Ana Paula de Abreu e Silva

Mutações inativadoras dos genes
PROK2 e *PROKR2* em pacientes com hipogonadismo
hipogonadotrófico isolado

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Latronico Xavier

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Abreu e Silva, Ana Paula de

Mutações inativadoras dos genes *PROK2* e *PROKR2* em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado / Ana Paula de Abreu e Silva. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Ana Claudia Latronico Xavier.

Descritores: 1.Receptor tipo 2 das procinetinas 2.Procinetina 2 3.Síndrome de Kallmann 4.Hipogonadismo 5.Hormônio liberador de gonadotropina 6.Mutações inativadoras 7.Neurogênese do bulbo olfatório

USP/FM/DBD-450/10

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dedico este trabalho aos meus pais,e
ao Otto, por sempre me darem força
para lutar e seguir os meus sonhos.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Ana Claudia Latronico, minha querida orientadora, pelos ensinamentos, otimismo, carinho e compreensão. Pelas oportunidades que me proporcionou e pela confiança. Por ser um exemplo como médica e pesquisadora.

À Profa. Dra. Berenice Mendonça, por ter me recebido no LIM/42 e por ter me ensinado o que é liderança. Pelo seu entusiasmo, alegria e senso de justiça.

À Profa. Dra. Ursula Kaiser por ter me recebido tão bem no seu laboratório, pela sua simpatia e pelos valiosos ensinamentos.

Às Dras. Letícia Gontijo e Ericka Trarbach por compartilharem seus conhecimentos de bancada, pela importante contribuição na realização desta tese e pela amizade.

Ao Dr. Sekoni Noel, pela colaboração essencial nos experimentos, pela disponibilidade e por ter se tornado um grande amigo.

Aos Profs. Drs. Elaine Costa, Sorahia Domenice e Ivo Arnhold pela contribuição na minha formação científica e pela orientação no atendimento aos pacientes

Aos amigos Mariza, Antonio, Milena, Priscilla, Rocio, Luciana Montenegro e Mirian Yumie pela amizade e por ajudarem, cada um de sua maneira, na realização desta tese.

Aos colegas de laboratório da Dra. Ursula Kaiser e do Dr. Yujiang Shi, do Brigham and Women's Hospital, em especial as Dras. Xu Shuyun e Rona Carroll pela colaboração na realização dos experimentos, sugestões e pela ótima convivência no laboratório.

Aos colegas do LIM/42, que deixaram boas lembranças do dia a dia no laboratório.

Às funcionárias Nilda, Cristiane, Cristina, Cidinha e Fran pela ajuda, disponibilidade, competência e carinho.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, incentivo, apoio e educação conferidos a mim durante toda minha vida. À minha avó Chiquinha, pelo seu amor e orações.

Às minhas queridas irmãs Juliana e Fernanda pelo amor e amizade.

Ao Otto pelo amor, compreensão e incentivo.

Aos pacientes e seus familiares pela boa vontade em participar desse projeto.

E, finalmente, a todos que acreditaram e que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Aluna: Ana Paula de Abreu e Silva

Orientadora: Ana Claudia Latronico

Área de concentração: Endocrinologia e Metabologia

Nível: Doutorado Direto

Instituição: Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM-42), Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Division of Endocrinology, Diabetes and Hypertension, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA.
Bolsa sanduíche com a supervisão da Profa. Dra. Ursula B. Kaiser.

Bolsa de Doutorado FAPESP, processo # 06/56753-3R

Apoio Financeiro: Projeto Temático FAPESP 05/04726-0

Outubro de 2010

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Síndrome de Kallmann	3
1.2	Defeitos genéticos associados à HHI.....	5
1.2.1	Migração neuronal	5
1.2.2	Secreção de GnRH.....	9
1.2.3	Ação do <i>GnRH</i>	11
1.2.4	Defeitos digênicos.....	11
1.3	O Sistema das Procineínas.....	13
2	OBJETIVOS	22
3	MÉTODOS	24
3.1	Casuística.....	25
3.2	Avaliação hormonal.....	26
3.3	Avaliação da capacidade olfatória	28
3.4	Avaliação de bulbos e sulcos olfatórios por imagem	29
3.5	Pesquisa de mutações genômicas	30
3.5.1	Extração do DNA genômico de leucócitos.....	30
3.5.2	Reação de polimerização em cadeia (PCR)	30
3.5.3	Sequenciamento automático	32
3.6	Estudos funcionais (<i>In vitro</i>)	33
3.6.1	Mutagenese sítio dirigida.....	33
3.6.2	Clonagem e transformação	34
3.6.3	Transfecção.....	35
3.6.4	Estudos de Sinalização do PROKR2	37
3.6.4.1	Avaliação do Acúmulo de Fosfatidil-Inositol (IP)	37
3.6.4.2	Ensaio de Luciferase (<i>Gene reporter</i>)	38

3.7	Ensaio de Ligação ao Receptor	38
3.8	Ensaio de expressão (<i>Western blot</i>)	39
3.9	Tratamento com a enzima <i>Endo H</i>	40
4	RESULTADOS	41
4.1	Pesquisa de mutações no gene <i>PROK2</i>	42
4.1.1	Variante c.297-298insT (p.G100fsX121)	42
4.1.2	Variante c.163delA (p.I55fsX56)	45
4.2	Pesquisa de mutações no gene <i>PROKR2</i>	46
4.2.1	Variante c.238C>T (p.R80C)	47
4.2.2	Variante c.420C>G (p.Y140X)	49
4.2.3	Variante c.518 T>G (p.L173R)	49
4.2.4	Variante c.802 C>T (p.R268C)	50
4.3	Outros achados moleculares	51
4.4	Estudos funcionais das variantes p.R80C, p.R85C e p.R85H	51
4.4.1	Avaliação do Acúmulo de Fosfatidil-Inositol (IP)	52
4.4.2	Ensaio de Luciferase (<i>Gene reporter</i>)	53
4.4.3	Ensaio de ligação ao receptor	54
4.4.4	Estudos de Expressão	55
4.4.5	Estudos para avaliar efeito dominante negativo	57
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	73
7	REFERÊNCIAS	75

APÊNDICE

Lista das Abreviações

ARC	Núcleo arqueado
Bmax	<i>Capacidade máxima de ligação</i>
BSA	Albumina de soro bovino
Bv8	<i>Bombina variagata peptide 8</i>
cDNA	DNA complementar
CHO	Células derivadas de ovário de <i>hamster</i> chinês
cpm	Contagens por minuto
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagles</i>
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DP	Desvio-padrão
EC50	Concentração efetiva media
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EG-VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular derivado de glândula endócrina
EGR-1	<i>Early Growth Response 1</i>
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FGF1	Fator 1 de crescimento de fibroblastos
FGF2	Fator 2 de crescimento de fibroblastos
FGF8	Fator 8 de crescimento de fibroblastos
FGFR1	Receptor tipo I do fator de crescimento de fibroblasto
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GnRHR	Receptor de GnRH

GPCR	<i>G protein coupled receptor</i> (Receptor acoplado a proteína G)
GPR73	Receptor acoplado a proteína G – 73
HEK-293	Células derivadas de rim embrionário humano
HHI	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado
HHIn	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico
HS	Heparan sulfato
ICV	Intracerebroventricular
IFMA	Ensaio imunofluorométrico
IP	Fosfatidil inositol
IP3	Trifosfatidil inositol
<i>KALI</i>	Gene que codifica anosmina-1
kb	Kilobases
Kd	Constante de dissociação
KDa	Kilodalton
<i>KiSS-1</i>	Gene que codifica a kisspeptina
<i>KiSS-1R</i>	Gene que codifica o receptor da kisspeptina
LB	Meio de cultura de Luria-Bertani
LH	Hormônio luteinizante
LHRH	Fator estimulador do hormônio luteinizante
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MEK	Metil etil cetona
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MIT	<i>Mamba intestinal toxin</i> (veneno da cobra mamba)
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology and Information</i>
NELF	Fator embrionário nasal liberador de LH

NH ₂	Amino terminal (N-terminal)
NK3R	Receptor da taquicinina 3
NKB	Neurocinina B
Pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
<i>PCI</i>	Gene que codifica a enzima pró-convertase 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIP ₂	Fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato
PLC	Fosfolipase C
PROK2	Procineticina 2
PROKR2	Receptor tipo 2 da procineticina
RE	Retículo endoplasmático
RIE	Radioimunoensaio
RM	Ressonância magnética
RNA _m	RNA mensageiro
SDS	Sulfato dodecil de sódio
SK	Síndrome de Kallmann
SNC	Sistema nervoso central
TE	Tampão de Tris e EDTA
Tris	Trisaminometano
UPIST	<i>University of Pensilvania Smell Test</i>

Lista de Figuras

Figura 1.	Migração dos neurônios olfatórios e secretores de GnRH.	4
Figura 2.	Representação esquemática do sistema das Procineticinas.	15
Figura 3.	Cascata de sinalização da PROK2/PROKR2.	17
Figura 4.	A. Representação esquemática do gene <i>PROK2</i> e seus produtos protéicos, as procineticinas. B. Representação esquemática do gene <i>PROKR2</i> . Pb, pares de base; kb, kilobases.	20
Figura 5.	Testes olfatórios desenvolvidos pela Universidade da Pensilvânia	29
Figura 6.	Representação da sequência de aminoácidos da PROK2 e localização das mutações identificadas.	42
Figura 7.	Eletroferograma demonstrando a inserção em homozigose de uma timina (painel A), resultando 7 timinas consecutivas no exon 4 do gene <i>PROK2</i>	43
Figura 8.	Eletroferograma apresentando a deleção em heterozigose de uma adenina (painel A) no exon 1 do gene <i>PROK2</i>	45
Figura 9.	Representação da sequência de aminoácidos do PROKR2.	46
Figura 10.	Pedigrees e eletroferogramas dos pacientes 4, 5, 6 e 8 mostrando a segregação familiar das mutações do gene <i>PROKR2</i>	48
Figura 11.	Produção de fosfatidil inositol total em células COS-7 transfectadas com PROKR2 selvagem (WT) e mutantes R80C, R85C e R85H tratados com PROK2 de 2×10^{-10} a 10^{-7} M.	53
Figura 12.	Luminescência produzida pelas células transfectadas com PROKR2 selvagem (WT) e mutantes R80C, R85C e R85H após estímulo com PROK2 de 10^{-10} a 10^{-7} M.	54
Figura 13.	Curva de dissociação apresentada pelas células tratadas com MIT ¹²⁵ e PROK2 durante 15 minutos em temperatura ambiente.	55
Figura 14.	(A) <i>Western blot</i> representativo de quatro experimentos diferentes. (B) Gráficos ilustrativos da expressão relativa dos receptores mutantes em comparação com o receptor selvagem (WT) usando dados de três experimentos diferentes.	56

Figura 15. <i>Western blot</i> mostrando as proteínas do lisado total de células transfectadas com o receptor selvagem (WT) ou receptor mutante R80C antes e após tratamento com a enzima <i>Endo H</i> (WT + endo H e R80C + endo H).....	57
Figura 16. Células HEK-293 expressando estavelmente o receptor R80C transfectadas com diferentes quantidades de receptor selvagem.	58
Figura 17. Representação esquemática da sequência de aminoácidos do PROKR2.....	65
Figura 18. Alinhamento da sequência de amino ácidos do PROKR2 de diferentes espécies de mamíferos.	67

Lista das Tabelas

Tabela 1.	Frequência de mutações identificadas nos genes relacionados ao HHI..	12
Tabela 2.	Padrão de expressão de PROK1, PROK2, PROKR1 e PROKR2 em tecidos associados à função reprodutiva	14
Tabela 3.	Funções biológicas relacionadas às procinetinas.	16
Tabela 4.	Valores normais de testosterona e LH no sexo masculino, obtidos nos ensaios IFMA e RIE em pré-púberes e adultos	27
Tabela 5.	Valores normais de estradiol e LH no sexo feminino, obtidos nos ensaios de IFMA e RIE em pré-púberes e adultos	27
Tabela 6.	Oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes <i>PROK2</i> e <i>PROKR2</i>	31
Tabela 7.	Oligonucleotídeos usados na mutagênese	34
Tabela 8.	Características clínica de nove pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico ou síndrome de Kallmann associado a mutações dos genes <i>PROK2</i> e <i>PROKR2</i>	44
Tabela 9.	Características hormonais e ressonância magnética da região olfatória de nove pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico ou síndrome de Kallmann associado a mutações dos genes <i>PROK2</i> e <i>PROKR2</i>	44

Resumo

Abreu e Silva AP. *Mutações inativadoras dos genes PROK2 e PROKR2 em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado* [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 86p.

O sistema da procinetina desempenha um papel importante na migração dos neurônios secretores de GnRH e na neurogênese do bulbo olfatório. Camundongos com ablação dos genes que codificam a procinetina 2 (*PROK2*) e seu receptor (*PROKR2*) apresentaram fenótipos semelhantes ao da síndrome de Kallmann descrita em humanos. Mutações inativadoras nos genes *PROK2* e *PROKR2* foram identificadas em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado. Com base nestes achados, investigamos a presença de alterações estruturais nos genes *PROK2* e *PROKR2* em 107 pacientes brasileiros (63 com síndrome de Kallmann e 47 com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico). Cem indivíduos brasileiros que relataram desenvolvimento puberal normal foram utilizados como grupo controle. As regiões codificadoras dos genes *PROK2* e *PROKR2* foram amplificadas utilizando-se oligonucleotídeos intrônicos específicos, seguida de purificação enzimática e sequenciamento automático. Duas mutações no gene *PROK2* foram identificadas: a mutação p.G100fsX121 em homozigose presente em dois irmãos com síndrome de Kallmann; e a mutação p.I55fsX56 em heterozigose identificada em um paciente com HHIn. Quatro mutações foram identificadas no gene *PROKR2* (p.R80C, p.Y140X, p.L173R e p.R268C) em cinco pacientes com síndrome de Kallmann e um paciente com HHIn. Essas mutações não foram encontradas no grupo controle. As mutações do tipo *missense*, p.R80C, p.L173R e p.R268C foram identificadas em heterozigose. Mutações nos genes *FGFR1*, *GnRHR*, *KISS-1* e *GPR54* foram excluídas nesses pacientes. O paciente portador da mutação p.R268C do *PROKR2* apresentou deleção dos exons 1 e 2 do gene *KAL1*. Adicionalmente, as mutações p.R80C e p.R268C foram identificadas em heterozigose em parentes de primeiro grau assintomáticos dos casos índices. A nova mutação p.Y140X do *PROKR2*, única alteração em homozigose, foi identificada em um paciente com micropênis, criptorquidia bilateral, anosmia e palato ogival. Os pais deste paciente eram portadores da mutação p.Y140X em heterozigose e relataram desenvolvimento puberal normal e ausência de anormalidades olfatórias. Estudos *in vitro* da nova mutação p.R80C localizada na primeira alça intracelular demonstraram que o acúmulo de fofatidil-inositol (IP), assim como a ativação da via da MAPK foram significativamente afetadas em células transfectadas com o receptor mutado em relação ao receptor selvagem, indicando que a mutação p.R80C determina uma menor atividade do receptor. Avaliação da expressão por *Western blot* mostrou uma diminuição na expressão do receptor mutado R80C e uma maior expressão de receptores imaturos. Esses achados sugeriram o papel crítico da arginina localizada na posição 80 na atividade normal do receptor. Em conclusão, expandimos o

repertório de mutações deletérias nos genes *PROK2* e *PROKR2* em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado. A haploinsuficiência do *PROKR2* não foi suficiente para causar síndrome de Kallmann ou HHIn, entretanto mutações inativadoras em homozigose nos genes *PROK2* e *PROKR2* foram responsáveis pelo fenótipo reprodutivo e olfatório anormal, em concordância com os estudos prévios de ablação gênica em modelos animais. Arginina localizada na posição 80 do *PROKR2* desempenha um papel crucial na adequada maturação do receptor.

Descritores: 1.Receptor tipo 2 da procineticina 2.Procineticina 2 3.Síndrome de Kallmann, hipogonadismo 4.Hormônio liberador de gonadotropina 5.Mutações 6.Neurogênese do bulbo olfatório

Summary

Abreu e Silva AP. *PROK2 and PROKR2 inactivating mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism* [thesis]. São Paulo. “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 86p.

Physiological activation of the prokineticin pathway has a critical role in olfactory bulb morphogenesis and GnRH secretion. Knock-out mice for genes that encode prokineticin 2 (*PROK2*) and the prokineticin receptor 2 (*PROKR2*) exhibited a phenotype similar to the Kallmann syndrome (KS). Inactivating mutations in *PROK2* and *PROKR2* have been identified in patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism. Based on these findings, we investigated the presence of inactivating mutations of the genes *PROK2* and *PROKR2* in Brazilian patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism associated or not with olfactory abnormalities and performed *in vitro* studies of the new identified mutations. We studied 107 patients with HH (63 with Kallmann syndrome and 44 with normosmic HH) and 100 control individuals. The coding regions of *PROK2* and *PROKR2* were amplified by polymerase chain reaction followed by enzymatic purification and direct automatic sequencing. In *PROK2*, two known frameshift mutations were identified. Two brothers with Kallmann syndrome harbored the homozygous p.G100fsX121 mutation, whereas one male with normosmic HH harbored the heterozygous p.I55fsX56 mutation. In *PROKR2*, four distinct mutations (p.R80C, p.Y140X, p.L173R and p.R268C) were identified in five patients with Kallmann syndrome and in one patient with normosmic HH. These mutations were not found in the control group. The p.R80C and p.R268C missense mutations were identified in heterozygous state in the HH patients and in their asymptomatic first-degree relatives. The p.L173R was also identified in heterozygous state. In addition, no mutations of *FGFR1*, *GnRHR*, *KISS-1* or *GPR54* were identified in these patients. The patient with the *PROKR2* mutation p.R268C also has a deletion of the exon 1 and 2 in the gene *KAL1*. Notably, the new nonsense mutation (p.Y140X) was identified in homozygous state in an anosmic boy with micropenis, bilateral cryptorchidism and high-arched palate. His asymptomatic parents were heterozygous for this severe defect. *In vitro* studies of the new mutation, p.R80C, were performed in order to access the mechanism by which this mutation could affect the activity of the *PROKR2*. *In vitro* studies showed that the amount of fofatidil-inositol (PI) and the activation of MAPK were significantly lower in cells transfected with the R80C mutant receptor than in cells transfected with the wild receptor, indicating that this variant is a loss-of-function mutation. Binding studies and *Western blot* showed a reduction in the expression levels of the receptor in the plasma membrane and in whole cell, respectively. Additionally, *Western blot* analysis of R80C *PROKR2* revealed an additional smaller molecular weight band that represents the presence of immature unglycosylated receptors. The arginine 80 in ICL1 is important for post-

translational processing of PROKR2. In conclusion, we expanded the repertoire of *PROK2* and *PROKR2* mutations in patients with HH and showed that PROKR2 haploinsufficiency is not sufficient to cause Kallmann syndrome or normosmic HH, whereas homozygous loss-of-function mutations either in *PROK2* or *PROKR2* are sufficient to cause disease phenotype, in accordance with the *Prokr2* and *Prok2* knockout mouse models. In vitro studies suggested that the arginine located at position 80 of the receptor seems to play an important role in the receptor function.

Descriptors: 1.Prokineticin receptor 2 2.Prokineticin 2 3.Kallmann syndrome, hypogonadism 4.Mutations 5.Neurogenesis of olfactory bulb

1 INTRODUÇÃO

O hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) congênito é definido pela ausência parcial ou completa de desenvolvimento puberal devido as baixas concentrações de esteróides sexuais associados a valores inapropriadamente normais ou baixos de gonadotrofinas. O restante da função hipofisária é normal e não há evidência de causa anatômica nesta condição [1, 2]. O HHI é uma condição clínica rara e geneticamente heterogênea, podendo se manifestar de forma esporádica ou herdada como um traço autossômico dominante, recessivo ou ligado ao X [1, 3]. Mais recentemente, foram identificadas variações em mais de um gene em pacientes com HHI, caracterizando a forma digênica ou oligogênica dessa condição [4, 5].

HHI pode resultar de alterações no complexo processo de migração dos neurônios secretores de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), alterações nos sinais necessários para a sobrevivência destes neurônios, rompimento das conexões neuronais ou perturbação da secreção ou da ação do GnRH. O fenótipo mais comumente associado ao HHI é a anosmia presente em 60% dos casos [6]. Quando o HHI está associado à anosmia ou hiposmia é denominado síndrome de Kallmann. O HHI sem alterações olfatórias associadas é conhecido como hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico (HHIn).

O hipogonadismo pode ser diagnosticado na infância em virtude da presença de criptorquidia e/ou micropênis ou, mais comumente, na idade puberal em virtude da falta de desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários [1]. Raramente, alguns pacientes apresentam reversão do quadro de hipogonadismo anos após o diagnóstico e início da reposição androgênica [7, 8].

Essa variante fenotípica tem sido denominada HHI reversível e caracteriza-se por aumento do volume testicular, normalização dos valores de testosterona e gonadotrofinas, com conseqüente recuperação da capacidade reprodutiva após suspensão da reposição androgênica [9].

1.1 Síndrome de Kallmann

A primeira descrição da associação de hipogonadismo e anosmia ocorreu em 1856, pelo médico e professor de anatomia da Faculdade de Medicina de Granada, Aureliano Maestre de San Juan, após a autópsia de um homem de 40 anos, com "atrofia congênita" dos testículos e pênis e ausência de bulbos olfatórios [10]. Em 1944, o geneticista alemão Franz Joseph Kallmann, um estudioso do caráter hereditário da esquizofrenia e do retardo mental, descreveu três famílias com 12 indivíduos hipogonádicos, dos quais nove eram portadores de anosmia, e dois apresentavam retardo mental. Kallmann demonstrou o caráter genético da doença, sua maior prevalência em homens e sua variedade fenotípica [11]. Em 1954, De Morsier [12] acrescentou os detalhes neuropatológicos e cunhou o termo displasia olfato-genital para descrever a coexistência de hipogonadismo e anosmia em 14 indivíduos, porém, até hoje, é utilizado o epônimo síndrome de Kallmann para descrever esta associação.

