteloud, N., Mutations in Prokineticin 2 and Prokineticin receptor 2 genes in Human Gonadotrophin-Releasing Hormone Deficiency: Molecular Genetics and Clinical Spectrum, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93(9), 3551-3559, 2008.

73. Abreu, A.P., Trarbach, E.B., de Castro, M., Frade Costa, E.M., Versiani, B., Matias Baptista, M.T., Garmes, H.M., Mendonca, B.B., Latronico, A.C., Loss-of-Function Mutations in the Genes Encoding Prokineticin-2 or Prokineticin Receptor-2 Cause Autosomal Recessive Kallmann Syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93(10), 4113-4118, 2008.
74. Pitteloud, N., Zhang, C., Pignatelli, D., Li, J.D., Raivio, T., Cole, L.W., Plummer, L., Jacobson-Dickman, E.E., Mellon, P.L., Zhou, Q.Y., Crowley, Jr. W.F., Loss-of function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 17447–17452, 2007.
75. Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., et al., Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 1761-1766, 2005.
76. de Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., Milgrom, E., Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 10972-10976, 2003.
77. Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., et al., The GPR54 gene as a regulator of puberty, *N. Engl. J. Med.*, 349, 1614-1627, 2003.
78. Phelan, J.K., McCabe, E.R.B., Mutations in NROB1 (DAX1) and NR5A1 (SF1) responsible for adrenal hypoplasia congenita, *Human Mutations*, 18, 472-487, 2001.
79. Muscatelli, F., Strom, T.M., Walker, A.P., et al., Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism, *Nature*, 372, 672-676, 1994.
80. Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., et al., An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X linked adrenal hypoplasia congenita, *Nature*, 372, 635-641, 1994.
81. Achermann, J.C., The role of SF1/DAX1 in adrenal and reproductive function, *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 66, 233-239, 2005.

82. Hamaguchi, K., Arikawa, M., Yasunaga, S., Kakuma, T., Fukagawa, K., Yanase, T., Nawata, H., Sakata, T., Novel mutation of the DAX1 gene in a patient with X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism, *Am. J. Med. Genet.*, 76(1), 62-66, 1998.
83. Mason, A.J., Hayflick, J.S., Zoeller, R.T., Young, W.S. 3rd., Phillips, H.S., Nikolics, K., Seeburg, P.H., A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse, *Science*, 234, 1366-1371, 1986.
84. Pralong, F.P., Gomez, F., Castillo, E., Cotecchia, S., Abuin, L., Aubert, M.L., Portmann, L., Gaillard, R.C., Complete hypogonadotropic hypogonadism associated with a novel inactivating mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84(10), 3811-3816, 1999.
85. Bhagavath, B., Ozata, M., Ozdemir, I.C., et al., The prevalence of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in a large cohort of patients with hypogonadotropic hypogonadism, *Fertil. Steril.*, 84, 951-957, 2005.
86. Montague, C.T., Farooqi, S., Whitehead, F.P., et al., Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans, *Nature*, 387, 903-908, 1997.
87. Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M., Strosberg, A.D., A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity, *Nat. Genet.*, 18, 213-215, 1998.
88. Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., et al., A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction, *Nature*, 392, 398-401, 1998.
89. Jackson, R.S., Creemers, J.W., Ohagi, S., et al., Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene, *Nat. Genet.*, 16, 303-306, 1997.

90. Jackson, R.S., Creemers, J.W., Farooqi, I.S., et al., Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency, *J. Clin. Invest.*, 112, 1550-1560, 2003.
91. Valdes-Socin, H., Salvi, R., Daly, A.F., et al., Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene, *N. Engl. J. Med.*, 351, 2619-2625, 2004.
92. Lofrano-Porto, A., Barra, G.B., Giacomini, L.A., et al., Luteinizing hormone beta mutation and hypogonadism in men and women, *N. Engl. J. Med.*, 357, 897-904, 2007.
93. Lindstedt, G., Nystrom, E., Matthews, C., Ernest, I., Janson, P.O., Chatterjee, K., Follitropin (FSH) deficiency in an infertile male due to FSH beta gene mutation: a syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high lutropin and normal serum testosterone concentrations, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 36, 663-665, 1998.
94. Phillip, M., Arbelle, J.E., Segev, Y., Parvari, R., Male hypogonadism due to a mutation in the gene for the b-subunit of follicle stimulating hormone, *N. Engl. J. Med.*, 338, 1729-1732, 1998.
95. Reynaud, R., Gueydan, M., Saveanu, A., et al., Genetic screening of combined pituitary hormone deficiency: experience in 195 patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91, 3329-3336, 2006.
96. Fluck, C., Deladoey, J., Rutishauser, K., et al., Phenotypic variability in familial combined pituitary hormone deficiency caused by a PROP1 gene mutation resulting in the substitution of Arg to Cys at codon 120 (R120C), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 3727-3734, 1998.
97. Wu, W., Cogan, J.D., Pfaffle, R.W., et al., Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency, *Nat. Genet.*, 18, 147-149, 1998.