Os neurônios olfatórios se originam no epitélio nasal embrionário e enviam seus axônios que cruzam a placa cribiforme em direção ao bulbo olfatório. Na camada glomerular do bulbo olfatório, os neurônios olfatórios fazem sinapses com as

células mitrais cujos axônios formarão o trato olfatório. Os neurônios secretores de GnRH também se originam no epitélio nasal olfatório e migram juntamente com os axônios dos neurônios olfatórios e posteriormente são guiados pelo trato olfatório para a área pré-óptica do hipotálamo, onde se localizam na vida adulta (**Figura 1**) [13-16]. Defeitos na migração dos neurônios secretores de GnRH e dos neurônios do bulbo olfatório formam a base clínico-patológica da síndrome de Kallmann. Consequentemente, genes associados à síndrome de Kallmann codificam proteínas que regulam a migração dos neurônios secretores de GnRH e dos neurônios do bulbo olfatório.

A prevalência estimada da síndrome de Kallmann é de 1:10.000 a 1:80.000 indivíduos [17, 18]. Os homens são mais frequentemente acometidos do que as mulheres, em uma proporção aproximada de 4:1 nos casos esporádicos e de 2:1 nos casos familiares [1].

Figura 1. Migração dos neurônios olfatórios e secretores de GnRH. Adaptado de Rugarli, 1999 [16]

1.2 Defeitos genéticos associados à HHI

1.2.1 Migração neuronal

Gene *KALI*

Desde de 1944 é sabido que a síndrome de Kallmann apresenta um padrão de herança ligado ao X e pode se associar ao daltonismo, uma doença sabidamente de herança materna [11]. A associação da síndrome de Kallmann com a ictiose X, cujo *locus* foi identificado no braço curto do cromossomo X, levou a busca da localização do *locus* da síndrome de Kallmann na mesma região. [19-21]. Bick *et al.* [22] identificou uma deleção terminal do cromossomo X a partir da região Xp.22.3 em um menino com síndrome de Kallmann, ictiose X, condrodisplasia *punctata* ligada ao X e atresia de coanas. Subsequentemente, essa criança faleceu e a autópsia revelou ausência de bulbos olfatórios e rim e ferradura. A mãe dessa criança, na gravidez subsequente, apresentou abortamento espontâneo com 19 semanas de gestação e o estudo *post mortem* do feto mostrou que os neurônios secretores de GnRH estavam estacionados na região anterior do SNC após cruzarem a placa cribiforme e não atingiram a região hipotalâmica, indicando um defeito migratório desses neurônios [23].

O gene *KALI* codifica uma glicoproteína extracelular, a anosmina, que quando associada à membrana plasmática, via heparan sulfato (HS), facilita a sinalização celular. A anosmina exerce ação quimiotática e direciona o crescimento dos neurônios olfatórios e secretores de GnRH [24, 25]. O *locus* do gene *KALI* escapa à inativação somática e portanto sua expressão bialélica gera uma quantidade maior de anosmina

nas mulheres em relação aos homens [26]. Esse fato pode explicar, pelo menos em parte, a maior prevalência da síndrome de Kallmann em homens [27].

Mutações no gene *KALI* representam aproximadamente 5 a 10% dos casos de síndrome de Kallmann (**Tabela 1**) [6]. As mutações identificadas nesse gene consistem predominantemente de inserções e deleções que resultam em alteração do código de leitura (*frameshift*) ou introduções de códons que resultam em parada prematura do processo de tradução (*stop codons*) [6]. Menos de 20% das mutações no *KALI* resultam em substituição de aminoácidos (*missense*) [28]

O fenótipo da síndrome de Kallmann causado por mutações no *KALI* parece ser mais severo e menos variável do que o encontrado em outros defeitos genéticos conhecidos [29, 30]. Entre as manifestações clínicas associadas à síndrome de Kallmann secundárias à mutações no gene *KALI* são sincinesia (movimentos em espelho) e agenesia renal unilateral, que ocorrem em aproximadamente 75% e 35% dos casos, respectivamente [3]. Palato arqueado também está raramente associado a mutações no gene *KALI* [31].

Genes *FGFR1* e *FGF8*

A descoberta do gene *FGFR1*, baseou-se em estudos de portadores de síndrome dos genes contíguos. Em 2003 Dodé *et al.* [32], identificaram mutações na região 8p11.2-p12 que abrangia o gene *FGFR1* em dois pacientes com síndrome de Kallmann associada à esferocitose. Mutações inativadoras do *FGFR1* estão associadas à forma autossômica dominante da síndrome de Kallmann. Por outro lado, uma mutação ativadora do *FGFR1* foi descrita em portadores de uma forma de craniossinostose conhecida como síndrome de Pfeiffer [33].

O gene *FGFR1* codifica o receptor tipo 1 do fator de crescimento de fibroblasto (FGFR1), um membro da superfamília dos receptores tirosina quinase. A anosmina interage com o FGFR1 e seu ligante (FGF8), atuando como um co-ligante modulador, aumentando a quantidade de heparan sulfato (HS) ligado ao complexo e amplificando desta forma as respostas das vias intracelulares [34]. O FGFR1, assim como a anosmina, está envolvido com o processo de migração dos neurônios olfatórios e secretores de GnRH [35].

Aproximadamente 10% dos pacientes com síndrome de Kallmann apresentam mutações no gene *FGFR1* [32]. A maioria das mutações identificadas no gene *FGFR1* são substituições de aminoácidos.

Estudos mais recentes revelaram um amplo espectro de fenótipos associados a mutações no gene *FGFR1*, que incluem as formas autossômicas dominantes da síndrome de Kallmann com manifestações severas, passando pelo HHIn, puberdade atrasada e a anosmia ou hiposmia isolada [7, 36-39]. Esse fato contesta a idéia de que o achado de anosmia/hiposmia pode facilmente discriminar os defeitos no desenvolvimento/migração dos neurônios secretores de GnRH com os defeitos na secreção ou ação do GnRH [36-38].

Vários fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) podem ligar e ativar os FGFRs. Aproximadamente 11 FGFs podem ligar-se ao FGFR1 [40]. Alguns fatores apontaram o gene *FGF8* como implicado na migração de GnRH. O gene *FGF8* é expresso nas mesmas áreas que FGFR1, regula genes envolvidos em organização neuronal [41, 42] e camundongos com menor expressão de FGF8 apresentaram alterações da cavidade nasal e disgenesia de bulbos olfatórios [43]. Adicionalmente, a mutação p.L342S do FGFR1 identificada em um paciente com síndrome de

Kallmann mostrou severa redução da capacidade de ligação com FGF8 [5]. Essas evidências tornaram o gene *FGF8* um candidato a causar da síndrome de Kallmann. O estudo de 461 pacientes com HHI, permitiu a identificação de seis mutações no gene *FGF8* em pacientes com síndrome de Kallmann e HHIn [44].

A primeira mutação *stop codon* do gene *FGF8* foi identificada por Trabarch *et al.* [45] em uma família brasileira com ampla variabilidade fenotípica, incluindo puberdade atrasada, HHIn e síndrome de Kallmann. Dois indivíduos desta família apresentaram surdez neurossensorial e um apresentou fenda palatina e lábio leporino. A fenda palatina é a manifestação clínica mais frequentemente associada a mutações nos genes *FGFR1* e *FGF8*, encontrada em até 30% dos pacientes com HHI [32]. Mais raramente, são descritas anormalidades das cartilagens nasais, do pavilhão auditivo e anormalidades digitais nesses pacientes [3].

Gene *NELF*

O gene *NELF* que codifica o fator embriônico nasal LHRH é um candidato importante na etiologia da síndrome de Kallmann baseado no seu papel de orientar a migração dos neurônios secretores de GnRH em camundongos. Entretanto, embora algumas variantes tenham sido descritas, ainda não foi comprovada a associação definitiva do gene *NELF* com síndrome de Kallmann [5, 46].

Gene *CHD7*

O gene *CHD7* codifica a proteína ligadora ao cromodomínio da helicase do DNA 7. Mutações nesse gene estão presentes em 60% dos casos de síndrome de

CHARGE (*Colobomata, Heart Anomalies, Choanal Atresia, Retardation, Genital and Ear anomalies*) [47]. *CHD7* é expresso no epitélio olfatório, no hipotálamo e na hipófise o que sugere uma associação deste gene com a migração dos neurônios secretores de GnRH. Mutações no gene *CHD7* foram pesquisadas em 200 pacientes com HHI e identificadas em 3 pacientes com síndrome de Kallmann e 4 pacientes com HHIn [48]. Em um estudo com 56 pacientes com HHI, foram identificadas mutações em 3 pacientes não relacionados que apresentavam características clínicas da síndrome de CHARGE, sugerindo a pesquisa de mutações no gene *CHD7* quando estas características, particularmente surdez, anormalidades dos ouvidos ou hipoplasia/aplasia dos canais semicirculares estão presentes em pacientes com HHI [47].

1.2.2 Secreção de GnRH

Genes *KISS1* e *KISS1R* (ou *GPR54*)

A associação do gene *KISS1R* ou *GPR54* com o HHI foi descrita em 2003, por meio de estudos de ligação genética, quando mutações inativadoras em homozigose foram identificadas em pacientes portadores de HHIn de duas grandes famílias com história de consanguinidade [49, 50]. Adicionalmente, em um destes estudos, foi demonstrado que o camundongo com ablação para o gene *GPR54* apresenta o mesmo fenótipo que o HHIn humano[50].

GPR54 é um receptor acoplado à proteína G e o seu ligante, a kisspeptina, é derivado do gene *KISS1* [51], daí o atual nome *KISS1R*. Estudos em modelos animais mostraram que a kisspeptina é um potente estimulador da secreção de GnRH e consequentemente das gonadotrofinas hipofisárias [52, 53].

Mutações inativadoras no gene *KISS1R* foram evidenciadas em um padrão de herança autossômico recessivo e representam aproximadamente 5% dos casos de HHIn (**Tabela 1**) [6]. É esperado que mutações no gene *KISS1* que codifica o ligante do KISS1R resultem em função reprodutiva anormal, assim como mutações no seu receptor. Entretanto, até o momento não foram descritas mutações no gene *KISS1* associadas ao HHIn [6, 54].

Genes *TAC3* e *TACR3*

O gene *TAC3* codifica a proteína neurocinina B (NKB), um membro da família da taquicininas. As taquicininas são neurotransmissores excitatórios com expressão no sistema nervoso central e periférico de mamíferos [55]. A NKB é expressa no núcleo arqueado e o seu receptor nos neurônios secretores de GnRH, sugerindo uma possível associação desse sistema com a regulação da secreção de GnRH [54]. As taquicininas agem ligando a três receptores acoplados a proteína G (NK1R, NK2R e NK3R) [56].

Recentemente, uma ampla análise de polimorfismos no genoma humano possibilitou a identificação de mutações em homozigose nos genes *TAC3* e *TACR3* em quatro de nove famílias turcas consangüíneas afetadas por HHIn [57]. No mesmo ano, o mesmo grupo identificou uma mutação em homozigose no gene *TACR3* em três indivíduos de uma mesma família. A mutação identificada nesta família, p.H148L, localiza-se na primeira alça extracelular do TACR3 e reduz severamente a sinalização do receptor [58].

Posteriormente, mutações nos genes *TAC3* e *TACR3* foram identificadas em aproximadamente 5% dos pacientes com HHIn [59, 60]. Vários pacientes do sexo masculino com mutações nesses genes apresentaram micropênis e criptorquidia.

Adicionalmente, seis pacientes do sexo masculino portadores de mutações inativadoras do gene *TACR3* e quatro pacientes do sexo feminino portadoras da mutação *frameshift* em homozigose do *TAC3* p.G20fsX39 apresentaram reversibilidade do HHI após suspensão da terapia de reposição hormonal [59, 60].

1.2.3 Ação do *GnRH*

Genes *GnRH* e *GnRHR1*

Mutações no *GnRHR1* estão entre as primeiras descritas em pacientes com HHIn [61]. O gene *GnRHR1* codifica o receptor de GnRH, membro da família dos receptores acoplados a proteína G. Mutações neste gene estão presentes em 3,5% a 16% dos casos esporádicos de HHIn e em até 40% dos casos familiares (**Tabela 1**) [62, 63]. O padrão de herança é autossômico recessivo e a maioria dos pacientes é portadora de mutações em heterozigose composta.

Mutações no gene *GnRH1* foram somente descritas em 2009 e representam uma causa muito rara de HHIn com herança autossômica recessiva [64, 65]. A inserção de uma adenina em homozigose na região N-terminal do precursor do GnRH1 foi primeira mutação do gene *GnRH1* identificada em dois irmãos portadores de HHIn [64].

1.2.4 Defeitos digênicos

O HHI é considerado uma doença com padrão de herança Mendeliano. Nas doenças monogênicas, o traço é controlado em um simples *locus* por um alelo dominante ou dois alelos recessivos. Entretanto, na maioria das doenças monogênicas

não há uma correspondência perfeita entre o genótipo e o fenótipo. Os conceitos de penetrância incompleta e expressão variável ajudam a explicar esta discrepância. Algumas doenças monogênicas que tem fraca correlação genótipo-fenótipo, como a síndrome de Bardet-Biedl, demonstraram na verdade, serem oligogênicas (causadas por variações genéticas em mais de um gene) [66]. O HHI era considerado uma doença estritamente monogênica [1], mas recentemente, foram identificadas variações gênicas em mais de um gene em pacientes com HHI [4, 5, 44, 67]. Em um recente estudo com 397 pacientes com HHI, 22% apresentaram variações genéticas raras em um *locus*. A presença de variações genéticas em mais de um locus ocorreu em 2,5% destes pacientes, frequência similar a das variações genéticas identificadas em homozigose [68].

Tabela 1. Frequência de mutações identificadas nos genes relacionados ao HHI

Gene relacionado ao HHI	Locus	Proteína	Modo de herança	Frequência na forma específica de HHI (%)	Frequência em todos os casos de HHI (%)
Síndrome de Kallmann					
<i>KALI</i>	Xp22.3	Anosmina 1	Ligada ao X	5-10	3-6
<i>FGFR1</i>	8p12	FGFR1	AD	10	6
<i>FGF8</i>	10q25	FGF8	AD	<5	<2
<i>PROK2</i>	3p21.1	PROK2	AR	2	1
<i>PROKR2</i>	20p12.3	PROKR2	AR	7	3-6
<i>CHD7</i>	8q12	CHD7	ND	10	6
Não identificado	NA	NA	NA	60-75	ND
Hipogonadismo Hipogonadotrófico Normósmico					
<i>GNRHR</i>	4q21.2	GnRHR	AR	16-40	6,5-16
<i>KISSR</i>	19p13.3	KISSR	AR	5	2
<i>TAC3/TACR3</i>	12q13–12/ 4q25	Neurocinina B e seu receptor	AR	ND	ND

AD: autossômico dominante, AR: autossômico recessivo; ND: não descrito; NA não aplicável.

Adaptado de Bianco & Kaiser [6].

1.3 O Sistema das Procineticinas

Procineticina 1 (PROK1) e Procineticina 2 (PROK2) foram reconhecidas em 2001 devido à sua similaridade com a proteína secretada pela pele do sapo, Bv8, e com a proteína não tóxica identificada no veneno da cobra mamba (MIT) [69]. Bv8 e MIT estimulam a contração da musculatura lisa intestinal e os peptídeos análogos humanos também exercem a mesma função no íleo de porco da índia (*guinea pig*). Posteriormente, foi verificado que PROK2 não tem efeito em contrair a musculatura intestinal do camundongo [70]. Provavelmente a função de contração intestinal é espécie específica. PROK1 também é chamada de Bv8 e PROK2 é conhecida por fator de crescimento de endotélio vascular derivado de glândula endócrina (EG-VEGF), sendo uma das primeiras funções relacionadas às procineticinas [69, 71].

PROK1 e PROK2 possuem 44% de semelhança nas suas sequências protéicas. Ambas contêm 10 cisteínas altamente conservadas entre as espécies, que formam pontes dissulfídicas. O domínio N-terminal aquém da primeira cisteína é composto pelos aminoácidos AVITGA, conservado entre as diferentes espécies e essencial para a função protéica [72]. A adição ou substituição de um aminoácido no domínio N-terminal resulta em uma proteína inativa [72].

PROK1 é amplamente expressa nos tecidos periféricos [69]. Especificamente, PROK1 e PROK2 são expressas na musculatura lisa intestinal, útero, placenta, coração, medula óssea e glândula suprarrenal. No ovário, somente PROK1 é expressa enquanto que no testículo PROK1 se expressa nas células de Leydig e PROK2 nos espermatoócitos (**Tabela 2**). No sistema nervoso central, há pouca

expressão de PROK1 enquanto PROK2 é expressa no córtex, bulbo olfatório, zona subventricular, hipotálamo entre outras áreas [73].

Tabela 2. Padrão de expressão de PROK1, PROK2, PROKR1 e PROKR2 em tecidos associados à função reprodutiva

Tecido	PROK1	PROK2	PROKR1	PROKR2
SNC [74, 75]		Bulbos olfatórios, hipotálamo (área medial pré-optica e núcleo arqueado)	Bulbos e ventrículos olfatórios, hipotálamo (núcleo arqueado e corpos mamilares)	Bulbo olfatório, córtex piriforme, área de Broca, hipotálamo (área pré-optica lateral, núcleo paraventricular, núcleo arqueado, eminência mediana, núcleo mamilar, órgão subfornical)
Hipófise [76, 77]	Presente		Presente	Presente
Ovário [77]	Células da teca e granulosa		Células capilares endoteliais	Células capilares endoteliais
Útero [76]	Epitélio granular, estroma e musculatura lisa	Epitélio granular, estroma e musculatura lisa	Epitélio granular, estroma e musculatura lisa	Epitélio granular, estroma e musculatura lisa
Placenta [78]	Presente		Presente	
Testículos [71, 77, 79]	Células de Leydig	Espematócitos primários	Células do interstício endotelial	Células do interstício endotelial
Próstata [77, 80]	Câncer de próstata		Presente	
Tecido humano fetal [81]	Presente	Presente	Presente	Presente

Bloqueadores do canal de cálcio são capazes de inibir a contração intestinal do íleo de porco da índia (*guinea pig*) estimulada pelas procineticinas, assim como de bloquear a ação contrátil dos agonistas muscarínicos no intestino [69]. Suspeitou-se então, que as procineticinas agiriam por meio dos receptores acoplados à proteína G, mesmo grupo que pertence os receptores muscarínicos e iniciou-se a busca de

receptores específicos para as procinetinas. Em 2003, Zhou *et. al.* [77] clonaram vários genes codificadores dos receptores acoplados à proteína G, transfectaram em células CHO e estimularam com PROK1. Somente 2 receptores produziram mobilização de cálcio intracelular após estímulo com PROK1. Estes receptores possuem 80% de similaridade com o receptor órfão murino GPR73. Inicialmente os receptores das procinetinas receberam o nome GPR73a e GPR73b. Posteriormente, passaram a ser chamados de receptores da procinetina tipo 1 (PROKR1) e receptor da procinetina tipo 2 (PROKR2) [77]. Os receptores tipo 1 e 2 compartilham 87% de homologia na sua estrutura primária [77]. O receptor do tipo 1 é o mais expresso no trato gastrointestinal e o tipo 2 no sistema nervoso central. Ambos se expressam em várias glândulas endócrinas como hipófise, testículos, ovários, suprarrenais e tireóide (**Tabela 2**) [77].

Figura 2. Representação esquemática do sistema das Procinetinas. Adaptado de Bullock, C. *et. al.* [72]

As procineticinas estimulam PROKR1 e PROKR2 em concentrações nanomolares e induzem principalmente a cascata típica dos receptores acoplados à proteína G α q/11, ativando a fosfolipase C (PLC), com subsequente hidrólise de fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP2) em trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O acúmulo de IP3 nas células provoca uma mobilização das reservas de cálcio intracelular e o DAG ativa a proteína quinase-C (PKC) (**Figura 3**) [77]. A ligação da procineticina ao receptor, também ativa outras vias de sinalização, como a via envolvendo a família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e induzem a fosforilação das p44/p42MAPK [73, 77]. Outros estudos sugerem que os receptores das procineticinas também pode ativar Gs e Gi [74].

Ativação dos receptores das procineticinas influencia vários eventos biológicos como, hiperalgesia [82], espermatogênese [79], hematopoiese [83], ritmo circadiano [75, 84, 85] e ingestão alimentar em ratos [86] (**Tabela 3**).

Tabela 3. Funções biológicas relacionadas às procineticinas.

Estimulação celular	Contração da musculatura lisa intestinal
	Hiperalgesia
	Ritmo circadiano
Migração celular	Angiogênese
	Desenvolvimento do bulbo olfatório/migração dos neurônios secretores de GnRH
	Hematopoiese

Adaptado de Zhou & Cheng [87]

Figura 3. Cascata de sinalização da PROK2/PROKR2. A ligação da PROK2 ao receptor acoplado a proteína Gq, PROKR2, ativa a PLC, que induz à hidrólise de PIP2 em IP3 e DAG, levando a mobilização de cálcio intracelular e ativação da PKC, que por sua vez leva a fosforilação da ERK. PLC, fosfolipase C; PIP2, fosfatidilinositol 4,5 bifosfato; IP3, trifosfato de inositol; Ca⁺⁺, cálcio; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína quinase C; RAF1, MEK, quinases serina-treonina; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; pERK, ERK fosforilada

Em 2006, foi demonstrado que camundongos com ablação do gene *PROKR2* apresentavam hipoplasia do sistema reprodutivo e bulbos olfatórios, um fenótipo semelhante ao da síndrome de Kallmann em humanos [88]. Análise histopatológica dos testículos dos camundongos machos *PROKR2*^{-/-} evidenciou atrofia testicular, redução do diâmetro dos túbulos seminíferos, ausência de espermatídes, interstício esparso, e as poucas células de Leydig presentes apresentavam tamanho reduzido. Nas fêmeas, atrofia ovariana, uterina, vaginal e das glândulas mamárias foi evidenciada. Os ovários continham folículos na fase pré antral, interstício atrófico sem corpo lúteo. Imuno histoquímica detectou neurônios secretores de GnRH na região pré-óptica e na eminência média do hipotálamo dos camundongos selvagens mas não nos *PROKR2*^{-/-}. [88]. Diferentemente, os camundongos com ablação do gene *PROKR1* não apresentaram alterações nos bulbos olfatórios e no sistema reprodutivo, tampouco os heterozigotos para o gene *PROKR2*. [88]

No ano anterior, havia sido demonstrado que camundongos com ablação do gene *PROK2* apresentavam hipoplasia dos bulbos olfatórios, mas não havia sido mencionado o fenótipo reprodutivo destes camundongos [89]. Posteriormente, o sistema reprodutivo destes camundongos foi avaliado e assim como os camundongos com ablação do *PROKR2*, estes roedores também apresentavam hipoplasia do sistema reprodutivo e um fenótipo semelhante à síndrome de Kallmann [90]. É notável que os neurônios secretores de GnRH nos camundongos *PROK2*^{-/-} foram capazes de cruzar a placa cribiforme durante a embriogênese, mas não migraram para o hipotálamo [90, 91]. Embora os neurônios secretores de GnRH se localizem nas mesmas áreas do sistema nervoso central que os neurônios que expressam *PROKR2*, estes neurônios não se co-localizaram [90].

O gene que codifica a PROK2, localiza-se no braço curto do cromossomo 3 região 21.1 (3p21.1), e é composto por 4 exons (**Figura 4a**). O exon 1 codifica o peptídeo sinal e os 5 primeiros aminoácidos do domínio N-terminal (AVITG) que são altamente conservados e fundamentais para a ação protéica. O RNAm da PROK2 é traduzido em um peptídeo de 102 aminoácidos denominado PROK2-L [74], que sofre clivagem proteolítica dando origem à PROK2 ou Prok-2 β [74]. Esta forma é considerada a forma mais ativa da proteína, constituída de 81 aminoácidos e peso aproximado de 8 kilodaltons. Os 21 aminoácidos excluídos após a clivagem proteolítica são codificados pelo exon 3, que não codifica nenhuma das 10 cisteínas.

O gene *PROKR2* está localizado no cromossomo 20p13 e contem dois exons (**Figura 4b**) que codificam o receptor acoplado a proteína G, PROKR2 de 384 aminoácidos.

A**Cromossomo 3p21.1** **PROK2** **PROK2L** **B****Cromossomo 20p13**

Figura 4. A. Representação esquemática do gene *PROK2* e seus produtos protéicos, as procinetinas. **B.** Representação esquemática do gene *PROKR2*. Pb, pares de base; kb, kilobases.

A semelhança do fenótipo da síndrome de Kallmann nos camundongos modificados para os genes *PROKR2* e *PROK2* estimulou a busca de mutações nesses genes em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico. O primeiro estudo em humanos foi publicado no final de 2006, quando um grupo francês analisou 192 pacientes com síndrome de Kallmann e demonstrou 4 mutações no gene *PROK2* e 10

mutações no gene *PROKR2* [4]. As mutações foram identificadas em heterozigose, heterozigose composta e homozigose, sendo que a maioria delas foi identificada em heterozigose. Neste estudo não foi realizado estudo funcional das mutações identificadas não ficando bem estabelecido quais dessas mutações levavam a perda da função protéica e eram causadoras da síndrome de Kallmann [4]. Nosso grupo publicou a primeira descrição de mutação em homozigose com perda de função no gene *PROKR2* [92]. Outros estudos também revelaram mutações inativadoras no sistema *PROK2/PROKR2* em pacientes com HHIn [92, 93]. Mutações nesses genes estão presentes em aproximadamente 6% dos pacientes com síndrome de Kallmann 3% dos pacientes com HHIn [54, 94].

2 OBJETIVOS

-
- 2.1 Pesquisar mutações nos genes *PROK2* e *PROKR2* em pacientes portadores de HHIn e síndrome de Kallmann.
 - 2.2 Caracterizar os efeitos das novas mutações nos genes *PROK2* e *PROKR2* e estabelecer a correlação entre o genótipo mutante e o fenótipo observado nos pacientes.
 - 2.3 Estabelecer o padrão de herança do hipogonadismo causado por defeitos nos genes *PROK2* e *PROKR2*.
 - 2.4 Avaliar a importância funcional da primeira alça intracelular do receptor da procinetina 2 (PROKR2)

3 MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (HC-FMUSP/aprovação nº 1012/06) foi concedido pelos pacientes ou responsáveis.

3.1 Casuística

Foram selecionados 107 pacientes com HHI: 63 com síndrome de Kallmann e 44 com HHIn. Os pacientes com hipogonadismo foram selecionados dos Serviços de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo das cidades de São Paulo ou Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

No grupo de 63 pacientes com síndrome de Kallmann, 54 (85,7%) indivíduos eram do sexo masculino e 9 (14,3%) do sexo feminino. No grupo de 44 pacientes com HHIn, 32 (72,7%) indivíduos eram do sexo masculino e 12 (27,3%) do sexo feminino. Os critérios clínicos e laboratoriais utilizados para a inclusão dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado foram: a falta de aparecimento ou desenvolvimento incompleto de caracteres sexuais secundários após os 18 anos em ambos os sexos, concentrações baixas de esteróides sexuais (testosterona ou estradiol) para o sexo e idade associados a concentrações séricas de LH e FSH baixas

ou inapropriadamente normais, ausência de deficiências hipofisárias combinadas e ressonância magnética da região hipotálamo-hipofisária sem evidências de anormalidades. A função olfatória foi avaliada empregando-se testes olfatórios desenvolvidos pela Universidade da Pensilvania (UPIST) [95]. Aqueles com testes olfatórios alterados foram classificados como portadores de síndrome de Kallmann.

Quarenta e quatro pacientes dos 63 (69,8%) com síndrome de Kallmann apresentavam a forma esporádica da doença e dezenove (30,2%) apresentavam a forma familiar. Dos 44 pacientes com HHIn, cinco (11,36%) apresentavam história familiar de hipogonadismo hipogonadotrófico.

Um grupo controle foi composto por 100 indivíduos adultos, de ambos os sexos, sem alterações olfatórias desenvolvimento sexual normal.

3.2 Avaliação hormonal

No período do estudo foram utilizados dois métodos de dosagens para as gonadotrofinas séricas: o radioimunoensaio (RIE) com duplo anticorpo (*Wallac, Turku, Finlândia*) ou o ensaio imunofluorométrico (IFMA) (*Perkin Elmer, Wallac, Finlândia*). O coeficiente de variação foi $< 5\%$ para todos os ensaios.

O teste de estímulo com GnRH de ação curta foi realizado pela administração de 100 µg de gonadorelina intravenosa no tempo zero e coleta de sangue nos tempos -15, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. Os valores de esteróides sexuais e de LH basal e após estímulo com GnRH considerados normais, estão descritos nas Tabelas 3 e 4.

Os critérios hormonais adotados para a determinação do diagnóstico de HHI foram: valores de esteróides sexuais abaixo do limite normal associado a concentrações inapropriadamente normais ou baixas de LH, basais ou após estímulo com GnRH (**Tabelas 4 e 5**), na ausência de deficiências combinadas dos hormônios hipofisários,.

Tabela 4. Valores normais de testosterona e LH no sexo masculino, obtidos nos ensaios IFMA e RIE em pré-púberes e adultos

	Testosterona ng/dL	LH basal U/L	LH pico* U/L	Ensaio
Pré-púberes	< 14	≤ 0,6	< 9,6	IFMA
Adultos	200 - 950	1,4 - 9,2	12 - 29,7	
Pré-púberes	< 10		Delta < 15	RIE
Adultos	350 - 1090		Delta ≥ 15	

* após 100 µg de gonadorelina i.v.

Tabela 5. Valores normais de estradiol e LH no sexo feminino, obtidos nos ensaios de IFMA e RIE em pré-púberes e adultos

	Estradiol pg/mL	LH basal U/L	LH pico* U/L	Ensaio
Pré-púberes	< 13	≤ 0,6	< 6,9	IFMA
Fase folicular	30-94	1,0 - 8,4	7,6 - 31,7	
Pré-púberes	< 10		Delta < 15	RIE
Fase folicular	10-80		Delta ≥ 15	

* após 100 µg de gonadorelina i.v.

3.3 Avaliação da capacidade olfatória

Os pacientes, incluindo-se os sem queixas olfatórias, foram inicialmente submetidos a testes olfatórios de rastreamento, o *The Pocket Smell TestTM* e/ou o *The Brief Smell TestTM*. O *The Pocket Smell TestTM* é constituído por encartes contendo 3 diferentes odores (**Figura 5**). O *The Brief Smell TestTM* é um livreto com 12 diferentes odores. Aqueles com testes iniciais alterados foram submetidos ao *The Smell Identification TestTM* que é constituído por 4 livretos, contendo cada um 10 odores. As substâncias odoríferas estão contidas em microcápsulas fixadas em tiras (**Figura 5**). Os odores são liberados após rabiscar as tiras com a ponta de um lápis. Acima de cada tira marrom com o odor identificado, há quatro alternativas de resposta. O paciente deve marcar uma delas, mesmo que não tenha identificado nenhum cheiro. O número total de respostas corretas foi estabelecido por um gabarito fornecido juntamente com o teste. É considerado alterado um erro no *The Pocket Smell TestTM*. Nos demais testes, o número de acertos é comparado com as respectivas tabelas para cada sexo de acordo com a idade do paciente. Um score igual ou menor que o percentil 5 é considerado alterado. Todos os testes olfatórios empregados foram desenvolvidos pela Universidade da Pensilvânia [95] e são comercializados pela *Sensonics, Inc. (Haddon Heights, NJ, EUA)*.

The Pocket Smell Test

The Smell Identification Test

Figura 5. Testes olfatórios desenvolvidos pela Universidade da Pensilvânia

3.4 Avaliação de bulbos e sulcos olfatórios por imagem

A ressonância magnética (RM) foi utilizada para o estudo morfológico do rinencéfalo dos pacientes com ou sem alterações do olfato. Para visualização completa dos bulbos e sulcos olfatórios, foram realizados cortes coronais e transversos em T1 do lobo frontal anterior até a região do hipotálamo sem uso de contraste. Os cortes foram de 3 mm de espessura com intervalo de 5 mm entre eles.

3.5 Pesquisa de mutações genômicas

3.5.1 Extração do DNA genômico de leucócitos

DNA genômico foi extraído de 15 mL de sangue periférico colhido em tubo com EDTA. O sangue foi incubado em solução para lise de glóbulos vermelhos (114 mM cloreto de amônia; 1 mM carbonato de amônia) durante 30 minutos a 4°C. Após este período, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o botão de células foi ressuspensão em solução tampão constituída de 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0 contendo 1% SDS e 0,2 mg/mL proteinase K e mantido durante a noite à 37°C. No dia seguinte, a amostra foi submetida a duas extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e a uma extração com clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com acetato de sódio 0,3 M em pH 7,0 e com 2 volumes de etanol absoluto gelado. Posteriormente, o DNA foi lavado em etanol 70% por 5 minutos e ressuspensão em TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

3.5.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

O DNA genômico dos pacientes selecionados foi utilizado como substrato para a amplificação da região codificadora dos genes *PROK2* e *PROKR2*. Os quatro exons do *PROK2* (ENSG00000163421 e NCBI NM_021935), compreendendo o peptídeo sinal, codificado pelo exon 1 e toda a região codificadora do gene codificada por parte do exon 1 e pelos demais exons e os dois exons *PROKR2*

(ENSG00000101292 e NCBI NM_144773) foram amplificadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os seguintes pares de oligonucleotídeos intrônicos:

Tabela 6. Oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes *PROK2* e *PROKR2*

Região Amplificada	Oligonucleotídeos específicos
Gene <i>PROK2</i>	
Exon 1	1F 5' GGCGGGGCTAGCCTTTAT 3'
	1R 5' CCTCTAGCCTGCCCTTCAG 3'
Exon 2	2F 5' CCCACTTTCGAAAAATGAGAA 3'
	2R 5' TGTTTGTCTGAGCACGTTACC 3'
Exon 3	3F 5' GGCTTGGCTGTATCTTGCTC 3'
	3R 5' TGGGGCTGAACTGATAGGAC 3'
Exon 4	4F 5' GGGTAGTTAACGCTCAGTAAACA 3'
	4R 5' GAGCATTTCTTTCTGGCACA 3'
Gene <i>PROKR2</i>	
Exon 1	1F 5' TGAAAGAGCAGAAGGTCTGGA 3'
	1R 5' TCCTCATTTAGGCTCTGACAGG 3'
Exon 2	2F 5' GATTCAGTGTGCCACTGCTT 3'
	2R 5' CCAGTACTCAGAGCATCACCC 3'

As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL. Para cada reação foram utilizados 100 a 200 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,25 U de enzima *Taq* polimerase (*Promega, Madison, WI, EUA*) e tampão da reação fornecido pelo

fabricante contendo 1,5 mM de $MgCl_2$. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin-Elmer, Foster City, CA, EUA) e consistiu das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento variando de 52 a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados por transiluminação em luz ultravioleta.

3.5.3 Sequenciamento automático

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi determinada a partir da comparação da intensidade de sinal emitido pelos fragmentos de um marcador de peso molecular de concentração conhecida em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à pré-purificação enzimática, utilizando-se o produto comercial *EXO-SAP* contendo as enzimas exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Amersham Science, USB, Cleveland, Ohio, EUA). A reação de Sequenciamento foi realizada utilizando o produto comercial *ABI Prism™ BigDye Terminator* (Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA). Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer* (Perkin Elmer, Foster City, CA). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology and Information* (NCBI).

Todas as mutações identificadas foram confirmadas em dois produtos de PCR diferentes e foram seqüenciadas nas duas direções do DNA. As variantes identificadas foram descritas utilizando-se nomenclaturas padronizadas [96] e <http://www.hgvs.org/mutnomen/recs.html>.

3.6 Estudos funcionais (*In vitro*)

Os estudos funcionais foram desenvolvidos em colaboração com a Divisão de Endocrinologia, Diabetes e Hipertensão do Hospital Brigham and Women's, Divisão de Endocrinologia na Escola de Medicina de Harvard, em Boston, Estados Unidos.

3.6.1 Mutagênese sítio dirigida

O vetor de expressão de mamíferos pcDNA3.1D/V5-His-TOPO TA (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) contendo a sequência do *PROKR2* selvagem e a mutação c.253 C>T (p.R85C) foram gentilmente cedidos pela Dra. Nelly Pitteloud (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School). As mutações c.238C>T (p.R80C) e c.254G>A (p.R85H) do *PROKR2* foram introduzidas no vetor pcDNA3.1D/V5-His-TOPO TA utilizando mutagênese sítio dirigida com o produto comercial *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) e foram confirmadas por sequenciamento direto. Para inserção das mutações foram utilizados os seguintes pares de oligonucleotídeos específicos:

Tabela 7. Oligonucleotídeos usados na mutagênese

Mutagênese	Oligonucleotídeos específicos
PKR2 R80C	F 5' TATCGCTGCCCTCACCTGCTATAAGAAGTTGCG 3' R 5' CGCAACTTCTTATAGCAGGTGAGGGCAGCGATA 3'
PKR2 R85H	F 5' CCGCTATAAGAAGTTGCACAACCTCACCAATCTGC 3' R 5' GCAGATTGGTGAGGTTGTGCAACTTCTTATAGCGG 3'

3.6.2 Clonagem e transformação

Em um microtubo contendo bactérias *E. coli* XL10-gold quimicamente competentes, foi adicionado 1 µl de produto de cada reação da mutagênese. A solução foi incubada no gelo por 30 minutos, submetida à choque térmico a 42°C por 45 segundos e imediatamente colocada no gelo. Após 2 minutos, foram adicionados 700 µl de meio LB Agar, Miller (*Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA*) e a reação foi deixada em agitação (200 rpm) a 37°C por 1h. 100 µl da reação de transformação foram estriados em uma placa de Petri (diâmetro de 10 cm) com meio LB-Agar contendo ampicilina, que foi incubada a 37°C durante 12h. Uma colônia de cada placa foi colocada em meio de cultura LB com ampicilina para proliferação de bactérias resistentes. Posteriormente, os plasmídeos contendo o cDNA do *PROKR2* mutantes foram isolados utilizando-se o produto comercial *QIAprep Miniprep Kit* (*Qiagen, Valencia, CA, EUA*). O DNA plasmidial isolado foi novamente sequenciado, confirmando a sequência correta.

3.6.3 Transfecção

Para a realização de ensaios de acúmulo de fosfatidil inositol (IP) e ensaios de ligação ao receptor células de rim de macacos verdes africanos (COS-7) foram transfectadas transitoriamente com 500 ng de vetores contendo as sequências selvagem (pcDNA 3.1-PROKR2WT), ou as sequências mutantes (pcDNA 3.1-PROKR2R80C, pcDNA 3.1-PROKR2R85C e pcDNA 3.1-PROKR2R85H) do cDNA do *PROKR2* e 500 ng vetor vazio (pcDNA3.1empty) em placas de 6 poços usando o produto comercial *GenePORTER Transfection Reagent* (Gene Therapy Systems, San Diego, CA). As células apresentavam-se aproximadamente 50% confluentes no momento da transfecção. Foram utilizados 5 µL de GenePORTER para cada 1µg de vetor transfectado. A transfecção foi realizada em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) sem adição de soro fetal bovino. Três horas e meia após a transfecção foi adicionado o meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino a 10% e penicilina/estreptomicina 1mg/mL e incubadas a 37°C, em 5% CO₂.

A transfecção para executar os ensaios de IP para avaliar efeito dominante negativo foram realizadas utilizando o mesmo protocolo do *GenePORTER Transfection Reagent* (Gene Therapy Systems, San Diego, CA). A quantidade de vetor transfectado variou de 5 ng a 500 ng de PROKR2WT e PROKR2R80C. Era transfectado a quantidade de vetor vazio necessária para que todos os poços fossem transfectados com quantidades semelhantes de plasmídeos.

Para a realização de ensaios de luciferase células de rins de embriões humanos (HEK-293) foram transfectadas transientemente com 10 ng de vetores contendo as sequências selvagem (pcDNA 3.1-PROKR2WT), ou as sequências

mutantes (pcDNA 3.1-PROKR2R80C, pcDNA 3.1-PROKR2R85C e pcDNA 3.1-PROKR2R85H) do cDNA do *PROKR2* e 187,5 ng vetor vazio (pcDNA3.1empty) e 2,5 ng de um vetor-reporter PGL-1 contendo a região promotora do *Early Growth Response 1* (EGR-1) por poço em placas de 24 poços. Para a reação de transfecção utilizou-se o produto comercial *Fugene HD Transfection Reagent* (Gene Therapy Systems, San Diego, CA) em uma razão de 3 para 1; isto é, para cada 200 ng de vetor transfectado por poço foi utilizado 600 µL de *Fugene HD*. As células com aproximadamente 70% de confluência foram submetidas a transfecção.

As células foram mantidas em cultura com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com soro fetal bovino a 10% e penicilina/estreptomicina 1mg/mL e incubadas a 37°C, em 5% CO₂.

Para realização de *Western blot* foram criadas células expressando estavelmente os receptores mutantes e selvagem. As células HEK-293 foram transfectadas com 2 µg de vetores contendo as sequências selvagem (pcDNA 3.1-PROKR2WT), ou as sequências mutantes (pcDNA 3.1-PROKR2R80C, pcDNA 3.1-PROKR2R85C e pcDNA 3.1-PROKR2R85H) em placas de 100 mm usando o produto comercial *GenePORTER Transfection Reagent* (Gene Therapy Systems, San Diego, CA). As células apresentavam-se aproximadamente 50% confluentes no momento da transfecção. Foram utilizados 5 µL de GenePORTER para cada 1µg de vetor transfectado. A transfecção foi realizada em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) sem adição de soro fetal bovino. Três horas e meia após a transfecção foi adicionado o meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino a 10% e penicilina/estreptomicina 1mg/mL e incubadas a 37°C, em 5% CO₂. Vinte quatro e quatro horas após a transfecção foi adicionado o antibiótico geneticina, G148 (GIBCO, Langley, Ok, EUA) na dose de

0,8 mg/mL. Este antibiótico foi utilizado para seleção das células que expressam PROKR2 e consequentemente o gene de resistência a geneticina. As células foram mantidas em cultura com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com soro fetal bovino a 10%, penicilina/estreptomicina 1mg/mL e geneticina 0,8mg/mL e incubadas a 37°C, em 5% CO₂.

3.6.4 Estudos de Sinalização do PROKR2

3.6.4.1 Avaliação do Acúmulo de Fosfatidil-Inositol (IP)

Quarenta e oito horas após a transfecção, o meio de cultura das células COS-7 ou HEK 293 foi substituído por DMEM sem inositol. Após duas horas de incubação a 37°C, 2 µCi/ml de mioinositol marcado com trício (myo-[2-3]-inositol, Perkin Elmer, Waltham, MA) foram adicionados às células, seguido de 10 mM de cloreto de lítio após 15 minutos. Após 12 a 18 horas de incubação, a produção de IP foi estimulada pela adição de diferentes concentrações (10^{-11} a 10^{-7} M) de procineticina 2, (Abcam, Cambridge, MA, EUA), em triplicata, por uma hora. Após o período de estimulação, as células foram lisadas com ácido fórmico, os extratos celulares foram neutralizados, centrifugados e tiveram seu conteúdo protéico quantificado. O sobrenadante de cada poço foi carregado em colunas de resina para troca de ânions AG-X8 (*Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA*), previamente equilibradas. As colunas foram lavadas quatro vezes e o inositol total foi eluído. O acúmulo de inositol total radioativo foi medido em contador beta, e corrigido pelo conteúdo de proteínas totais das células.