98. Parks, J.S., Brown, M.R., Hurley, D.L., Phelps, C.J., Wajnrajch, M.P., Heritable disorders of pituitary development, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 4362-4370, 1999.
99. Kim, S.S., Kim, Y., Shin, Y.L., Kim, G.H., Kim, T.U., Yoo, H.W., Clinical characteristics and molecular analysis of PIT1, PROP1, LHX3, and HESX1 in combined pituitary hormone deficiency patients with abnormal pituitary MR imaging, *Horm. Res.*, 60 277-283, 2003.
100. Dattani, M.T., Martinez-Barbera, J-P., Thomas, P.Q., et al., Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse, *Nat. Genet.*, 19 125-133, 1998.
101. Thomas, P.Q., Dattani, M.T., Brickman, J.M., et al., Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia, *Hum. Mol. Genet.*, 10, 39-45, 2001.
102. Cohen, R.N., Cohen, L.E., Botero, D., et al., Enhanced repression by HESX1 as a cause of hypopituitarism and septo-optic dysplasia, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88, 4832-4839, 2003.
103. Parks, J.S., Brown, M.R., Transcription factors regulating pituitary development, *Growth Horm. IGF Res.*, 9, 2-8, 1999.
104. Kelberman, D., Rizzoti, K., Avilion, A., et al., Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamopituitary-gonadal axis in mice and humans, *J. Clin. Invest.*, 116, 2442-2455, 2006.
105. Laumonnier, F., Ronce, N., Hamel, B.C., et al., Transcription factor SOX3 is involved in Xlinked mental retardation with growth hormone deficiency, *Am. J. Hum. Genet.*, 71, 1450-1455, 2002.
106. Woods, K.S., Cundall, M., Turton, J., et al., Overand underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism, *Am. J. Hum. Genet.*, 76, 833-849, 2005.
107. Rizzoti, K., Brunelli, S., Carmignac, D., Thomas, P.Q., Robinson, I.C., Lovell-Badge, R., SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis, *Nat. Genet.*, 36, 247-255, 2004.

108. Netchine, I., Sobrier, M.L., Krude, H., et al., Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency, *Nat. Genet.*, 25, 182-186, 2000.
109. Sloop, K.W., Parker, G.E., Hanna, K.R., Wright, H.A., Rhodes, S.J., LHX3 transcription factor mutations associated with combined pituitary hormone deficiency impair the activation of pituitary target genes, *Gene*, 265, 61-69, 2001.
110. Machinis, K., Pantel, J., Netchine, I., et al., Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4, *Am. J. Hum. Genet.*, 69, 961-968, 2001.
111. Tajima, T., Hattori, T., Nakajima, T., Okuhara, K., Tsubaki, J., Fujieda, K., A novel missense mutation (P366T) of the LHX4 gene causes severe combined pituitary hormone deficiency with pituitary hypoplasia, ectopic posterior lobe and a poorly developed sella turcica, *Endocr. J.*, 54, 637-641, 2007.
112. Vissers, L.E., van Ravenswaaij, C.M., Admiraal, R., et al., Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome, *Nat. Genet.*, 36, 955-957, 2004.
113. Chalouhi, C., Faulcon, P., Le Bihan, C., Hertz-Pannier, L., Bonfils, P., Abadie, V., Olfactory evaluation in children: application to the CHARGE syndrome, *Pediatrics*, 116, 81-88, 2005.
114. Pinto, G., Abadie, V., Mesnage, R., et al., CHARGE syndrome includes hypogonadotropic hypogonadism and abnormal olfactory bulb development, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90, 5621-5626, 2005.
115. Kallmann, F.J., Schoenfeld, W.A., Barrera, S.E., The genetic aspects of primary eunuchoidism, *Am. J. Ment. Defic.*, 48, 203-236, 1944.
116. de Morsier, G., Median cranioencephalic dysraphias and olfactogenital dysplasia, *World Neurol.*, 3, 485, 1962.