3.6.4.2 Ensaio de Luciferase (*Gene reporter*)

Vinte e quatro horas após a reação de transfecção, células HEK 293 foram estimuladas com doses crescentes de PROK2 (10^{-7} a 10^{-10} moles) em meio livre de soro contendo 0,1% BSA. Dezesesseis horas após o estímulo com a PROK2, as células foram lisadas com tampão de lise. Adicionou-se ATP ao lisado celular e estimulou-se a produção de luminescência através da administração de luciferina. O sinal de luminescência foi identificado pelo leitor de micro placas *POLAR star OPTIMA*. (BMG Labtech, Offenburg, Alemanha)

Os ensaios de sinalização foram analisados pelo teste T. A concentração efetiva média (EC50) e o valor máximo de estímulo para as curvas de dose resposta foram calculados utilizando-se o programa *GraphPad Prism* (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.7 Ensaios de Ligação ao Receptor

Vinte e quatro horas após a transfecção, as células COS-7 foram incubadas com o análogo da prokineticina 1 mamba intestinal toxin (MIT) radioativa (100.000 cpm de ^{125}MIT , Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA) na presença de 10^{-10} a 2×10^{-7} M de procineticina 2 não marcada em DMEM contendo 10 mM HEPES e 1% BSA por 15 min a temperatura ambiente. As células foram lavadas seis vezes no gelo com solução salina (PBS), contendo 0,5% de BSA e em seguida lisadas com 0,2 M de NaOH e 0,5% de BSA. Os lisados celulares foram coletados e a radioatividade foi medida em um contador gama. A constante de dissociação (K_d) e a capacidade

máxima de ligação (Bmax) foram calculadas baseadas na análise de regressão não-linear da análise da competição de ligação utilizando-se o software Prism 4.0 *GraphPad Prism* (San Diego, CA, EUA)

3.8 Ensaios de expressão (*Western blot*)

Células HEK-293 expressando estavelmente PROK2 WT, PROKR2 R80C, PROKR2 R85C e PROKR2 R85H foram utilizadas para realização de *Western blot*. Foi utilizado o reagente de extração de proteínas de células de mamíferos *M-PER* (*Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA*) para a extração das proteínas das membranas celulares e lise celular. Os lisados de células foram sonicados por 20 segundos no gelo e centrifugados por 10 minutos a 12000 g a 4°C. A quantificação protéica foi realizada no espectrofotômetro *Beckman Coulter* (*Fullerton, CA, EUA*) utilizando cinco microlitros de proteína e 1 ml do reagente *Coomassie Plus Protein* (*Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA*). Quinze microgramas da proteína de cada amostra foi separada por eletroforese com gel de poliacrilamida, transferida para membrana de nitrocelulose (*Whatman, Dassel, Alemanha*). A membrana foi incubada por 12 horas com anticorpo de camundongo anti-V5 (*Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos*) na diluição 1:2500; seguida de incubação com anticorpo IgG-HRP anti-camundongo (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca, EUA*) na diluição 1:250. Bandas imunorreativas foram detectadas através de reagente quimioiluminescente *HyGLOTM Chemiluminescent HRP Detection Reagent* (*Denville Scientific, Metuchen, NJ, EUA*). As bandas de PROKR2 V5 foram normalizadas com beta actina (anti-beta

actina peroxidase, diluição 1:10000, Sigma, *St. Louis, MO*, EUA) mensurada na mesma membrana. As proteínas de membranas foram normalizadas com NaK⁺ATPase (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA*, EUA) diluição 1:1000, também mensuradas na mesma membrana.

3.9 Tratamento com a enzima *Endo H*

Para confirmar a hipótese de que as bandas de menor peso molecular correspondiam a receptores imaturos não glicosilados no *Western blot* o lisado protéico das células HEK-293 expressando estavelmente PROKR2WT foi submetido à digestão pela enzima endo H (New England Biolabs, *Ipswich, MA*, EUA). Quatro microlitros da enzima endo H foram adicionados a quinze microgramas de proteína e incubados a 37°C por duas horas e posteriormente submetidos ao *Western blot*.

4 RESULTADOS

4.1 Pesquisa de mutações no gene *PROK2*

Uma mutação no gene *PROK2* (p.G100fsX121) foi identificada em dois irmãos entre os 63 pacientes estudados com síndrome de Kallmann e uma mutação (p.I55fsX56) foi identificada em um paciente entre os 44 pacientes com HHIn. Nenhuma destas alterações foi identificada no grupo controle (**Figura 6**).

Figura 6. Representação da sequência de aminoácidos da *PROK2* e localização das mutações identificadas. Círculos azuis representam exon 1, os círculos rosa o exon 2 e os círculos amarelos o exon 4. O círculo vermelho representa a mutação identificada em heterozigose enquanto o círculo verde representa a mutação identificada em homozigose

4.1.1 Variante c.297-298insT (p.G100fsX121)

Uma inserção de um nucleotídeo timina (T) em homozigose entre os nucleotídeos 297 e 298 (c.297-298insT) foi identificada no exon 4 do gene *PROK2* (**Figura 7**), produzindo a mutação do tipo *frameshift* p.G100fsX121. Esta mutação resulta na formação de um *stop codon* na posição 121, impedindo a produção da décima cisteína, indispensável para a formação das pontes dissulfídicas.

Figura 7. Eletroferograma demonstrando a inserção em homozigose de uma timina (painel A), resultando 7 timinas consecutivas no exon 4 do gene *PROK2*. A sequência selvagem do gene *PROK2* apresenta 6 timinas (painel B)

A mutação p.G100fsX121 foi identificada em dois irmãos com síndrome de Kallmann (**Tabela 8**, pacientes 1 e 2). O caso índice era um paciente do sexo masculino que procurou o ambulatório do HCFMUSP de São Paulo aos 23 anos devido à ginecomastia, micropênis e anosmia. Na primeira consulta, o exame físico revelou pêlos pubianos Tanner IV, ausência de criptorquidia, ginecomastia bilateral TIII, barba ausente e micropênis (comprimento peniano: 6 centímetros, DP -3,6). Seu irmão, aos 18 anos, não havia apresentado desenvolvimento puberal espontâneo. Ao exame físico identificou-se *pectus excavatum* e micropênis (comprimento peniano: 4 cm; DP: -4,9). Os pais eram assintomáticos do ponto de vista reprodutivo e olfatório e negavam consanguinidade. Infelizmente, eles não estavam disponíveis para os estudos moleculares. Os exames hormonais dos dois pacientes mostraram valores baixos de testosterona e valores pré-púberes de gonadotrofinas basais e após estímulo com GnRH (**Tabela 9**).

Tabela 8. Características clínica de nove pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico ou síndrome de Kallmann associado a mutações dos genes *PROK2* e *PROKR2*

Paciente (nº)	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico	Mutação		
				cDNA	Proteína	Padrão de Herança
Gene PROK2						
#1	23	M	SK	c.297-298insT	p.G100fsX121	Homozigose
#2	18	M	SK	c.297-298insT	p.G100fsX121	Homozigose
3	17	M	HHIn	c.163delA	p.I55fs56X	Heterozigose
Gene PROKR2						
4	21	F	SK	c.238C>T	p.R80C	Heterozigose
5	14	M	SK	c.420C>G	p.Y140X	Homozigose
6	50	F	SK	c.518 T>G	p.L173R	Heterozigose
7	52	M	SK	c.518 T>G	p.L173R	Heterozigose
8	15	M	SK	c.802 C>T	p.R268C	Heterozigose
9	42	M	HHIn	c.802 C>T	p.R268C	Heterozigose

M: masculino, F: feminino. # irmãos.

Tabela 9. Características hormonais e ressonância magnética da região olfatória de nove pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico ou síndrome de Kallmann associado a mutações dos genes *PROK2* e *PROKR2*

Paciente (nº)	LH (U/L)		FSH(U/L)		Estradiol pg/mL	Testosterona ng/dL	RM de sulcos e bulbos olfatórios
	Basal	Pico	Basal	Pico			
1	0,6	3,8	1,0	1,5		56	hipoplasia bilateral
2	0,6	3,5	<1,0	3,0		40	não realizou
3	0,1	1,8	0,4	2,4		<14	sem alterações
4	0,8	15	1,9	7,5	<13		agenesia bilateral
5	<0,6		<1,0			<14	hipoplasia bilateral
6	<0,6		<1,0		38,5		agenesia bilateral
7	0,6		<1,0			135	hipoplasia bilateral
8	0,6	1,2	<1,0	2,5		<14	agenesia unilateral esquerda
9	9,7	22*	6	14*		23*	sem alterações

RM ressonância magnética, *exames realizados por radioimunoensaio (RIE).

4.1.2 Variante c.163delA (p.I55fsX56)

Uma deleção de uma adenina localizada na posição 163 do exon 2 do gene *PROK2* foi identificada em heterozigose. Esta deleção resultou na mutação em *frameshift* (p.I55fsX56) e na formação de um *stop codon* prematuro na posição 56, gerando uma proteína truncada de 27 aminoácidos (**Figura 8**).

(A)

(B)

Figura 8. Eletroferograma apresentando a deleção em heterozigose de uma adenina (painel A) no exon 1 do gene *PROK2*. Sequência selvagem do gene *PROK2* no painel B

A mutação p.I55fsX56 foi identificada em um paciente portador de HHIn que apresentou concentrações pré-puberais de testosterona e gonadotrofinas basais e após estímulo com GnRH (**Tabela 9**, paciente 3).

4.2 Pesquisa de mutações no gene *PROKR2*

Na região codificadora do gene *PROKR2* foram identificadas três mutações do tipo *missense* em heterozigose: c.238C>T (p.R80C), c.518 T>G (p.L173R) e c.802 C>T (p.R268C) em cinco pacientes não relacionados. Uma mutação *nonsense*, c.420C>G (p.Y140X) em homozigose foi identificada em um paciente portador de síndrome de Kallmann (**Figura 9**).

Figura 9. Representação da sequência de aminoácidos do *PROKR2*. Os círculos em vermelho destacam a localização das mutações identificadas neste estudo

4.2.1 Variante c.238C>T (p.R80C)

Uma transição de uma citosina por uma timina (c.238C>T) foi identificada em heterozigose na posição 238 do DNA genômico do gene *PROKR2*, resultando na substituição de uma arginina por uma cisteína na posição 80 do PROKR2 (p.R80C). Esta variante está localizada na porção N-terminal da primeira alça intracelular do receptor (**Figura 9**).

A variante p.R80C foi identificada em uma paciente do sexo feminino de 21 anos que apresentou com história de amenorréia primária e ausência de desenvolvimento mamário espontâneo. Seu teste olfatório revelou anosmia (**Tabela 8, paciente 4**). Os exames laboratoriais mostraram valores baixos de estradiol e concentrações baixas de gonadotrofinas basais (**Tabela 9, paciente 4**). Sua irmã e mãe eram portadoras da mesma variante em heterozigose, e apresentavam histórico de desenvolvimento puberal normal e teste olfatório normal (**Figura 10**). A nova variante p.R80C foi ausente nos 200 alelos controles analisados.

Figura 10. Pedigrees e eletroferogramas dos pacientes 4, 5, 6 e 8 mostrando a segregação familiar das mutações do gene *PROKR2*. O caso índice é identificado por uma seta vermelha. Símbolo cheio significa hipogonadismo hipogonadotrófico e anosmia. Ponto de interrogação corresponde a genótipo desconhecido. As substituições nucleotídicas estão identificadas por uma seta preta

4.2.2 Variante c.420C>G (p.Y140X)

Uma nova transversão de uma citosina por uma guanina foi identificada em homozigose no nucleotídeo 420 do exon 1 do gene *PROKR2*. Esta variante resulta na substituição de uma tirosina por um *stop codon*, gerando um receptor truncado no terceiro domínio transmembrana (**Figura 9**). Esta mutação foi identificada em um menino com micropênis e criptorquidia. Seu teste olfatório revelou anosmia. Os pais do paciente são portadores da mutação em heterozigose. Ambos relataram desenvolvimento puberal e olfato normais (**Figura 10**).

4.2.3 Variante c.518 T>G (p.L173R)

A transversão de uma timina por uma guanina foi identificada em heterozigose no exon 2 do gene *PROKR2*, posição 518 (c.518T>G), resultando na substituição de uma leucina por uma arginina na posição 173 do *PROKR2* (p.L173R). Esta variante está localizada na transição da segunda alça intracelular com o quarto domínio transmembrana (**Figura 9**).

A variante p.L173R foi identificada em heterozigose em uma paciente com história de amenorréia primária, ausência de caracteres sexuais secundários e anosmia (**Tabela 8, paciente 6**). Esta paciente apresentou diabetes mellitus tipo 2, obesidade, hipertensão arterial sistêmica e hipertrigliceridemia na vida adulta. Sua mãe e irmão assintomáticos não apresentaram a variante p.L173R (**Figura 10**).

A variante p.L173R também foi identificada em heterozigose em um paciente do sexo masculino portador de síndrome de Kallmann, que desenvolveu obesidade

na vida adulta (**Tabela 8, paciente 7**). O paciente negava história familiar de HH e/ou alterações olfatórias.

4.2.4 Variante c.802 C>T (p.R268C)

Uma transição de uma citosina por uma timina em heterozigose no nucleotídeo 802 (c.802C>T) foi identificada exon 2 do gene *PROKR2*, resultando na substituição de uma arginina por uma cisteína na posição 268 do *PROKR2* (p.R268C). Esta variante está localizada na terceira alça intracelular do *PROKR2* (**Figura 9**).

A variante p.R268C foi identificada em um paciente do sexo masculino que foi avaliado no ambulatório do HCFMUSP pela primeira vez aos 15 anos devido à ausência de caracteres sexuais secundários e anosmia. Ao exame clínico apresentava micropênis e criptorquidia. Seus exames laboratoriais revelaram valores baixos de testosterona e gonadotrofinas basais e após estímulo com GnRH (**Tabela 9, paciente 8**). Seu pai assintomático é portador da mesma mutação em heterozigose. A análise do gene *KAL-1* por MLPA revelou uma deleção nos exons 1 e 2.

A variante c.802 C>T (p.R268C) foi identificada também em um paciente portador de HHIn e micropênis (**Tabela 8, paciente 9**). O paciente nega história familiar de hipogonadismo ou alterações olfatórias. Esta mutação também havia sido descrito previamente em heterozigose em um caso esporádico [4].

4.3 Outros achados moleculares

Um polimorfismo intrônico do gene *PROK2*, IVS3 +14G/A, e três variantes polimórficas exônicas sinônimas foram identificados: c.465C/T, c.525C/G e c.585G/C. Todos os polimorfismos encontrados haviam sido previamente descritos (SNP ID: rs3796224, rs3746684, rs3746683 e rs3746682), e não houve diferença nas frequência das variantes entre os pacientes com HHI e indivíduos do grupo controle.

4.4 Estudos funcionais das variantes p.R80C, p.R85C e p.R85H

Com a finalidade de avaliar o efeito da nova mutação identificada na primeira alça intracelular do PROKR2 e compará-la com as outras mutações previamente identificadas na mesma região, foram realizados estudos de sinalização intracelular e de expressão do PROKR2 selvagem e contendo as variantes 80C, 85C e 85H. A atividade dos receptores contendo as mutações foi avaliada por meio de ensaios de sinalização: um ensaio de acúmulo de trifosfato inositol (IP) e um ensaio de transcrição de gênica, Egr1-LUC (luciferase); ensaios de ligação e avaliação da expressão (*Western blot*).

4.4.1 Avaliação do Acúmulo de Fosfatidil-Inositol (IP)

Acúmulo máximo de inositol foi observado com a concentração de 10^{-7} M de PROK2 tanto para o receptor selvagem (WT) quanto para os receptores mutantes. O estímulo com PROK2 na concentração 10^{-7} M (dose máxima) resultou em indução na produção de IP3 dez vezes maior em relação às células não estimuladas transfectadas com o receptor selvagem. As células transfectadas com a nova variante R80C induziu uma produção três vezes maior de IP3. R80C mostrou uma redução de aproximadamente 70% na capacidade de estimular produção de IP em relação ao receptor selvagem (**Figura 11**). As células transfectadas com os receptores R85C e R85H apresentaram uma curva dose-resposta semelhante ao receptor selvagem, indicando que a estas variantes não afetaram a produção de IP do PROKR2. (**Figura 11**).

	WT	R80C	R85C	R85H
EC 50	$5,04 \times 10^{-10}$	$1,47 \times 10^{-9}$	$1,04 \times 10^{-9}$	$2,26 \times 10^{-9}$

Figura 11. Produção de fosfatidil inositol total em células COS-7 transfectadas com PROKR2 selvagem (WT) e mutantes R80C, R85C e R85H tratados com PROK2 de 2×10^{-10} a 10^{-7} M. Curvas foram apresentadas como % de acúmulo máximo de IP em relação a PROKR2 WT. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. As barras representam o erro padrão

4.4.2 Ensaio de Luciferase (*Gene reporter*)

No ensaio da luciferase a variante p.R80C mostrou uma atividade muito reduzida quando comparada ao receptor selvagem (35%). As variantes p.R85C e p.R85H mostraram uma atividade moderada quando comparada ao PROKR2WT (aproximadamente 75 e 70% respectivamente). Análise estatística mostrou diferença significativa somente na estimulação com a dose 10^{-7} M para estas duas variantes mutantes (**Figura 12**).

	WT	R80C	R85C	R85H
EC 50	$3,28 \times 10^{-9}$	$1,04 \times 10^{-9}$	$3,51 \times 10^{-9}$	$3,04 \times 10^{-9}$

Figura 12. Luminescência produzida pelas células transfectadas com PROKR2 selvagem (WT) e mutantes R80C, R85C e R85H após estímulo com PROKR2 de 10^{-10} a 10^{-7} M. Curvas foram apresentadas como % de produção máxima de luminescência em relação ao PROKR2 WT. Experimento representativo de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. As barras representam o erro padrão

4.4.3 Ensaios de ligação ao receptor

Ensaios de ligação foram realizados com o intuito de comparar a afinidade e a quantidade dos receptores mutantes em relação ao receptor selvagem. O receptor mutante p.R80C apresentou redução de 70% na capacidade de ligação máxima (Bmax) em relação ao PROKR2 selvagem (**Figura 13**), indicando uma redução na quantidade de receptores em células HEK-293 transfectadas transientemente.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a afinidade de ligação dos receptores mutantes R85C e R85H e o receptor selvagem.

	WT	R80C	R85C	R85H
Bmax (CPM/min)	1117	457,7	923,4	868,6

Figura 13. Curva de dissociação apresentada pelas células tratadas com MIT¹²⁵ e PROK2 durante 15 minutos em temperatura ambiente. Curvas foram apresentadas como % de ligação máxima ao receptor em relação ao PROKR2 WT. Experimento representativo de três experimentos independentes. As barras representam o erro padrão

4.4.4 Estudos de Expressão

Com o objetivo de avaliar a expressão dos receptores mutantes e selvagem foi realizado *Western blot* de lisados das células totais e das proteínas obtidas do compartimento das membranas celulares. O receptor mutante R80C apresentou redução de

60% na expressão em comparação ao receptor selvagem nas proteínas obtidas do lisado de célula total e na análise das proteínas de membranas (**Figura 14**). A banda de peso molecular aproximada de 45 kDa correspondente ao PROKR2 maduro. É notável a presença de uma banda de peso molecular aproximado de 27 kDa (banda 2) no lisado das células totais do mutante R80C. O mutante R85C não apresentou diferença em comparação ao receptor selvagem enquanto o mutante R85H apresentou redução de aproximadamente 25% na expressão no lisado total e somente 10% de redução quando avaliado somente as proteínas extraídas do compartimento da membrana celular (**Figura 14**).

Figura 14. (A) *Western blot* representativo de quatro experimentos diferentes. Proteínas extraídas do lisado de células HEK-293 expressando estavelmente os receptores WT ou os receptores mutantes (painel esquerdo). A primeira coluna corresponde à células HEK-293 não transfectadas (HEK). Proteínas extraídas das membranas celulares (painel direito). (B) Gráficos ilustrativos da expressão relativa dos receptores mutantes em comparação com o receptor selvagem (WT) usando dados de três experimentos diferentes. Os receptores R80C e R85H mostraram diferenças significativamente estatísticas em relação ao WT. As barras representam o erro padrão

Com o intuito de avaliar a natureza da banda de menor peso molecular (banda 2) apresentada no *Western blot* do receptor R80C foi realizado o tratamento com a enzima *Endo H*, que cliva glicosídeos ligados a resíduos de asparagina do receptor. O tratamento com *Endo H* resultou na diminuição da intensidade da banda de 42 kDa e aumento da intensidade da banda 2 (**Figura 15**).

Figura 15. *Western blot* mostrando as proteínas do lisado total de células transfectadas com o receptor selvagem (WT) ou receptor mutante R80C antes e após tratamento com a enzima *Endo H* (WT + endo H e R80C + endo H). Uma banda de peso molecular de aproximadamente 27 kDa foi intensificada após o tratamento com a enzima *Endo H*, sugerindo a digestão de receptores glicosilados. *Western blot* representativo de três experimentos diferentes

4.4.5 Estudos para avaliar efeito dominante negativo

O potencial efeito dominante negativo do receptor mutante R80C foi analisado por meio de ensaios de IP. Células HEK-293 expressando estavelmente o receptor mutante R80C apresentaram discreta indução de acúmulo de IP ao estímulo com 10^{-8} M de PROK2. A transfecção destas células com o receptor selvagem (5ng, 10 ng, 25 ng 50 ng e 100 ng) resultou em aumento do acúmulo de IP indicando que o receptor mutante R80C não interfere com a função do receptor selvagem (**Figura 16**).

Figura 16. Células HEK-293 expressando estavelmente o receptor R80C transfectadas com diferentes quantidades de receptor selvagem. As colunas à esquerda de cada grupo representam as células em estado basal e as colunas à direita o acúmulo de IP induzido pelo tratamento com 10^{-8} M de PROK2

5 DISCUSSÃO

O sistema da procinetina 2 está relacionado com uma série de eventos biológicos, incluindo morfogênese dos bulbos olfatórios e aquisição de atividade reprodutiva normal [88, 89, 97]. A associação deste sistema com a migração dos neurônios olfatórios e secretores de GnRH foi demonstrada por meio da ablação dos genes *PROK2* e *PROKR2* em camundongos. Estes animais apresentaram hipoplasia do sistema reprodutivo e dos bulbos olfatórios. A análise histológica mostrou interrupção da migração dos neurônios secretores de GnRH após cruzarem a placa cribiforme e constituindo uma massa de neurônios com arranjo fibrocelular antes de atingirem a região anterior do SNC. [88, 90]. Poucos neurônios secretores de GnRH alcançaram a região hipotalâmica e este número não foi suficiente para o desenvolvimento normal do sistema reprodutivo dos animais estudados. É notável que 50% dos camundongos com ablação do gene *Prok2* apresentaram desenvolvimento assimétrico dos bulbos olfatórios [89, 90], enquanto que os camundongos com ablação do gene que codifica o receptor (*Prokr2*) apresentaram severa redução dos bulbos olfatórios bilateralmente [88]. A ablação de ambos os genes *Prok2* e *Prokr2* em heterozigose não resultou em alterações do sistema reprodutivo e olfatório. Baseados nesses estudos, investigamos mutações nos genes *PROK2* e *PROKR2* em 63 pacientes portadores de síndrome de Kallmann e 44 pacientes portadores de HHIn. No grupo de pacientes portadores de síndrome de Kallmann, a frequência de mutação no gene *PROK2* foi 1,6% e no gene *PROKR2* 9,5%. Entre os pacientes com HHIn foi

identificada apenas duas mutações, uma no gene *PROK2* e uma mutação no gene *PROKR2*, resultando em uma frequência de 2,3% de anormalidades nesse sistema. No estudo de Dode *et. al.* [4] a frequência de mutações no gene *PROK2* foi de 2% e no gene *PROKR2* de 5,2% em 192 pacientes com síndrome de Kallmann. Posteriormente, Cole *et. al.* [98] estudando uma maior casuística de pacientes (324 pacientes com HHI), a frequência de mutações no gene *PROK2* foi de 2,4% nos pacientes com síndrome de Kallmann e 0,65% nos HHIn. Nesse mesmo estudo, a frequência de mutações no gene *PROKR2* foi de 4,1% e 2,6% nos pacientes com síndrome de Kallmann e HHIn, respectivamente. Portanto, a frequência de mutações no gene *PROKR2* no grupo de pacientes brasileiros com síndrome de Kallmann foi ligeiramente superior a descrita na literatura.

Identificamos duas mutações *frameshift* no gene *PROK2*: p.G100fsX121 e p.I55fsX56. A variação p.G100fsX121 foi identificada em homozigose em dois irmãos portadores de síndrome de Kallmann (**Tabela 8, pacientes 1 e 2**). Os pais dos pacientes são heterozigotos obrigatórios e não relataram queixas reprodutivas e olfatórias sugerindo uma herança autossômica recessiva nessa família. Essa mutação havia sido previamente descrita em heterozigose em indivíduos da mesma família apresentando anosmia isolada, síndrome de Kallmann e HHIn, indicando variabilidade fenotípica associada a esse defeito do gene *PROK2* [4]. A mutação p.G100fsX121 resulta em uma proteína truncada com a ausência da décima cisteína que constitui uma das cinco pontes dissulfídicas essenciais para a estrutura terciária da proteína. Portanto, não há dúvida que essa mutação p.G100fsX121 em homozigose resulta em perda de função e é causadora da síndrome de Kallmann nos pacientes brasileiros.

A mutação p.I55fsX56 do PROK2 foi identificada em heterozigose em um paciente com HHIn (**Tabela 8, paciente 3**). Esta mutação foi previamente descrita em dois trabalhos distintos [90, 99]. Em uma família portuguesa a variação p.I55fsX56 foi identificada em homozigose em dois irmãos portadores de síndrome de Kallmann e uma irmã portadora de HHIn. Um irmão portador da mutação em heterozigose era assintomático, fortalecendo a hipótese de herança autossômica recessiva dos defeitos da PROK2 [90]. O estudo de mobilização de cálcio em células CHO transfectadas com o PROKR2 selvagem e estimuladas com a PROK2 mutante, mostrou que a mutação p.I55fsX56 resulta em uma proteína sem qualquer atividade funcional [90]. A identificação de mutações inativadoras em homozigose da PROK2 em pacientes com olfato normal, aliada a descrição de camundongos *knockout* para o gene *Prok2* com alterações olfatórias variáveis [90], sugerem que a PROK2 pode influenciar também a síntese, secreção e/ou ação do GnRH independente do seu efeito na migração neuronal. A evidência de expressão da PROK2 em áreas hipotalâmicas onde residem os neurônios secretores de GnRH reforça essa teoria [90]. A segunda descrição da mutação p.I55fsX56 foi associada à síndrome de Kallmann em um paciente suíço [99].

No estudo do gene *PROKR2* foram identificadas uma mutação *stop códon* em homozigose (p.Y140X) e três mutações *missense* em heterozigose (p.R80C, p.L173R e p.R268C). A mutação p.Y140X do gene *PROKR2* foi identificada em um adolescente portador de síndrome de Kallmann (**Tabela 8, paciente 5**). Esta mutação resulta em um *stop codon* no terceiro domínio transmembrana do receptor e leva a formação de uma proteína truncada e possivelmente com perda total de função devido à degradação intracelular (**Figura 9 e 17**). O paciente portador desta mutação

apresentou micropênis e criptorquidia ao nascimento. Ambos os pais eram carreadores desta variante em heterozigose e negaram anormalidades olfatórias e reprodutivas. Assim como no gene *PROK2*, a haploinsuficiência do gene *PROKR2* não foi suficiente para causar o fenótipo da síndrome de Kallmann.

É notável que o paciente com a mutação p.Y140X do *PROKR2* em homozigose apresentou uma forma severa de HHI. De fato, em um estudo com 55 pacientes com HHI e mutações nos genes *PROK2* e *PROKR2*, os homens carreadores de mutações bialélicas apresentaram maior prevalência de micropênis e criptorquidia, menor volume testicular, valores mais baixos de testosterona, FSH basal e LH após estímulo com GnRH [100].

As três mutações do tipo *missense* identificadas no gene *PROKR2*, pR80C, pL173R e pR268C afetaram aminoácidos conservados entre as diferentes espécies, sugerindo uma potencial importância funcional. A variação p.L173R representa o defeito mais freqüente do *PROKR2* descrito até o presente momento. Essa mutação foi identificada em homozigose, heterozigose e heterozigose composta em pacientes com HHIn, síndrome de Kallmann, parentes de primeiro grau e indivíduos controles, sendo que nesses, numa frequência muito menor que no grupo de HHI [4, 67, 68, 93, 100]. A p.L173R foi previamente associada a defeitos no gene *KALI* [67, 100]. No nosso coorte de pacientes, a mutação p.L173R foi identificada em heterozigose em um paciente portador de síndrome de Kallmann e um paciente portador de HHIn (**Tabela 8, pacientes 6 e 7**). O estudo funcional realizado previamente da mutação p.L173R mostrou função significativamente reduzida nos ensaios de mobilização de cálcio [93, 98] e função moderadamente reduzida no ensaio que avaliou a cascata de sinalização da MAPK [98]. A identificação de variações em heterozigose com perda

de função do PROKR2 em indivíduos normais sugere que é necessário um segundo defeito para que a doença se manifeste [68].

Os camundongos *knockout* para os genes *Prok2* e *Prokr2* em heterozigose não apresentaram fenótipo reprodutivo e olfatório [88, 90]. Até o momento, aproximadamente 25 mutações no gene *PROKR2* foram descritas em pacientes portadores de HHI (**Figura 17**) e maioria destas mutações foram identificadas em heterozigose [94]. Um grande desafio é entender a importância das mutações do *PROKR2* em heterozigose nos pacientes com HHI. Uma hipótese muito discutida atualmente é a presença de mutações em mais de um gene como causa da doença. Em um estudo recente com 397 pacientes portadores de HHI, 2,2% apresentaram mutações em dois ou mais genes [68]. Interessantemente, esta incidência foi a mesma incidência de homozigose e heterozigose composta. Entre os pacientes com mutações identificadas, a chance de oligogenicidade foi estimada em 11,3%. Nenhum dos 179 controles apresentou variações em mais de um gene associado ao HHI [68]. A presença de mutações em mais de um gene não explica totalmente a questão das mutações em heterozigose nos pacientes com HHI. Entre os pacientes com mutações do *PROKR2* em heterozigose, somente 10% apresentaram mutações em outros genes conhecidos [94]. A possibilidade de mutações em genes não conhecidos como causadores do HHI não pode ser descartada. Outra possibilidade é a presença de uma segunda variação genética na região promotora ou na região intrônica, comumente não avaliadas. Adicionalmente, alterações epigenéticas ou até mesmo fatores ambientais poderiam influenciar a expressão do alelo mutado. No nosso grupo de pacientes com HHI, parentes de primeiro grau portadores da mesma mutação em heterozigose também eram portadores dos mesmos

polimorfismos nos genes *PROK2* e *PROKR2*, sugerindo que essas variantes não contribuíram para o desenvolvimento do fenótipo da doença.

Figura 17. Representação esquemática da sequência de aminoácidos do PROKR2. Os círculos em vermelho destacam a localização das mutações em heterozigose, enquanto os círculos em cinza destacam a localização das mutações identificadas em homozigose ou heterozigose. Apenas duas mutações foram identificadas em homozigose (círculos verdes). Figura obtida de Abreu, Kaiser e Latronico [94]

A mutação p.R268C do PROKR2 foi identificada em heterozigose em dois pacientes com HHI (1 síndrome de Kallmann e 1 HHIn). O paciente com síndrome de Kallmann foi o único que apresentou alteração digênica na nossa coorte. Uma deleção do exon 1 e 2 do gene *KAL1* foi evidenciada em análise de MLPA. Esta

mutação foi previamente descrita em heterozigose em HHI [4, 67, 100] e curiosamente no grupo controle de um recente estudo (frequência alélica de 0,2%) [68]. Esta variante está localizada na terceira alça intracelular do receptor (**Figura 17**). Estudo funcional anterior mostrou redução de 30% da atividade do receptor mutante no ensaio de mobilização de cálcio [93], o que nos leva a questionar o papel desta mutação como causador único do fenótipo HHI. Nesse caso, a deleção do gene *KAL1* parece ser suficiente para explicar o fenótipo da síndrome de Kallmann.

A mutação p.R80C do PROKR2 não foi previamente descrita na literatura. Essa mutação foi identificada em uma paciente com história de amenorréia primária e ausência de desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários (**Tabela 8, paciente 4**). Sua mãe e irmã também são portadoras da mesma mutação e negaram qualquer alteração puberal ou olfatória. A paciente, aos 24 anos, foi submetida a tratamento clínico caracterizado por reposição de LH e FSH e após 3 meses de tratamento engravidou e levou a gestação a termo sem intercorrências.

A mutação p.R80C está localizada na primeira alça intracelular do PROKR2 e a arginina 80 é altamente conservada entre as diferentes espécies (**Figura 18**). Outras mutações na primeira alça intracelular do PROKR2, p.R85C e p.R85H, foram também descritas [4, 68, 93, 98, 100]. Em estudo anterior, a mutação R85C mostrou pequena variação na capacidade de sinalização em relação ao receptor selvagem em ensaio de luciferase.[98]. Entretanto, no ensaio que avalia a mobilização de cálcio, as mutações R85C e R85H, apresentaram atividade ao redor de 60% da obtida pelo receptor selvagem [93, 98].

↓ ↓

```

PROKR2_human   GNFVFIAALTRYKKLRNLTNLI
PROKR2_bovine  GNFVFITALTRYKKLRNLTNLI
PROKR2_mouse   GNFVFIAALARYKKLRNLTNLI
PROKR2_rat     GNFVFIAALARYKKLRNLTNLI
                *****; **; *****

```

Figura 18. Alinhamento da sequência de amino ácidos do PROKR2 de diferentes espécies de mamíferos. As fontes das sequências são: *Homo sapiens* (GenBank, NP_658986.1), *Bos taurus* (GenBank, NP_777065.1), *Mus musculus* (GenBank, NP_659193.3) e *Rattus norvegicus* (GenBank, NP_620434.1). As setas indicam as argininas na posição 80 e 85, sítios de mutações. Adaptado de Dode *et al.* [4]

É bem conhecido o papel da segunda, terceira alças intracelulares e do domínio carboxi-terminal do receptor no acoplamento e ativação das proteínas G, assim como no transporte intracelular do receptor para a membrana plasmática [101, 102]. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel da primeira alça intracelular na fisiologia dos receptores acoplados a proteína G (GPCR). Duvernay *et al.* [103] demonstrou que a primeira alça intracelular do GnRHR é essencial para a ativação da proteína G_s , mas não é importante para a ativação da proteína G_q , principal proteína ativada por esse receptor. Mutações na primeira alça intracelular dos receptores α e β_2 -adrenérgicos e do receptor da angiotensina 1 resultam na retenção desses receptores no retículo endoplasmático, demonstrando a importância deste domínio no transporte intracelular [104]. Nosso objetivo foi determinar se as mutações localizadas na primeira alça intracelular são a causa do HHI e compreender o mecanismo pelo qual estas mutações influenciam na função do PROKR2.

Esta análise poderá contribuir na melhor compreensão da função deste domínio nos GPCRs.

Realizamos estudos *in vitro* da nova mutação p.R80C, localizada na primeira alça intracelular do PROKR2 em conjunto com as mutações p.R85C e p.R85H previamente identificadas [93, 98]. Semelhante aos estudos anteriores, os atuais experimentos *in vitro* das mutações p.R85C e p.R85H mostraram diferenças pequenas em relação ao receptor selvagem. No ensaio de acúmulo de IP total, não houve diferença significativa entre o receptor selvagem e os mutantes R85C e R85H (**Figura 11**), entretanto, uma diferença no EC50 entre o receptor selvagem e os receptores mutantes foi evidenciada significado estatístico. No ensaio de luciferase, observamos uma diferença significativa na dose 10^{-7} M de PROK2 (**Figura 12**) entre o receptor selvagem e mutantes R85C e R85H sugerindo comprometimento da sinalização da MAPK. Nos ensaios de ligação ao receptor a constante de dissociação (Kd) dos mutantes p.R85C e p.R85H não foi significativamente diferente da observada pelo receptor selvagem (**Figura 13**). A capacidade de ligação máxima (Bmax) do receptor p.R85H foi discretamente inferior à Bmax do receptor WT, indicando um potencial número menor de receptores na membrana citoplasmática das células transfectadas (**Figura 13**). Esse achado foi confirmado pelo *Western blot* que mostrou uma redução de aproximadamente 25% na expressão do receptor p.R85H no lisado de células totais e na fração extraída das membranas celulares (**Figura 14**). O receptor p.R85C apresentou expressão similar a do receptor selvagem em ambos os experimentos (**Figura 14**), em acordo com o achado do ensaio de ligação ao receptor.

A mutação p.R80C determinou uma menor atividade nos ensaios de acúmulo de IP total e nos ensaios de luciferase. O receptor mutado não atingiu a mesma resposta que o receptor selvagem mesmo com o aumento da dose de PROK2 (**Figuras 11 e 12**), sugerindo defeito no número de receptores expressos na membrana ou uma redução na capacidade de ativar as vias de sinalização. A curva de dose resposta obtida nos estudos de sinalização não favoreceu a hipótese de defeitos de ligação, uma vez que não se observou uma diferença significativa no EC50 entre o receptor WT e mutante. A capacidade total de ligação do receptor p.R80C foi significativamente menor em relação ao receptor selvagem (B_{max} R80C: 457,7 CPM/min, WT: 1117 CPM/min) o que indica uma redução significativa do número de receptores na membrana plasmática (**Figura 13**). Os achados obtidos no *Western blot* confirmaram a hipótese de redução do número de receptores, mas não somente na membrana plasmática celular, também no lisado celular total (**Figura 14**). Provavelmente, a substituição da arginina pela citosina na posição 80 leva a uma alteração conformacional na estrutura protéica estimulando sua degradação. Interessante foi o aparecimento de uma segunda banda de menor peso molecular (banda 2) no *Western blot* do lisado de células totais do mutante p.R80C (**Figura 14.A**). Alguns trabalhos publicaram o mesmo achado e mostraram que a banda de peso molecular mais leve presente no *Western blot* de GPCRs representa receptores não glicosilados [105]. A N-glicosilação dos GPCRs é necessária para funções que vão desde ligação ao agonista, formação da estrutura terciária, estabilidade e internalização do receptor. Esse processo compreende uma fase de maturação crucial para a ocorrência de um transporte intracelular eficiente do receptor a partir do retículo endoplasmático [106]. Para confirmar que a banda 2 presente no *Western blot* do receptor PROKR2 mutado

R80C corresponde à receptores não glicosilados submetemos as proteínas extraídas no lisado celular total à digestão com a enzima *Endo H*, que cliva carboidratos com manose ligados a asparagina (N). De fato, o tratamento com *Endo H* diminuiu a intensidade da banda de peso molecular de 42 kDa, que corresponde ao receptores glicosilados e intensificou a banda 2. A banda 2 não foi visualizada no *Western blot* das proteínas extraídas das membranas, sugerindo que somente os receptores PROKR2 maduros são transportados para a membrana plasmática e que a glicosilação do receptor é essencial para sua adequada localização celular. Portanto, nossos achados sugerem que a alteração estrutural causada pela substituição do aminoácido arginina pela cisteína provavelmente impede a glicosilação do receptor provavelmente sofre retenção no retículo endoplasmático e está destinado a degradação.

Com o intuito de avaliar se a mutação p.R80C exerce efeito dominante-negativo sobre o receptor selvagem realizamos ensaios de acúmulo de IP transfectando transientemente diferentes quantidades de plasmídeos selvagem (WT) em células HEK-293 expressando estavelmente PROKR2 mutante. O estímulo com 10^{-8} M de PROK2 resultou em aumento do acúmulo de IP mostrando que o receptor mutante R80C não interferiu com a função do receptor selvagem. Nossos estudos *in vitro* não mostraram efeito dominante-negativo em acordo com um estudo realizado previamente [93].

A PROK2 desempenha um papel importante no controle do ritmo circadiano, sendo altamente expressa no núcleo supraquiasmático, região considerada marca-passo do ritmo circadiano [84]. A expressão da PROK2 nesse núcleo é controlada pela luz [107]. Camundongos com ablação dos genes *PROK2* e *PROKR2* apresentam

alterações no ritmo circadiano [85, 108]. Entretanto, não identificamos sinais que pudessem sugerir alterações do ritmo circadiano no nosso grupo de pacientes com HHI e mutações nos genes *PROK2* ou *PROKR2*. Além disto, quando questionados, os pacientes negaram distúrbios do sono e vigília. Pacientes com HHI devido a mutações dos genes *PROK2* e *PROKR2* apresentaram queixas de distúrbios de sono, porém quando os estudos de polissonografia foram normais nesses pacientes [100]. Um paciente portador da mutação p.R73C do *PROK2* apresentou distúrbios do sono, mas este paciente também apresentava severa obesidade que poderia explicar essas alterações, sendo difícil relacionar o distúrbio do sono à mutação no gene *PROK2* [4].

Injeções de Bv8 (proteína homóloga da *PROK2* no sapo) no ventrículo lateral inibiu a ingestão alimentar em ratos, sugerindo um papel deste sistema na regulação do apetite [86]. Dois pacientes brasileiros com mutações no gene *PROKR2* eram obesos (**Tabela 8, pacientes 6 e 7**). Curiosamente, estes pacientes são portadores da mesma mutação p.L173R do *PROKR2*, mas não há relato de obesidade nos outros pacientes com esta mutação e tampouco de maior frequência de obesidade em pacientes com mutações nos genes *PROK2* e *PROKR2* [4, 93, 100]. O índice de massa corporal dos pacientes hipogonádicos com e sem mutações nos genes *PROK2* e *PROKR2* foi semelhante [100].

Um paciente com mutação no gene *PROK2* apresentou *pectus excavatum* e um paciente com mutação no gene *PROKR2* apresentou palato alto. As manifestações clínicas associadas a mutações no gene *KAL1* e *FGFR1*, como agenesia renal e alterações de palato, são raramente encontradas nos pacientes com mutações nos genes que codificam as proteínas do sistema da procinetina 2. Quatro casos de pacientes

apresentado palato alto [100] e sincinesia bimanual [98], três casos de pacientes apresentando perda auditiva [98, 100], dois casos com *pectus excavatum* [98] e um com hipodontia [100] foram descritos.