117. Naftolin, F., Harris, G.W., Bobrow, M., Effect of purified luteinizing hormone releasing factor on normal and hypogonadotropic anosmic men, *Nature*, 232, 496-497, 1971.
118. Schwanzel-Fukuda, M., Bick, D., Pfaff, D.W., Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome, *Mol. Brain. Res.*, 6, 311-326, 1989.
119. Schwanzel-Fukuda, M., Origin and migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mammals, *Microsc. Res. Tech.*, 44(1), 2-10, 1999.
120. Gonzalez-Martinez, D., Kim, S., Hu, Y., Guimond, S., Schofield, J., et al., Anosmin-1 modulates fibroblast growth factor receptor 1 signaling in human gonadotropin-releasing hormone olfactory neuroblasts through a heparan sulfate-dependent mechanism, *J. Neurosci.*, 24, 10384-10392, 2004.
121. Tsai, P.S., Gill, J., Mechanisms of disease: Insights into X-linked and autosomal-dominant Kallmann syndrome, *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, 2, 160-171, 2006.
122. Hardelin, J.P., Levilliers, J., del Castillo, I., Cohen-Salmon, M., Legouis, R., Blanchard, S., Compain, S., Bouloux, P., Kirk, J., Moraine, C., Chaussain, J.L., Weissenbach, J., Petit, C., X chromosome-linked Kallmann syndrome: stop mutations validate the candidate gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 8190-8194, 1992.
123. Dodé, C., Teixeira, L., Levilliers, J., Fouveaut, C., Bouchard, P., Kottler, M.L., Lespinasse, J., Lienhardt-Roussie, A., Mathieu, M., Moerman, A., Morgan, G., Murat, A., Toubanc, J.E., Wolczynski, S., Delpech, M., Petit, C., Young, J., Hardelin, J.P., Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2, *PLoS. Genet.*, 2, 1648-1652, 2006.

124. Franco, B., Guioli, S., Pragliola, A., Incerti, B., Bardoni, B., Tonlorenzi, R., Carrozzo, R., Maestrini, E., Pieretti, M., Taillon-Miller, P., Brown, C.J., Willard, H.F., Lawrence, C., Persico, M.G., Camerino, G., Ballabio, A., A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules, *Nature*, 353, 529-536, 1991.
125. Bick, D., Franco, B., Sherins, R.J., Heye, B., Pike, L., Crawford, J., Maddalena, A., Incerti, B., Pragliola, A., Meitinger, T., Ballabio, A., Brief report: intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome, *N. Engl. J. Med.*, 326, 1752-1755, 1992.
126. Söderlund, D., Canto, P., Méndez, J.P., Identification of three novel mutations in the KAL1 gene in patients with Kallmann syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87(6), 2589-92, 2002.
127. Oliveira, L.M.B., Seminara, S.B., Beranova, M., Hayes, F.J., Valkenburgh, S.B., Schipani, E., Costa, E.M.F., Latronico, A.C., Crowley, Jr. W.F., Vallejo, M., The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 1532-1538, 2001.
128. Maya-Núñez, G., Zenteno, J.C., Ulloa-Aguirre, A., Kofman-Alfaro, S., Mendez, J.P., A recurrent missense mutation in the KAL gene in patients with X-linked Kallmann's syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83(5), 1650-1653, 1998.
129. Sato, N., Katsumata, N., Kagami, M., Hasegawa, T., Hori, N., Kawakita, S., Minowada, S., Shimotsuka, A., Shishiba, Y., Yokozawa, M., et al., Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patient,. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89, 1079-1088, 2004.
130. Albuissou, J., Pecheux, C., Carel, J.C., Lacombe, D., Leheup, B., Lapuzina, P., Bouchard, P., Legius, E., Matthijs, G., Wasniewska, M., et al., Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2), *Hum. Mutat.*, 25, 98-99, 2005.