O presente estudo trouxe novos conhecimentos sobre a fisiologia do PROKR2 e as bases moleculares do hipogonadismo hipogonadotrófico isolado. A arginina localizada na primeira alça intracelular do PROKR2 é essencial para os processos de glicosilação e maturação. As mutações inativadoras nos genes que codificam as proteínas do sistema das procinetinas 2 causam o HHI quando presentes em homozigose. O verdadeiro papel das mutações em heterozigose ainda está para ser esclarecido. Atualmente, o papel de outras proteínas, chaperonas, fatores de transcrição ou outros segundo mensageiros que interagem ou mediam o efeito molecular do PROKR2 não são conhecidos. Análise da metilação, rastreamento de mutações nas regiões intrônicas e promotoras dos genes *PROK2* e *PROKR2* assim como a descoberta de novos genes envolvidos com HHI contribuirão para a compreensão da herança genética destes genes.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Descrevemos a mutação inativadora p.G100fsX121 do gene *PROK2* em homozigose em dois irmãos com síndrome de Kallmann.
- ✓ Descrevemos duas novas mutações no gene *PROKR2*, p.R80C e p.Y140X, associadas com o fenótipo de síndrome de Kallmann.
- ✓ A mutação p.Y140X identificada em homozigose resulta em um receptor truncado no terceiro domínio transmembrana com provável perda de função do receptor.
- ✓ A haploinsuficiência dos genes *PROK2* e *PROKR2* não foi suficiente para causar o fenótipo de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado.
- ✓ A mutação p.R80C localizada na primeira alça intracelular resulta na perda de função do receptor por interferir no processo de maturação pós-translacional e na diminuição da expressão do *PROKR2*. Essa mutação não exerce efeito dominante negativo

7 REFERÊNCIAS

1. Seminara, S.B., F.J. Hayes, and W.F. Crowley, Jr., Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. *Endocr Rev*, 1998. 19(5):521-39.
2. Seminara, S.B., et al., Genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest*, 2000. 23(9):560-5.
3. Tsai, P.S. and J.C. Gill, Mechanisms of disease: Insights into X-linked and autosomal-dominant Kallmann syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2006. 2(3):160-71.
4. Dode, C., et al., Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet*, 2006. 2(10):e175.
5. Pitteloud, N., et al., Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest*, 2007. 117(2):457-63.
6. Bianco, S.D. and U.B. Kaiser, The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol*, 2009. 5(10):569-76.
7. Pitteloud, N., et al., Reversible kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(3):1317-22.
8. Sinisi, A.A., et al., Homozygous mutation in the prokineticin-receptor2 gene (Val274Asp) presenting as reversible Kallmann syndrome and persistent oligozoospermia: case report. *Hum Reprod*, 2008. 23(10):2380-4.
9. Raivio, T., et al., Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med*, 2007. 357(9):863-73.

10. Maestre de San Juan, A., Teratologia: falta total de los nervios olfactorios con anosmia en un individuo en quien existia una atrofia congenita de los testiculos y miembro viril. *El Siglo Medico-Legal Bulletin*, 1856. 3:211-21.
11. Kallmann, F., W. Schoenfeld, and S. Barrera, The genetic aspects of primary eunuchoidism. *Am J Ment Def*, 1944. 158:203-36.
12. De Morsier, G., Studies in cranio-encephalic dysraphia. I. Agenesis of the olfactory lobe (lateral telencephaloschisis) and of the callous and anterior commissures (median telencephaloschisis); olfacto-genital dysplasia. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr*, 1954. 74(1-2):309-61.
13. Schwanzel-Fukuda, M. and D.W. Pfaff, Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*, 1989. 338(6211):161-4.
14. Wray, S., Development of luteinizing hormone releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol*, 2001. 13(1):3-11.
15. Rugarli, E.I., et al., Expression pattern of the Kallmann syndrome gene in the olfactory system suggests a role in neuronal targeting. *Nat Genet*, 1993. 4(1):19-26.
16. Rugarli, E.I., Kallmann syndrome and the link between olfactory and reproductive development. *American Journal of Human Genetics*, 1999. 65(4):943-8.
17. Pawlowitzki, I.H., et al., Estimating frequency of Kallmann syndrome among hypogonadic and among anosmic patients. *Am J Med Genet*, 1987. 26(2):473-9.
18. Ribeiro, R.S. and J. Abucham, [Kallmann syndrome: a historical [corrected] clinical and molecular review]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2008. 52(1):8-17.
19. Ballabio, A., et al., Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989. 86(24):10001-5.
20. Ballabio, A., et al., X-linked ichthyosis, due to steroid sulphatase deficiency, associated with Kallmann syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia): linkage relationships with Xg and cloned DNA sequences from the distal short arm of the X chromosome. *Human Genetics*, 1986. 72(3):237-40.

21. Meitinger, T., et al., Definitive localization of X-linked Kallman syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia) to Xp22.3: close linkage to the hypervariable repeat sequence CRI-S232. *American Journal of Human Genetics*, 1990. 47(4):664-9.
22. Bick, D., et al., Male infant with ichthyosis, Kallmann syndrome, chondrodysplasia punctata, and an Xp chromosome deletion. *Am J Med Genet*, 1989. 33(1):100-7.
23. Schwanzel-Fukuda, M., D. Bick, and D.W. Pfaff, Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res*, 1989. 6(4):311-26.
24. Soussi-Yanicostas, N., et al., Anosmin-1 underlying the X chromosome-linked Kallmann syndrome is an adhesion molecule that can modulate neurite growth in a cell-type specific manner. *J Cell Sci*, 1998. 111 (Pt 19):2953-65.
25. Soussi-Yanicostas, N., et al., Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell*, 2002. 109(2):217-28.
26. Franco, B., et al., A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature*, 1991. 353(6344):529-36.
27. Hardelin, J.P. and C. Dode, The complex genetics of Kallmann syndrome: KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROK2, et al. *Sex Dev*, 2008. 2(4-5):181-93.
28. Kim, S.H., et al., Diversity in fibroblast growth factor receptor 1 regulation: learning from the investigation of Kallmann syndrome. *J Neuroendocrinol*, 2008. 20(2):141-63.
29. Oliveira, L.M., et al., The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(4):1532-8.
30. Salenave, S., et al., Kallmann's syndrome: a comparison of the reproductive phenotypes in men carrying KAL1 and FGFR1/KAL2 mutations. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93(3):758-63.

31. Legouis, R., et al., The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell*, 1991. 67(2):423-35.
32. Dode, C., et al., Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet*, 2003. 33(4):463-5.
33. Muenke, M., et al., A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nat Genet*, 1994. 8(3):269-74.
34. Groth, C. and M. Lardelli, The structure and function of vertebrate fibroblast growth factor receptor 1. *Int J Dev Biol*, 2002. 46(4):393-400.
35. Gonzalez-Martinez, D., Y. Hu, and P.M. Bouloux, Ontogeny of GnRH and olfactory neuronal systems in man: novel insights from the investigation of inherited forms of Kallmann's syndrome. *Front Neuroendocrinol*, 2004. 25(2):108-30.
36. Pitteloud, N., et al., Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(16):6281-6.
37. Pitteloud, N., et al., Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause Kallmann syndrome with a wide spectrum of reproductive phenotypes. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. 254-255:60-9.
38. Trarbach, E.B., et al., Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91(10):4006-12.
39. Xu, N., et al., A mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene causes fully penetrant normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. 92(3):1155-8.
40. Zhang, X., et al., Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. 281(23):15694-700.
41. Garel, S., K.J. Huffman, and J.L. Rubenstein, Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in Fgf8 hypomorphic mutants. *Development*, 2003. 130(9):1903-14.

42. Trainor, P.A., L. Ariza-McNaughton, and R. Krumlauf, Role of the isthmus and FGFs in resolving the paradox of neural crest plasticity and prepatterning. *Science*, 2002. 295(5558):1288-91.
43. Meyers, E.N., M. Lewandoski, and G.R. Martin, An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nature Genetics*, 1998. 18(2):136-41.
44. Falardeau, J., et al., Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest*, 2008. 118(8):2822-31.
45. Trarbach, E.B., et al., Nonsense mutations in FGF8 gene causing different degrees of human gonadotropin-releasing deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 95(7):3491-6.
46. Miura, K., J.S. Acierno, Jr., and S.B. Seminara, 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*, 2004. 49(5):265-8.
47. Jongmans, M.C., et al., CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin Genet*, 2009. 75(1):65-71.
48. Kim, H.G., et al., Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet*, 2008. 83(4):511-9.
49. de Roux, N., et al., Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(19):10972-6.
50. Seminara, S.B., et al., The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*, 2003. 349(17):1614-27.
51. Ohtaki, T., et al., Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2001. 411(6837):613-7.

-
52. Irwig, M.S., et al., Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 2004. 80(4):264-72.
 53. Shahab, M., et al., Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(6):2129-34.
 54. Semple, R.K. and A. Kemal Topaloglu, The recent genetics of hypogonadotropic hypogonadism - novel insights and new questions. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009.
 55. Pinto, F.M., et al., mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *European Journal of Pharmacology*, 2004. 494(2-3):233-9.
 56. Takeda, Y., et al., Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991. 179(3):1232-40.
 57. Topaloglu, A.K., et al., TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet*, 2009. 41(3):354-8.
 58. Guran, T., et al., Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. 94(10):3633-9.
 59. Gianetti, E., et al., TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2010. 95(6):2857-67.
 60. Young, J., et al., TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 95(5):2287-95.
 61. de Roux, N., et al., A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med*, 1997. 337(22):1597-602.

62. Costa, E.M., et al., Two novel mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in Brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(6):2680-6.
63. Bedecarrats, G.Y. and U.B. Kaiser, Mutations in the human gonadotropin-releasing hormone receptor: insights into receptor biology and function. *Semin Reprod Med*, 2007. 25(5):368-78.
64. Bouligand, J., et al., Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med*, 2009. 360(26):2742-8.
65. Chan, Y.M., et al., GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(28):11703-8.
66. Katsanis, N., The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Human Molecular Genetics*, 2004. 13 Spec No 1:R65-71.
67. Canto, P., et al., Genetic analysis in patients with Kallmann syndrome: coexistence of mutations in prokineticin receptor 2 and KAL1. *J Androl*, 2009. 30(1):41-5.
68. Sykiotis, G.P., et al., Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010.
69. Li, M., et al., Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol*, 2001. 59(4):692-8.
70. Hoogerwerf, W.A., Prokineticin 1 inhibits spontaneous giant contractions in the murine proximal colon through nitric oxide release. *Neurogastroenterol Motil*, 2006. 18(6):455-63.
71. LeCouter, J., et al., The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(5):2685-90.

72. Bullock, C.M., J.D. Li, and Q.Y. Zhou, Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol Pharmacol*, 2004. 65(3):582-8.
73. Ngan, E.S. and P.K. Tam, Prokineticin-signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(9):1679-84.
74. Chen, J., et al., Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol*, 2005. 67(6):2070-6.
75. Zhang, C., K.K. Truong, and Q.Y. Zhou, Efferent projections of prokineticin 2 expressing neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus. *PLoS One*, 2009. 4(9):e7151.
76. Masuda, Y., et al., Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 293(1):396-402.
77. Lin, D.C., et al., Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 2002. 277(22):19276-80.
78. Hoffmann, P., J.J. Feige, and N. Alfaidy, Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation. *Placenta*, 2007. 28(10):1049-58.
79. Wechselberger, C., et al., The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes. *FEBS Lett*, 1999. 462(1-2):177-81.
80. LeCouter, J., et al., Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*, 2001. 412(6850):877-84.
81. Soga, T., et al., Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1579(2-3):173-9.
82. Mollay, C., et al., Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*, 1999. 374(2):189-96.

-
83. LeCouter, J., et al., Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(48):16813-8.
 84. Cheng, M.Y., et al., Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 2002. 417(6887):405-10.
 85. Li, J.D., et al., Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J Neurosci*, 2006. 26(45):11615-23.
 86. Negri, L., et al., Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, modulates ingestive behaviour in rats. *Br J Pharmacol*, 2004. 142(1):181-91.
 87. Zhou, Q.Y. and M.Y. Cheng, Prokineticin 2 and circadian clock output. *Febs J*, 2005. 272(22):5703-9.
 88. Matsumoto, S., et al., Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(11):4140-5.
 89. Ng, K.L., et al., Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science*, 2005. 308(5730):1923-7.
 90. Pitteloud, N., et al., Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(44):17447-52.
 91. Prosser, H.M., A. Bradley, and M.A. Caldwell, Olfactory bulb hypoplasia in Prokr2 null mice stems from defective neuronal progenitor migration and differentiation. *Eur J Neurosci*, 2007. 26(12):3339-44.
 92. Abreu, A.P., et al., Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93(10):4113-8.
 93. Monnier, C., et al., PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum Mol Genet*, 2009. 18(1):75-81.

-
94. Abreu, A.P., U.B. Kaiser, and A.C. Latronico, The role of prokineticins in the pathogenesis of hypogonadotropic hypogonadism. *Neuroendocrinology*, 2010. 91(4):283-90.
 95. Doty, R.L., et al., University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic. *Laryngoscope*, 1984. 94(2 Pt 1):176-8.
 96. den Dunnen, J.T. and S.E. Antonarakis, Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*, 2000. 15(1):7-12.
 97. Zhang, C., et al., Prokineticin 2 is a target gene of proneural basic helix-loop-helix factors for olfactory bulb neurogenesis. *J Biol Chem*, 2007. 282(10):6917-21.
 98. Cole, L.W., et al., Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93(9):3551-9.
 99. Leroy, C., et al., Biallelic mutations in the prokineticin-2 gene in two sporadic cases of Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2008. 16(7):865-8.
 100. Sarfati, J., et al., A Comparative Phenotypic Study of Kallmann Syndrome Patients Carrying Monoallelic and Biallelic Mutations in the Prokineticin 2 or Prokineticin Receptor 2 Genes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009.
 101. Schulein, R., et al., A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. *Mol Pharmacol*, 1998. 54(3):525-35.
 102. Wacker, J.L., et al., Disease-causing mutation in GPR54 reveals the importance of the second intracellular loop for class A G-protein-coupled receptor function. *J Biol Chem*, 2008. 283(45):31068-78.
 103. Arora, K.K., et al., Mediation of cyclic AMP signaling by the first intracellular loop of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem*, 1998. 273(40):25581-6.

-
104. Duvernay, M.T., et al., A Single Conserved Leucine Residue on the First Intracellular Loop Regulates ER Export of G Protein-Coupled Receptors. *Traffic*, 2009.
 105. Roy, S., B. Perron, and N. Gallo-Payet, Role of asparagine-linked glycosylation in cell surface expression and function of the human adrenocorticotropin receptor (melanocortin 2 receptor) in 293/FRT cells. *Endocrinology*, 2010. 151(2):660-70.
 106. Duvernay, M.T., et al., A single conserved leucine residue on the first intracellular loop regulates ER export of G protein-coupled receptors. *Traffic*, 2009. 10(5):552-66.
 107. Cheng, M.Y., et al., Regulation of prokineticin 2 expression by light and the circadian clock. *BMC Neurosci*, 2005. 6:17.
 108. Prosser, H.M., et al., Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(2):648-53.

APÊNDICE

JCEM

THE JOURNAL
OF CLINICAL
ENDOCRINOLOGY
& METABOLISM

Loss-of-Function Mutations in the Genes Encoding Prokineticin-2 or Prokineticin Receptor-2 Cause Autosomal Recessive Kallmann Syndrome

Ana Paula Abreu, Ericka Barbosa Trarbach, Margaret de Castro, Elaine Maria Frade Costa, Beatriz Versiani, Maria Tereza Matias Baptista, Heraldo Mendes Garmes, Berenice Bilharinho Mendonca and Ana Claudia Latronico

J. Clin. Endocrinol. Metab. 2008 93:4113-4118 originally published online Aug 5, 2008; , doi: 10.1210/jc.2008-0958

To subscribe to *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* or any of the other journals published by The Endocrine Society please go to: <http://jcem.endojournals.org/subscriptions/>

Loss-of-Function Mutations in the Genes Encoding Prokineticin-2 or Prokineticin Receptor-2 Cause Autosomal Recessive Kallmann Syndrome

Ana Paula Abreu, Ericka Barbosa Trarbach, Margaret de Castro, Elaine Maria Frade Costa, Beatriz Versiani, Maria Tereza Matias Baptista, Heraldo Mendes Garmes, Berenice Bilharinho Mendonca, and Ana Claudia Latronico

Developmental Endocrinology Unit (A.P.A., E.B.T., E.M.F.C., B.B.M., A.C.L.), Laboratory of Hormone and Molecular Genetic Laboratory of Medical Investigation-42, Clinical Hospital, Medical School, Sao Paulo University, 05403-900 Sao Paulo, Brazil; Department of Internal Medicine (M.d.C., B.V.), Clinical Hospital, Medical School of Ribeirao Preto University of Sao Paulo, 14049-900 Ribeirao Preto, Brazil; and Department of Internal Medicine (M.T.M.B., H.M.G.), Clinical Hospital, State University of Campinas, Campinas, 13083-970 Sao Paulo, Brazil

Context: Physiological activation of the prokineticin pathway has a critical role in olfactory bulb morphogenesis and GnRH secretion in mice.

Objective: To investigate *PROK2* and *PROKR2* mutations in patients with hypogonadotropic hypogonadism (HH) associated or not with olfactory abnormalities.

Design: We studied 107 Brazilian patients with HH (63 with Kallmann syndrome and 44 with normosmic HH) and 100 control individuals. The coding regions of *PROK2* and *PROKR2* were amplified by PCR followed by direct automatic sequencing.

Results: In *PROK2*, two known frameshift mutations were identified. Two brothers with Kallmann syndrome harbored the homozygous p.G100fsX121 mutation, whereas one male with normosmic HH harbored the heterozygous p.I55fsX56 mutation. In *PROKR2*, four distinct mutations (p.R80C, p.Y140X, p.L173R, and p.R268C) were identified in five patients with Kallmann syndrome and in one patient with normosmic HH. These mutations were not found in the control group. The p.R80C, p.L173R, and p.R268C missense mutations were identified in the heterozygous state in the HH patients and in their asymptomatic first-degree relatives. In addition, no mutations of *FGFR1*, *KAL1*, *GnRHR*, *KISS-1*, or *GPR54* were identified in these patients. Notably, the new nonsense mutation (p.Y140X) was identified in the homozygous state in an anosmic boy with micropenis, bilateral cryptorchidism, and high-arched palate. His asymptomatic parents were heterozygous for this severe defect.

Conclusion: We expanded the repertoire of *PROK2* and *PROKR2* mutations in patients with HH. In addition, we show that *PROKR2* haploinsufficiency is not sufficient to cause Kallmann syndrome or normosmic HH, whereas homozygous loss-of-function mutations either in *PROKR2* or *PROK2* are sufficient to cause disease phenotype, in accordance with the *Prokr2* and *Prok2* knockout mouse models. (*J Clin Endocrinol Metab* 93: 4113–4118, 2008)

Kallmann syndrome is defined by the association of hypogonadotropic hypogonadism (HH) with olfactory abnormalities (anosmia or hyposmia) (1). Anosmia/hyposmia is secondary to the absence or hypoplasia of the olfactory bulbs and

tracts, whereas HH results from the impaired secretion of hypothalamic GnRH (1–3). Additional features in Kallmann patients include midline craniofacial defects (high-arched palate and cleft lip/palate) dental agenesis, bimanual synkinesis,

0021-972X/08/\$15.00/0

Printed in U.S.A.

Copyright © 2008 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2008-0958 Received May 2, 2008. Accepted July 28, 2008.

First Published Online August 5, 2008

Abbreviations: BMI, Body mass index; HH, hypogonadotropic hypogonadism; *PROKR2*, prokineticin receptor-2.

renal agenesis, sensorineural hearing loss, and oculomotor abnormalities (4).

Kallmann syndrome is a heterogeneous genetic condition that is more prevalent in males. Although most of the cases appear to be sporadic, X-linked, autosomal dominant, and recessive transmissions have been reported (1, 4). Two distinct genes, Kallmann syndrome 1 gene (*KAL1*) and the fibroblast growth factor receptor 1 gene (*FGFR1*), have been implicated in the X chromosome-linked form and an autosomal dominant form of the disease, respectively (4). However, the molecular basis of Kallmann syndrome was elucidated in only 10–20% of the reported cases (4).

New promising candidate loci for Kallmann syndrome include genes with potential influence on GnRH neuron migration and on olfactory bulb morphogenesis. Matsumoto *et al.* (5) have shown that the activation of the prokineticin receptor-2 (*PROKR2*), a G protein-coupled receptor, is essential for the normal development of the olfactory bulbs and sexual maturation. Mice homozygous for null mutations in *Prokr2* recapitulate the human phenotype of Kallmann syndrome, exhibiting severe atrophy of the reproductive system and hypoplastic olfactory bulb. A similar phenotype has been reported in mice lacking one of the *Prokr2* ligands, prokineticin-2 (*Prok2*) (6).

Mutations in *PROK2* and *PROKR2* have been identified in patients with Kallmann syndrome and normosmic HH; most of these patients harbored missense mutations in the heterozygous state (7). Recently, homozygous loss-of-function mutations of *PROK2* were described in families with HH, suggesting an autosomal recessive inheritance disorder (6, 8). In the present study, we investigated *PROK2* and *PROKR2* in a cohort of Brazilian patients with HH with or without olfactory abnormalities. In addition, we performed familial segregation analyses of *PROKR2* defects associated with Kallmann syndrome to elucidate the mode of inheritance of this condition.

Patients and Methods

One hundred seven unrelated Brazilian patients (87 men and 20 women) with HH were selected from three University Institutions of Sao Paulo, Brazil. Informed and written consent was obtained from all patients, and the study was approved by the ethical committee of each institution. Sixty-three patients had Kallmann syndrome, and 44 patients had normosmic HH. Twenty-four patients (19 with Kallmann syndrome and five with normosmic HH) had a positive family history of HH and/or olfactory abnormalities. *KAL1* and *FGFR1* had been previously studied in this cohort of Kallmann syndrome patients, and GnRH receptor (*GnRHR*), *FGFR1*, *GPR54*, and *KISS-1* had been studied in the normosmic HH group (9–12). Sixteen of 107 patients carried inactivating mutations in *KAL1* or *FGFR1*.

Idiopathic HH was documented based on the following criteria: clinical signs of hypogonadism, prepubertal or low testosterone or estradiol levels for age, low or inappropriately normal gonadotropin levels, normal baseline and stimulated levels of the other anterior pituitary hormones, and normal hypothalamic-pituitary imaging. Olfactory tests (Smell Identification Test: Philadelphia, PA, or Alcohol Sniff Test, San Diego, CA) and magnetic resonance imaging of the hypothalamic-pituitary region, as well as of the olfactory bulbs and tracts, were evaluated in all patients (13). Body mass index (BMI: body weight in kilograms divided by the squared stature in meters) was assessed in all patients. Normal weight was defined as BMI from 20–24.9 kg/m², overweight from 25–29.9 kg/m², and obesity 30 kg/m² or more.

One hundred adult individuals of both sexes with normal sexual development at the appropriate chronological age and no history of abnormal sense of smell were used as the control group.

Hormone assays

Serum LH, FSH, testosterone, and estradiol levels were measured by fluorometric assays (Delfia, Wallac, Inc., Turku, Finland) in the majority of the studied patients. The coefficient of variation was 5% or less for all assays. The lower limits of detection were 0.6 IU/liter for LH, 1.0 IU/liter for FSH, 13 pg/ml (47 pmol/liter) for estradiol, and 19 ng/dl (0.6 nmol/liter) for testosterone. Serum LH and FSH were measured at –15, 0, 15, 30, 45, and 60 min after the iv administration of 100 µg GnRH. The results were compared with previously reported normal values established in our population (14).

DNA analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using standard procedures. The entire coding regions of *PROK2* (GenBank accession number M021935) and *PROKR2* (NM_144773) were amplified by PCR and automatically sequenced. The four exons of *PROK2* were amplified using primers and conditions previously described (7). The PCR amplification of the two exons of the *PROKR2* was performed using the following primers: 1 forward 5'-TGAAAGAGCA-GAAGGTCTGGA-3' and 1 reverse 5'-TCCTCATTTAGGCTCTGACAGG-3', 2 forward 5'-GATTCACGTGTGCCACTGCTT-3' and 2 reverse 5'-CCAGTACTCAGAGCATCACCC-3'. The PCR amplifications were performed in 25-µl reaction mixtures containing 200–500 ng genomic DNA, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.6 pmol each primer, 1× PCR buffer, and 1 U *Go Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI). Amplification was performed for 35 cycles. The PCR products were electrophoresed on 1.0% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed.

The PCR products of both *PROK2* and *PROKR2* were pretreated with an enzymatic combination of exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase (U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH) and directly sequenced using the BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI PRISM 310 automatic sequencer (PerkinElmer Cetus, Shelton, CT). All mutations identified were confirmed in three independent PCR products and by sequencing both DNA strands.

Results

PROK2 analysis

We identified a homozygous T insertion between nucleotides 297 and 298 (c.297_298insT) within exon 4 of *PROK2*, leading to a previously described p.G100fsX121 frameshift mutation in two brothers with Kallmann syndrome (Table 1, patients 1 and 2) (7). Their parents were apparently nonconsanguineous. The proband was a 23-yr-old male with gynecomastia, micropenis, and anosmia. Hormonal profile revealed low testosterone levels and prepubertal basal and GnRH-stimulated gonadotropins. His brother also had anosmia and failed to go through puberty. Their asymptomatic parents were not available for molecular studies.

We also identified a heterozygous single-base-pair deletion (c.163delA) within exon 2 of *PROK2*, resulting in a previously reported p.I55fsX56 frameshift mutation in a 17-yr-old patient with micropenis and normal sense of smell (6, 8). His hormonal profile revealed prepubertal testosterone and gonadotropin levels (patient 3, Table 1).

TABLE 1. Clinical and hormonal features of patients with HH (seven Kallmann syndrome and two normosmic HH) associated with *PROK2* or *PROKR2* mutations

Case	Age (yr)	Sex	Diagnosis	Associated clinical features	BMI (kg/m ²)	LH (U/liter)		FSH (U/liter)		E2 (pmol/liter)	T (nmol/liter)	cDNA	Mutation		Status
						Basal	Peak	Basal	Peak				Protein		
PROK2															
1 ^a	23	M	KS		19	0.6	3.8	1.0	1.5		1.9	c.297_298insT	p.G100fsX121		Homozygote
2 ^a	18	M	KS	Pectus excavatum	17	<0.6	3.5	<1.0	3.0		1.4	c.297_298insT	p.G100fsX121		Homozygote
3	17	M	nHH		21	0.1	1.8	0.4	2.4		0.6	c.163delA	p.I55fsX56		Heterozygote
PROKR2															
4	21	F	KS		24	0.8	15	1.9	7.5	<47		c.238C→T	p.R80C		Heterozygote
5	14	M	KS	High arched palate	20	<0.6		<1.0			0.6	c.420C→G	p.Y140X		Homozygote
6	50	F	KS	Metabolic syndrome	32	<0.6		<1.0		141		c.518T→G	p.L173R		Heterozygote
7	52	M	KS	Obesity	31	0.6		<1.0			4.6	c.518T→G	p.L173R		Heterozygote
8	15	M	KS	High arched palate and obesity	32	0.6	1.2	<1.0	2.5		0.6	c.802C→T	p.R268C		Heterozygote
9	42	M	nHH		25	9.7 ^b	22 ^b	6 ^b	14 ^b		7.8 ^b	c.802C→T	p.R268C		Heterozygote

E2, Estradiol; F, female; KS, Kallmann syndrome; M, male; nHH, normosmic HH; T, testosterone. Normal values measured by immunofluorometric assay are as follows: testosterone, 9.3–33 nmol/liter; E2, 80–770 pmol/liter; basal LH, 1.4–9.2 U/liter; basal FSH, <1.0–10.5 U/liter; and GnRH-stimulated LH, 12–29.7 U/liter, and FSH, 2.9–7.8 U/liter.

^a Siblings.

^b Normal values measured by RIA as follows: testosterone, 12–38 nmol/liter; basal LH, 1.7–3.0 U/liter; basal FSH, <1.0–6.6 U/liter; and GnRH-stimulated LH, >25 U/liter, and FSH, 3–26 U/liter.

PROKR2 analysis

We identified four different defects, including one nonsense and three missense mutations, in six unrelated patients with HH (patients 4–9, Table 1). Two of these mutations, c.238C→T (p.R80C) and c.420C→G (p.Y140X), are new *PROKR2* alterations. The p.R80C mutation, located in the first intracellular loop of the receptor, was identified in the heterozygous state in a 21-yr-old anosmic female patient with primary amenorrhea and lack of spontaneous breast development. Her basal and GnRH-stimulated gonadotropin levels were at normal pubertal range, but associated with basal undetectable estradiol levels (patient 4, Table 1). Her mother and an 18-yr-old sister carried the same mutation in the heterozygous state (Fig. 1), and both had normal pubertal development and olfactory tests.

The p.Y140X mutation, located in the third transmembrane helix of the receptor, was identified in homozygous state in a 14-yr-old anosmic boy with micropenis, bilateral cryptorchidism, and high arched palate (patient 5, Table 1). Consanguinity was denied. His basal gonadotropin and testosterone levels were

at the prepubertal range. His parents were normosmic and carried the same mutation in the heterozygous state (Fig. 1).

One adult female patient (patient 6, Table 1), who carried the p.L173R mutation in the heterozygous state, had anosmia, primary amenorrhea, and lack of breast development. Subsequently, she developed metabolic syndrome characterized by obesity, type II diabetes mellitus, chronic arterial hypertension, and hypertriglyceridemia. Her mother did not have the mutation (Fig. 1). This mutation was also identified in an anosmic and obese 52-yr-old patient who referred absence of pubertal development until 25 yr of age (patient 7, Table 1).

The p.R268C mutation was identified in the heterozygous state in a 15-yr-old boy with anosmia, micropenis, and cryptorchidism. His basal gonadotropin and testosterone levels were at the prepubertal range (patient 8, Table 1). His asymptomatic father was also heterozygous for the mutation (Fig. 1). This mutation was also identified in a 42-yr-old male patient with normosmic HH (patient 9, Table 1). His testosterone levels were in the prepubertal range with normal basal gonadotropin levels measured by RIA. A GnRH stimulation test revealed prepubertal gonadotropin response.

None of the patients who harbored *PROK2* or *PROKR2* defects had mutations in *KAL1*, *FGFR1*, *GnRHR*, *GPR54*, or *KISS-1*.

Other molecular findings

One known intronic *PROK2* polymorphism (IVS3 + 14G→A) and three known coding-synonymous *PROKR2* polymorphisms (c.465C→T, c.525C→G, and c.585G→C) were identified in patients with Kallmann and normosmic HH and normal controls at similar frequencies to those described in the Ensembl database.

Discussion

Prokinetins are secreted bioactive proteins that regulate diverse biological processes, including olfactory bulb morphogenesis and reproduction (5, 15). Mutations in *PROKR2* and its ligand were first described by Dodé *et al.* (7), who studied a cohort of 192 patients with Kallmann syndrome. Ten *PROKR2* (one frameshift and nine missense mutations) and four *PROK2* defects were identified in 14 and four patients with Kallmann syndrome, respectively (7).

In the current study, we identified two known frameshift mutations (p.G100fsX121 and p.I55fsX56) in *PROK2* and four non-synonymous mutations (p.R80C; p.Y140X; p.L173R and p.R268C) in *PROKR2* from a cohort of 107 Brazilian patients with sporadic and familial HH. The p.R80C and

FIG. 1. Pedigrees of patients 4, 5, 6, and 8 showing segregation of the heterozygous (p.R80C, p.L173R, and p.R268C) and homozygous (p.Y140X) *PROKR2* mutations. The proband is identified by the arrow. Filled symbols denote HH and anosmia. Circles denote females; squares denote males. Question marks denote unknown genotype. The mutated DNA sequences are shown below the corresponding individual. The homozygous p.Y140X mutation was identified in patient 5, whereas his asymptomatic parents carried this defect in the heterozygous state.

p.Y140X mutations had not been previously reported. These *PROKR2* mutations were not identified in 200 alleles from control individuals. All identified mutations were located at highly conserved amino acids across species, suggesting a critical role of these residues in the normal *PROK2* signaling.

The homozygous p.G100fsX121 mutation of *PROK2* was identified in two Brazilian brothers with Kallmann syndrome, whereas the heterozygous p.I55fsX56 mutation was identified in a normosmic HH patient. These two *PROK2* mutations have been previously described in American and French studies (6, 8). Interestingly, the p.I55fsX56 mutation was previously described in the homozygous state in three Portuguese siblings, two brothers with Kallmann syndrome and their sister with normosmic HH (6). Another asymptomatic brother was a carrier of this mutation in the heterozygous state. *In vitro* analysis of this truncated protein revealed lack of bioactivity in a CHO cell line that stably expressed *PROKR2* (6).

The three heterozygous missense mutations of *PROKR2* (p.R80C, p.L173R, and p.R268C) were identified in four patients with Kallmann syndrome. The heterozygous p.R268C mutation was also identified in a normosmic male patient with HH. Two of these mutations (p.L173R and p.R268C) had been previously described (7). Remarkably, three first-degree relatives of two patients with Kallmann syndrome also carried the p.R80C and p.R268C mutations of *PROKR2* in the heterozygous state (Fig. 1). These asymptomatic carriers advocate that *PROKR2* haploinsufficiency is not sufficient to cause Kallmann syndrome phenotype. Potential cryptic mutations within the regulatory or intronic regions affecting the other allele of *PROKR2* gene could, however, result in a complete loss of function of the protein in affected individuals.

Two families with a phenotypic variability harboring *FGFR1* missense mutations associated with *NELF* or *GnRHR* mutations have recently been described (16). Similarly, Dodé *et al.* (7) described a patient with Kallmann syndrome who carried a heterozygous p.L173R mutation in *PROKR2* and a missense mutation in *KAL1*. Therefore, digenic models could account for some of the phenotypic heterogeneity seen in Kallmann syndrome and normosmic HH (7, 16). Nevertheless, previous analyses of *FGFR1*, *KAL1*, *GnRHR*, *GPR5*, or *KISS-1* in the Brazilian patients did not reveal any additional abnormalities (9–12, 17).

Interestingly, a novel homozygous nonsense *PROKR2* mutation (p.Y140X), located in the third transmembrane helix of the receptor was identified in an anosmic boy with micropenis, bilateral cryptorchidism and high arched palate. This p.Y140X mutation probably results in a *PROKR2* with complete loss of function through the generation of an aberrant transcript that can be unstable or encodes for a truncated protein, lacking the carboxyl-terminal domain. The parents of this boy, who harbored the same nonsense mutation in the heterozygous state, had had normal pubertal development, spontaneous fertility, and no olfactory abnormalities. This further supports the idea that *PROKR2* haploinsufficiency is not sufficient to cause disease phenotype.

Body weight and reproduction have been linked for decades, but the neuroendocrine circuits that serve as convergence points

between these two systems are not completely identified (18). Here, we observed that three of the five Kallmann syndrome patients with *PROKR2* mutations were obese and one 50-yr-old female patient who carried the heterozygous p.L173R mutation developed metabolic syndrome. Remarkably, Dodé *et al.* (7) reported a patient with Kallmann syndrome carrying the heterozygous p.R73C mutation of *PROK2*, who presented marked obesity and suffered from a severe sleep disorder. Indeed, the association between the *PROK/PROKR2* system and obesity has been previously demonstrated in rodents (19). The injection of a prokineticin homolog into the arcuate nucleus of rat brains, a region with high *PROKR2* expression, leads to the suppression of diurnal, nocturnal, deprivation-induced and neuropeptide Y-stimulated feeding, indicating that the activation of this system results in an anorexigenic response (19).

We expanded the repertoire of mutations of *PROK2* and *PROKR2* in patients with HH with or without olfactory dysfunction. In addition, the presence of heterozygous deleterious mutations involving *PROKR2* in asymptomatic first-degree relatives indicates that the haploinsufficiency of these genes is not sufficient to cause HH phenotype. In contrast, the presence of biallelic deleterious mutations is apparently sufficient to cause Kallmann syndrome or normosmic HH.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Ana Claudia Latronico or Ana Paula Abreu, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Avenue Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 155, 2 degree andar Bloco 6, 05403-900 Sao Paulo, SP, Brasil. E-mail: anacl@usp.br or apaulabreu@yahoo.com.br.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grants 05/04726-0 and 06/56753-3 (to APA) and 07/50938-4 (to EBT) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Grants 300469/2005-5 (to ACL) and 300828/2005-5 (to BBM).

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

References

1. Seminara SB, Hayes FJ, Crowley Jr WF 1998 Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. *Endocr Rev* 19:521–539
2. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW 1989 Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338:161–164
3. Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW 1989 Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res* 6:311–326
4. Tsai PS, Gill JC 2006 Mechanisms of disease: insights into X-linked and autosomal-dominant Kallmann syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2:160–171
5. Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, 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 2006 Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor *PKR2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4140–4145
6. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley Jr WF 2007 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
7. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman A, Morgan G, Murat A, Toublanc JE, Wolczynski S, Delpech M, Petit C, Young J, Hardelin JP 2006 Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* 2:e175
 8. Leroy C, Fouveaut C, Leclercq S, Jacquemont S, Boullay HD, Lespinasse J, Delpech M, Dupont JM, Hardelin JP, Dodé C 2008 Biallelic mutations in the prokineticin-2 gene in two sporadic cases of Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* 16:865–868
 9. Versiani BR, Trarbach E, Koenigkam-Santos M, Dos Santos AC, Elias LL, Moreira AC, Latronico AC, de Castro M 2007 Clinical assessment and molecular analysis of GnRHR and KAL1 genes in males with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:173–179
 10. Trarbach EB, Monlleo IL, Porciuncula CGG, Fontes MI, Baptista MT, Hackel C 2004 Similar interstitial deletions of the KAL-1 gene in two Brazilian families with X-linked Kallmann syndrome. *Genet Mol Biol* 27:337–341
 11. Trarbach EB, Baptista MTM, Garmes HM, Hackel C 2005 Molecular analysis of *KAL-1*, *GnRH-R*, *NELF* and *EBF2* genes in a series of Kallmann syndrome and normosmic hypogonadotropic hypogonadism patients. *J Endocrinol* 187:361–368
 12. Costa EM, Bedecarrats GY, Mendonca BB, Arnhold IJ, Kaiser UB, Latronico AC 2001 Two novel mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in Brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2680–2686
 13. Davidson TM, Murphy C 1997 Rapid clinical evaluation of anosmia. The alcohol sniff test. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123:591–594
 14. Brito VN, Batista MC, Borges MF, Latronico AC, Kohek MB, Thirone AC, Jorge BH, Arnhold IJ, Mendonca BB 1999 Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3539–3544
 15. Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY 2005 Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 308:1923–1927
 16. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A, Plummer L, Hughes V, Seminara S, Cheng YZ, Li WP, Maccoll G, Eliseenkova AV, Olsen SK, Ibrahimi OA, Hayes FJ, Boepple P, Hall JE, Bouloux P, Mohammadi M, Crowley W 2007 Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest* 117:457–463
 17. Trarbach EB, Costa EM, Versiani B, de Castro M, Baptista MT, Garmes HM, de Mendonca BB, Latronico AC 2006 Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4006–4012
 18. Cerrato F, Seminara SB 2007 Human genetics of GPR54. *Rev Endocr Metab Disord* 8:47–55
 19. Negri L, Lattanzi R, Giannini E, De Felice M, Colucci A, Melchiorri P 2004 Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, modulates ingestive behaviour in rats. *Br J Pharmacol* 142:181–191

The Role of Prokineticins in the Pathogenesis of Hypogonadotropic Hypogonadism

Ana Paula Abreu^{a, b} Ursula B. Kaiser^b Ana Claudia Latronico^a

^aUnidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, LIM/42, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ^bDivision of Endocrinology, Diabetes and Hypertension, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Mass., USA

Key Words

Prokineticins · GnRH secretion · Kallmann syndrome · Hypogonadotropic hypogonadism

Abstract

The prokineticin system comprises two multifunctional secreted proteins, prokineticin-1 (PROK1) and prokineticin-2 (PROK2), and their cognate G protein-coupled receptors. The prokineticins were originally identified as endogenous regulators of gastrointestinal motility. Currently, these bioactive peptides are involved in a wide spectrum of biological functions, including angiogenesis, neurogenesis, circadian rhythms, nociception, hematopoiesis and immune response. Mice homozygous for null mutations in *Prokr2* or *Prok2* recapitulate the human phenotype of Kallmann syndrome, exhibiting severe atrophy of the reproductive system and hypoplastic olfactory bulbs. Indeed, the evidence from several naturally inactivating mutations in the *PROK2* and *PROKR2* genes in patients with Kallmann syndrome and normosmic hypogonadotropic hypogonadism also indicate the essential role of PROK2 in olfactory bulb morphogenesis and GnRH secretion in humans.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

The prokineticin system comprises two closely related proteins, prokineticin-1 (PROK1; also called EG-VEGF) and prokineticin-2 (PROK2; also called Bv8), and their cognate G protein-coupled receptors, PROKR1 and PROKR2 [1, 2]. Prokineticins are cysteine-rich secreted proteins that were originally identified as potent agents mediating gut motility in the digestive system, but were later shown to promote diverse biological functions, including normal development of the olfactory bulb and sexual maturation [1].

The mature forms of PROK1 and PROK2 consist of 86 and 81 amino acids, respectively [1]. These proteins are approximately 50% homologous to each other and share the identical amino terminal hexapeptide (AVITGA), which is crucial for their biological activities [2]. Both contain carboxyl-terminal cysteine-rich domains that form five disulfide bridges with conserved spacing. Substitutions, deletions and insertions to the conserved amino-terminal hexapeptide or mutations affecting selected cysteine residues in the carboxy-terminal domain result in prokineticins without biological activity [2].

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2010 S. Karger AG, Basel

Accessible online at:
www.karger.com/nen

Ana C. Latronico
Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar
155 2º andar Bloco 6, São Paulo, SP 05403 900 (Brasil)
Tel./Fax +55 11 30697519, E-Mail anacl@usp.br

PROK1, an angiogenic mitogen for endocrine gland vascular endothelium [3], is encoded by a small gene mapped on chromosome 1 (NCBI Gene ID: 84432). PROK2 is encoded by the *PROK2* gene on 3p13 and contains 4 exons (NCBI Gene ID: 60675). The most active form of PROK2 with 81 amino acids is encoded by the exons 1, 2 and 4. Molecular cloning analysis has further identified a long form of the PROK2 peptide, PROK2L, with 21 additional amino acids, encoded by all 4 exons of *PROK2* [4]. PROK1 and PROK2 are expressed in the adrenal gland, brain, testis, intestinal tract, heart, bone marrow and peripheral blood [5]. PROK1 is expressed in the ovary, uterus and placenta in response to hormonal changes across the menstrual cycle and during pregnancy [5, 6]. PROK2 exhibits circadian rhythmic expression in the suprachiasmatic nucleus [7, 8].

Prokineticin receptors belong to the family of G protein-coupled receptors. PROKR1 and PROKR2 show strong similarity in their primary structure (87% homology) [9–11]. PROK1 and PROK2 can bind and activate both receptors, although they exhibited a slightly higher binding affinity for PROKR2 when compared with PROKR1. PROK2 has the highest affinity for both receptors [9–11]. PROK2L displays strong receptor selectivity for PROKR1 over PROKR2 [2, 4]. Activation of prokineticin receptors, which couple to Gq protein, leads to mobilization of calcium, stimulation of phosphoinositide turnover and activation of p42/p44 MAPK signaling pathways [9–11]. The prokineticin receptors can also couple to Gi and Gs proteins [4, 12]. PROKR1 shows preferential distribution in the peripheral tissues, whereas PROKR2 shows relatively localized distribution in the central nervous system [9].

Prok2 and *Prokr2* are expressed in the ependymal and subependymal layers of the olfactory bulbs, preoptic area and median eminence in mice [13, 14]. It has been demonstrated that the prokineticins play an essential role in olfactory bulb morphogenesis [14], and this system may also be involved in the migration/survival of GnRH neurons.

Animal Models

The generation of *Prok2* and *Prokr2* knockout (KO) mice demonstrated the importance of these genes in normal olfactory bulb development and sexual maturation. Both *Prok2* and *Prokr2* KO mice displayed defects in the olfactory bulb, with *Prok2* KO mice showing reduced olfactory bulb size, loss of normal olfactory bulb architec-

ture and accumulation of neuronal progenitors in the rostral migratory stream [14]. *Prokr2* KO mice showed olfactory bulb hypoplasia during early fetal development [15].