131. Doty, R.L., Shaman, P., Kimmelman, C.P., Dann, M.S., University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic, *Laryngoscope*, 94, 176-178, 1984.
132. Matsuo, T., Okamoto, S., Izumi, Y., Hosokawa, A., Takegawa, T., Fukui, H., Tun, Z., Honda, K., Matoba, R., Tatsumi, K., Amino, N., A novel mutation of the KAL1 gene in monozygotic twins with Kallmann syndrome, *Eur. J. Endocrinol.*, 143, 783-787, 2000.
133. Ng, K.L., Li, J.D., Cheng, M.Y., Leslie, F.M., Lee, A.G., Zhou, Q.Y., Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling, *Science*, 308, 1923-1927, 2005.
134. Matsumoto, S., Yamazaki, C., Masumoto, K.H., Nagano, M., Naito, M., Soga, T., Hiyama, H., Matsumoto, M., Takasaki, J., Kamohara, M., Matsuo, A., Ishii, H., Kobori, M., Katoh, M., Matsushime, H., Furuichi, K., Shigeyoshi, Y., Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 4140-4145, 2006.
135. Salido, E.C., Li, X.M., Yen, P.H., Martin, N., Mohandas, T.K., et al., Cloning and expression of the mouse pseudoautosomal steroid sulphatase gene (Sts), *Nat. Genet.*, 13, 83-86, 1996.
136. Canto, P., Munguía, P., Söderlund, D., Castro, J.J., Méndez, J.P., Genetic analysis in patients with Kallmann syndrome: coexistence of mutations in prokineticin receptor 2 and KAL1, *J. Androl.*, 30(1), 41-45, 2009.
137. Kaiser, U.B., Dushkin, H., Altherr, M.R., Beier, D.R., Chin, W.W., Chromosomal localization of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene to human chromosome 4q13.1-q21.1 and mouse chromosome 5, *Genomics*, 20, 506-508, 1994.
138. Kakar, S.S., Musgrove, L.C., Devor, D.C., Sellers, J.C., Neill, J.D., Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189, 289-295, 1992.

139. de Roux, N., Young, J., Misrahi, M., Genet, R., Chanson, P., Schaison, G., Milgrom, E., A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor, *N. Engl. J. Med.*, 337, 1597-1602, 1997.
140. Trarbach, E.B., Silveira, L.G., Latronico, A.C., Genetic insights into human isolated gonadotropin deficiency, *Pituitary*, 10(4), 381-391, 2007.
141. Bhagavath, B., Podolsky, R.H., Ozata, M., Bolu, E., Bick, D.P., Kulharya, A., Sherins, R.J., Layman, L.C., Clinical and molecular characterization of a large sample of patients with hypogonadotropic hypogonadism, *Fertil. Steril.*, 85, 706-713, 2006.
142. Bedecarrats, G.Y., Linher, K.D., Kaiser, U.B., Two common naturally occurring mutations in the human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor have differential effects on gonadotropin gene expression and on GnRH-mediated signal transduction, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88, 834-843, 2003.
143. Beranova, M., Oliveira, L.M., Bedecarrats, G.Y., Schipani, E., Vallejo, M., Ammini, A.C., Quintos, J.B., Hall, J.E., Martin, K.A., Hayes, F.J., Pitteloud, N., Kaiser, U.B., Crowley, W.F. Jr., Seminara, S.B., Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 1580-1588, 2001.
144. Lin, L., Conway, G.S., Hill, N.R., Dattani, M.T., Hindmarsh, P.C., Achermann, J.C., A homozygous R262Q mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor (GNRHR) presenting as constitutional delay of growth and puberty with subsequent borderline oligospermia, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91(12), 5117-5121, 2006.

145. Cerrato, F., Shagoury, J., Kralickova, M., Dwyer, A., Falardeau, J., Ozata, M., Van Vliet, G., Bouloux, P., Hall, J.E., Hayes, F.J., Pitteloud, N., Martin, K.A., Welt, C., Seminara, S.B., Coding sequence analysis of GNRHR and GPR54 in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism, *Eur. J. Endocrinol.*, 155, S3-S10, 2006.
146. Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G., Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Res.*, 30(12), e57, 2002.
147. Kim, H.G., Bhagavath, B., Layman, L.C., Clinical Manifestations of Impaired GnRH Neuron Development and Function, *Neurosignals*, 16(2-3), 165-182, 2008.
148. Hogervorst, F.B., Nederlof, P.M., Gille, J.J., McElgunn, C.J., Grippeling, M., Pruntel, R., Regnerus, R., van Welsem, T., van Spaendonk, R., Menko, F.H. et al., Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method, *Cancer Res.*, 63(7), 1449-1453, 2003.
149. Audrezet, M.P., Chen, J.M., Raguenes, O., Chuzhanova, N., Giteau, K., Le Marechal, C., Quere, I., Cooper, D.N., Ferec, C., Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms, *Hum. Mutat.*, 23(4), 343-357, 2004.
150. Pedersen-White, J.R., Chorich, L.P., Bick, D.P., Sherins, R.J., Layman, L.C., The prevalence of intragenic deletions in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome, *Mol. Hum. Reprod.*, 14(6), 367-370, 2008.