Several abnormalities in reproductive organs were also observed in the *Prokr2* KO mice, including severe atrophy of the testes, ovaries, uterus, vagina and mammary glands. Immunohistochemical analysis of *Prokr2*^{-/-} mice showed an absence of GnRH-immunoreactive neurons in the preoptic area and median eminence of the hypothalamus, which correlated with reduced mRNA levels of hypothalamic GnRH and pituitary gonadotropins as well as decreased plasma levels of testosterone and FSH [15]. Interestingly, GnRH neurons in *Prok2*^{-/-} mice were able to cross the cribriform plate to enter the central nervous system during embryonic development, but the neurons did not migrate into and populate the hypothalamus [16]. The remarkable phenotypic similarities between *Prokr2*^{-/-} and *Prok2*^{-/-} mice and Kallmann syndrome in humans inspired the hypothesis that inactivating mutations in the prokineticin system could lead to anosmia and hypogonadotropic hypogonadism in humans.

The rhythmic expression of PROK2 in the suprachiasmatic nucleus, the expression of PROKR2 in most primary target areas of the suprachiasmatic nucleus and the control of PROK2 expression/release by core clock genes [7] led to the evaluation of the circadian rhythms in *Prok2* and *Prokr2* KO mice. As anticipated, these mice exhibited disruption of circadian rhythms, with reduced rhythmicity of locomotor activity, body temperature and sleep [17–20].

Human *PROK2* and *PROKR2* Mutations

Kallmann syndrome is a complex developmental disorder combining congenital hypogonadotropic hypogonadism with anosmia or hyposmia. This phenotype is related to failure of embryonic migration of GnRH and olfactory neurons [21]. Kallmann syndrome is genetically heterogeneous [22]. Loss-of-function mutations in *KALI*, *FGFR1*, *FGF8* or *CHD7* underlie either X-linked recessive or autosomal dominant forms of the disease [23–28]. Human *PROK2* and *PROKR2* mutations were first described in 2006. Dodé et al. [29] studied a cohort of 192 patients with Kallmann syndrome, and mutations in *PROK2* and *PROKR2* were identified in 2 and 7% of the patients, respectively. Since then, approximately nine different mutations of *PROK2* and 24 mutations of *PROKR2* have been

reported in patients with variable degrees of GnRH deficiency and olfactory abnormalities (fig. 1a, b) [16, 29–36].

These mutations have been found in both male and female patients from a broad range of ethnic backgrounds [16, 29, 30, 34]. Complete and partial hypogonadotropic hypogonadism as well as delayed puberty have been associated with *PROK2* and *PROKR2* mutations. Additional clinical anomalies frequently described in patients with Kallmann syndrome caused by *KAL1* or *FGFR1* mutations were rarely described in patients with *PROK2* or *PROKR2* mutations. Five cases of high arched palate [30, 36], four cases of bimanual synkinesia [34, 36], three cases of hearing loss [34, 36], three cases of pectus excavatum [30, 34] and one case of hypodontia were described [36]. No cases of renal agenesis or cleft lip/palate were reported.

Prokineticins have been implicated in circadian rhythms, and it is speculated that patients with mutations in these genes may have circadian rhythm alterations. In one study, a Kallmann syndrome patient with a *PROK2* p.R73C mutation exhibited a severe sleep disorder, suggesting a potential contribution of the *PROKR2* signaling to physiological sleep-wake cycle [29]. However, in another recent study, patients with *PROKR2* or *PROK2* mutations did not show sleep abnormalities or circadian cortisol pattern alterations [36]. A more detailed investigation is necessary to determine whether mutations in *PROK2* or *PROKR2* lead to disruption in circadian rhythms in humans.

Initially, a genotype/phenotype association of the *PROK2* and *PROKR2* mutations in Kallmann syndrome was exclusively based on the absence of the genetic variants in control groups and their localization in conserved amino residues [29]. Intriguingly, most of the described variants of *PROK2* and *PROKR2* were missense mutations found in the heterozygous state, and only nine of them (3 in *PROK2*, fig. 1a, and 6 in *PROKR2*, fig. 1b) were identified in the homozygous state [16, 30–32, 36]. Notably, segregation analysis of two homozygous deleterious mutations of *PROK2* (p.I55fsX1) and *PROKR2* (p.Y140X) revealed that asymptomatic relatives also carried the same mutations in the heterozygous state, indicating that haploinsufficiency was not sufficient to cause the hypogonadotropic hypogonadism phenotype [16, 30]. This finding was in agreement with the report that only homozygous null mice for *Prok2* or *Prokr2* exhibited abnormal phenotypes [15]. Therefore, the role of heterozygous mutations in *PROK2* and *PROKR2* remains unclear.

Definitely one of the major challenges in the genetic investigation of human prokineticin defects is to under-

stand their inheritance pattern. Undiscovered mutations in promoter or intronic regions of the *PROK2* or *PROKR2* genes in association with heterozygous mutations within the coding regions could explain some of the unresolved phenotype-genotype correlations. Another appealing possibility is the existence of digenic or oligogenic inheritance in some of these families with heterozygous *PROK2* and *PROKR2* mutations. Indeed, approximately 10% of the patients with heterozygous mutations of *PROK2* or *PROKR2* harbored mutations in other genes (table 1); however, the functional role of some of these genetic variants has not been well defined by in vitro studies [29, 33–36]. Alternatively, the presence of polymorphisms, epigenetic and environmental effects are other potential factors that should be considered.

A comparative phenotypic study involving 55 patients, including 42 men and 13 women with Kallmann syndrome who carried either monoallelic or biallelic mutations in *PROK2* or *PROKR2* was recently conducted by several groups of investigators in France [36]. Male patients carrying biallelic mutations generally had a less variable and more severe reproductive phenotype than patients carrying monoallelic mutations. A high prevalence of both micropenis and cryptorchidism, and a lower mean testicular volume were noted in male patients with biallelic mutations. Their hormonal profile was also different, with lower testosterone, basal FSH and GnRH-stimulated LH levels in patients with biallelic mutations. Interestingly, nonreproductive and nonolfactory clinical anomalies were restricted to Kallmann syndrome patients with monoallelic mutations [36].

In vitro Functional Studies of *PROK2* and *PROKR2* Mutants

In vitro functional studies of *PROK2* and *PROKR2* mutants have been reported, establishing the causal role of mutations described in these genes [16, 34, 37]. In a comprehensive study of 324 patients with either Kallmann syndrome or normosmic hypogonadotropic hypogonadism, five mutations in *PROK2* and ten mutations in *PROKR2* were identified (fig. 1a, b). The ability of *PROK2* mutant proteins to activate intracellular Ca^{2+} mobilization in cells expressing *PROKR2* was assessed using an aequorin-based luminescent assay. The *PROK2* mutations p.C34Y, p.R73C and p.I55fsX1 resulted in inactivation or markedly reduced activity of the peptide (table 2). The p.I55fsX1 is a frameshift mutation that introduces a premature stop codon, which results in the production of

Fig. 1. Mutations identified in PROK2 and PROKR2. The mutations identified in the heterozygous state are shown in red, the mutations identified in both homozygous and heterozygous states are shown in gray and the mutations identified only in the homozygous state are shown in green. **a** Peptide sequence of PROK2 (81

amino acids) with the signal peptide (27 amino acids, shown in light blue). Exon 1 includes the signal peptide and the amino acids shown in dark blue. Exon 2 is shown in pink and exon 4 in yellow. Exon 3 is not shown. No mutations have been identified in exon 3. **b** Schematic representation of PROKR2.

a truncated protein that lacks the cysteine-rich domains critical for biological activity. The mutations p.C34Y and p.R73C are predicted to disrupt disulfide bond formation. However, a p.I50M mutation was not shown to affect the function of the peptide (table 2). Indeed, both me-

thionine and isoleucine are neutral amino acids and, therefore, this amino acid change at codon 50 of the PROK2 does not result in a significant alteration of protein charge. A p.A24P mutation, located in the signal peptide, was not tested [34].

Table 1. Eight patients who harbored *PROKR2* mutations associated with other gene defects

Patient	Mutations	Diagnosis	Functional consequence	References
1	PROKR2 p.L173R + KAL1 p.S396L	KS	PROKR2: ↓ signaling KAL1: not reported	[29, 36]
2	PROKR2 p.L173R + KAL1 p.E514K (polymorphism -rs28937309)	KS	PROKR2: ↓ signaling KAL1: altered function	[33]
3	PROKR2 p.V115M + PROK2 p.A24P	KS	PROKR2: ↓ signaling PROK2: not reported	[34]
4	PROKR2 p.S202G + GnRH1 p.R31C + FGFR1 p.I239T	nIHH	PROKR2: not reported GnRH1: not reported FGFR1: not reported	[35]
5	PROKR2 p.R85L + FGFR1 p.A604T	KS	PROKR2 and FGFR1: not reported	[36]
6	PROKR2 p.L173R + KAL p.R423X	KS	PROKR2: ↓ signaling KAL1: PTC	[36]
7	PROKR2 p.R268C + KISS1R p.A189T	KS	PROKR2: ↓ signaling KISS1R: not reported	[36]
8	PROKR2 p.V331M + GNRHR p.R240Q	KS	PROKR2: ↓ signaling GnRHR: not reported	[36]

KS = Kallmann syndrome; nIHH = normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism; PTC = premature termination codon.

Table 2. Functional effects of *PROK2* mutations as determined by in vitro studies

Mutation	Calcium mobilization	Potential mechanism	References
p.C34Y	no activity	disruption of disulfide bridges	[34]
p.I50M	similar to wild-type	does not alter the hydrophobic properties of the amino acids	[34]
p.I55fsX1	no activity	truncated protein	[16, 34]
p.R73C	60%↓	disruption of disulfide bridges	[34]

Some mutations identified in *PROKR2* were tested using experiments that measured cell surface expression, ligand binding and signal transduction through the activation of $G\alpha_q$, calcium mobilization (aequorin-based luminescence, Fluo-4 fluorescence) and MAPK pathway activation (Egr1-luciferase) [34, 37]. The amount of the receptor in the plasma membrane was quantified by ELISA in nonpermeabilized cells and compared to permeabilized cells. Mutations in the extracellular loops severely compromised signal transduction (table 3). These mutations most likely interfere with ligand binding, as shown in the binding study of the mutation p.Q210R located in the second extracellular loop [37]. The mutations in the

intracellular loops and in the carboxy-terminal domain affect the function of the receptor to variable degrees (table 3 and fig. 1b).

The exact mechanisms by which each of these mutations affect the function of the receptor are not known, but it is likely that they can interfere with G protein activation or with the correct transport of the receptor to the plasma membrane. This last hypothesis of impaired receptor trafficking is most likely for mutations in the transmembrane domains of the receptor, particularly for those changes that occur in amino acids that are highly conserved among species and among G protein-coupled receptors in general, such as p.L173R, p.W178S and

Table 3. Functional effects of *PROKR2* mutations as determined by in vitro studies

Mutation	Calcium mobilization	MAPK activation	Binding assay	PROKR2 quantification by ELISA		Ref.
				permeabilized cells	nonpermeabilized cells	
Mutations that affect ligand binding						
p.Q210R	60%↓	N/A	95%↓	10%↓	10%↓	[37]
p.Y113H	80%↓	90%↓	N/A	N/A	N/A	[34]
p.V115M	80%↓	70%↓	N/A	N/A	N/A	[34]
Mutations that affect plasma membrane expression						
p.L173R	40–60%↓	95%↓	80%↓	50%↓	80%↓	[34, 37]
p.W178S	80%↓	no activity	no binding	60%↓	90%↓	[34, 37]
p.S188L	no activity	no activity	N/A	N/A	N/A	[34]
p.P290S	no activity	N/A	no binding	60%↓	90%↓	[37]
Mutations that affect G protein interaction						
p.R85C	40%↓	10%↓	60%↓	40%↓	40%↓	[34, 37]
p.R85H	40%↓	N/A	70%↓	40%↓	40%↓	[37]
p.R164Q	60%↓	90%↓	=	20%↓	20%↓	[34, 37]
p.R248Q	40%↓	=	N/A	N/A	N/A	[34]
p.R268C	20%↓	N/A	40%↓	20%↓	20%↓	[37]
p.V331M	40–60%↓	=	50%↓	30%↓	30%↓	[34, 37]
p.R357W	60%↓	=	N/A	N/A	N/A	[34]
Mutations that do not affect PROKR2 function						
p.M323I	=	N/A	=	30%↓	40%↓	[37]

Calcium mobilization experiments: aequorin-based luminescence assay or Fluo-4. MAPK activation experiments: Egr-1 luciferase activity. N/A: Not available; =: activity similar to wild-type.

p.P290S. These mutations resulted in reduced receptor levels in the plasma membrane [37]. Indeed, W178 and P290 are the most highly conserved amino acids in trans-membrane domains 4 and 6, respectively. Notably, a dominant negative effect of any of these PROKR2 missense mutants on the wild-type receptor was not found in vitro [37].

Reversible Hypogonadotropic Hypogonadism due to PROKR2 Mutations

A homozygous PROKR2 mutation, p.V274D, was identified in a male Kallmann syndrome patient who had presented with absent puberty. After 3.5 years of treatment with hCG and testosterone, he presented with reversal of hypogonadism after discontinuing hormonal therapy. He maintained oligospermia and testosterone levels in the low normal range for 2 years without any treatment [32]. In vitro studies were not performed to assess the effect of this mutation on receptor function. If p.V274D is an inactivating mutation, then this report suggests that PROKR2 can also regulate reproduction be-

yond the stage of embryonic GnRH neuronal migration, as has been suggested for FGFR-1.

The presence of oligospermia in a patient with a homozygous PROKR2 mutation raises the issue of the role of the prokineticins in spermatogenesis. The long and short forms of PROK2 are expressed in human spermatocytes and PROKR2 is expressed in endothelial cells of the testis interstitium [38]. It is possible that the homozygous PROKR2 p.V274D mutation contributes directly to the oligospermia in this patient. In support of this possibility, a patient with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and a heterozygous p.W178S PROKR2 mutation presented with LH and FSH levels suggestive of GnRH deficiency as well as primary gonadal resistance [34]. The precise roles of PROK2 and PROKR2 in reproduction need further study for a better understanding.

Conclusions

The inactivation of the PROK2 system leads to defective olfactory morphogenesis and hypogonadism in mice and humans. Several mutations in PROK2 and PROKR2

have been found in heterozygous, homozygous and compound heterozygous states in Kallmann syndrome and normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism, suggesting a complex mode of inheritance. A monogenic recessive mode of transmission has been demonstrated clearly, but in very few cases. Remarkably, many of the heterozygous mutations of *PROKR2* have also been identified in clinically unaffected individuals, raising the question of their actual contribution to the hypogonadotropic hypogonadism phenotype. Moreover, a dominant negative effect of the heterozygous mutations of *PROKR2* was not demonstrated by in vitro studies, arguing against a monogenic dominant transmission. Potential digenic and oligogenic transmissions have often been suggested;

however, further studies will be necessary to confirm the actual pathogenic role of heterozygous *PROKR2* mutations.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grants 05/04726-0 and 06/56753-3 (to A.P.A.); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant 300209/2008-8 (to A.C.L.), and the Eunice Kennedy Shriver NICHD/NIH through cooperative agreement U54 HD28138 as part of the Specialized Cooperative Centers Program in Reproduction and Infertility Research (to U.B.K.).

References

- Li M, Bullock CM, Knauer DJ, Ehlert FJ, Zhou QY: Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 2001;59:692–698.
- Bullock CM, Li JD, Zhou QY: Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol Pharmacol* 2004;65:582–588.
- LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N: Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 2001;412:877–884.
- Chen J, Kuei C, Sutton S, Wilson S, Yu J, Kamme F, Mazur C, Lovenberg T, Liu C: Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol* 2005;67:2070–2076.
- Ngan ES, Tam PK: Prokineticin-signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1679–1684.
- Maldonado-Perez D, Evans J, Denison F, Millar RP, Jabbour HN: Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:66–72.
- Cheng MY, Bittman EL, Hattar S, Zhou QY: Regulation of prokineticin 2 expression by light and the circadian clock. *BMC Neurosci* 2005;6:17.
- Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY: Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 2002;417:405–410.
- Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY: Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 2002;277:19276–19280.
- Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, Abe M, Fukusumi S, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Hinuma S, Inatomi N, Ohtaki T, Onda H, Fujino M: Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:396–402.
- Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, Kamohara M, Ohishi T, Matsushime H, Furuichi K: Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002;1579:173–179.
- Lin R, LeCouter J, Kowalski J, Ferrara N: Characterization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor signaling in adrenal cortex capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:8724–8729.
- Zhang C, Truong KK, Zhou QY: Efferent projections of prokineticin 2 expressing neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus. *PLoS One* 2009;4:e7151.
- Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY: Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 2005;308:1923–1927.
- Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, 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* 2006;103:4140–4145.
- Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley WF Jr: Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17447–17452.
- Cheng MY, Leslie FM, Zhou QY: Expression of prokineticins and their receptors in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 2006;498:796–809.
- Prosser HM, Bradley A, Chesham JE, Ebling FJ, Hastings MH, Maywood ES: Prokineticin receptor 2 (*Prokr2*) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:648–653.
- Hu WP, Li JD, Zhang C, Boehmer L, Siegel JM, Zhou QY: Altered circadian and homeostatic sleep regulation in prokineticin 2-deficient mice. *Sleep* 2007;30:247–256.
- Li JD, Hu WP, Boehmer L, Cheng MY, Lee AG, Jilek A, Siegel JM, Zhou QY: Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J Neurosci* 2006;26:11615–11623.
- Schwanzel-Fukuda M: Origin and migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mammals. *Microsc Res Tech* 1999;44:2–10.
- Tsai PS, Gill JC: Mechanisms of disease: insights into X-linked and autosomal-dominant Kallmann syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2:160–171.
- Albuisson J, Pecheux C, Carel JC, Lacombe D, Leheup B, Lapuzina P, Bouchard P, Legius E, Matthijs G, Wasniewska M, Delpèch M, Young J, Hardelin JP, Dode C: Kallmann syndrome: 14 novel mutations in *KAL1* and *FGFR1* (*KAL2*). *Hum Mutat* 2005;25:98–99.

- 24 Hardelin JP, Levilliers J, Blanchard S, Carel JC, Leutenegger M, Pinard-Bertelto JP, Bouloux P, Petit C: Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum Mol Genet* 1993;2:373–377.
- 25 Salenave S, Chanson P, Bry H, Pugeat M, Cabrol S, Carel JC, Murat A, Lecomte P, Brailly S, Hardelin JP, Dode C, Young J: Kallmann's syndrome: a comparison of the reproductive phenotypes in men carrying KAL1 and FGFR1/KAL2 mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:758–763.
- 26 Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paep A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pecheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpuch M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel JC, Delemarre-van de Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler ML, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin JP: Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 2003;33:463–465.
- 27 Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, Jacobson-Dickman EE, Eliseenkova AV, Ma J, Dwyer A, Quinton R, Na S, Hall JE, Huot C, Alois N, Pearce SH, Cole LW, Hughes V, Mohammadi M, Tsai P, Pitteloud N: Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest* 2008;118:2822–2831.
- 28 Kim HG, Kurth I, Lan F, Melicani I, Wenzel W, Eom SH, Kang GB, Rosenberger G, Tekin M, Ozata M, Bick DP, Sherins RJ, Walker SL, Shi Y, Gusella JF, Layman LC: Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet* 2008;83:511–519.
- 29 Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman A, Morgan G, Murat A, Toubanc JE, Wolczynski S, Delpuch M, Petit C, Young J, Hardelin JP: Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* 2006;2:e175.
- 30 Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Frade Costa EM, Versiani B, Matias Baptista MT, Garmes HM, Mendonça BB, Latronico AC: Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4113–4118.
- 31 Leroy C, Fouveaut C, Leclercq S, Jacquemont S, Boullay HD, Lespinasse J, Delpuch M, Dupont JM, Hardelin JP, Dode C: Biallelic mutations in the prokineticin-2 gene in two sporadic cases of Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2008;16:865–868.
- 32 Sinisi AA, Asci R, Bellastella G, Maione L, Esposito D, Elefante A, De Bellis A, Bellastella A, Iolascon A: Homozygous mutation in the prokineticin-receptor2 gene (Val274Asp) presenting as reversible Kallmann syndrome and persistent oligozoospermia: case report. *Hum Reprod* 2008;23:2380–2384.
- 33 Canto P, Munguia P, Soderlund D, Castro JJ, Mendez JP: Genetic analysis in patients with Kallmann syndrome: coexistence of mutations in prokineticin receptor 2 and KAL1. *J Androl* 2009;30:41–45.
- 34 Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, Hughes VA, Dwyer AA, Raivio T, Hayes FJ, Seminara SB, Huot C, Alos N, Speiser P, Takeshita A, Van Vliet G, Pearce S, Crowley WF Jr, Zhou QY, Pitteloud N: Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotropin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3551–3559.
- 35 Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiras S, Gaspart A, Lavoie HB, Wu CH, Crowley WF Jr, Amory JK, Pitteloud N, Seminara SB: GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:11703–11708.
- 36 Sarfati J, Guiochon-Mantel A, Rondard P, Arnulf I, Garcia-Pinero A, Wolczynski S, Brailly-Tabard S, Bidet M, Arroyo R, Mathieu M, Lienhardt-Roussie A, Morgan G, Turki Z, Bremont C, Lespinasse J, Du Boulay H, Chabbert-Buffet N, Jacquemont S, Reach G, De Talence N, Tonella P, Conrad B, Despert F, Delobel B, Brue T, Bouvattier C, Cabrol S, Pugeat M, Murat A, Bouchard P, Hardelin JP, Dode C, Young J: A comparative phenotypic study of kallmann syndrome patients carrying monoallelic and biallelic mutations in the prokineticin 2 or prokineticin receptor 2 genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:659–669.
- 37 Monnier C, Dode C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin JP, Hardelin JP, Rondard P: PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum Mol Genet* 2009;18:75–81.
- 38 Wechselberger C, Puglisi R, Engel E, Lepardinger G, Boitani C, Kreil G: The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes. *FEBS Lett* 1999;462:177–181.