

Nuove varianti genetiche implicate nella patogenesi della Sindrome di Alport autosomica dominante: caso clinico familiare

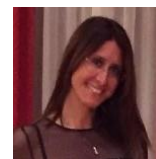
Nefrologo in corsia

Sandra La Rosa¹, Stefania Pesce¹, Simona Lombardo¹, Marilena C. Fiorino², Antonio Granata³

1 U.O.S.D. Nefrologia e Dialisi, ASP Agrigento P.O. Sciacca (AG), Italy

2 U.O.C. Anatomia Patologica ASP Agrigento P.O. Sciacca (AG), Italy

3 U.O.C. Nefrologia e Dialisi Azienda Ospedaliera Cannizzaro, Catania (CT), Italy



Sandra La Rosa

Corrispondenza a:

Sandra La Rosa

Unità Operativa di Nefrologia e Dialisi, "Ospedale Giovanni Paolo II"

Via Pompei, Sciacca (AG), Italia

Numero di telefono/Fax 0925/962481

E-mail address: slarosa76@yahoo.it

ABSTRACT

La Sindrome di Alport è un disordine ereditario caratterizzato da ematuria, proteinuria e insufficienza renale progressiva, frequentemente associata a manifestazioni extrarenali. Le varianti patogenetiche del gene COL4A5 sono associate a sindrome di Alport X-linked mentre quelle dei geni COL4A3 e COL4A4 sono associate alla forma autosomica recessiva (AR) o dominante (AD).

La malattia è caratterizzata da una notevole variabilità fenotipica legata ai diversi geni coinvolti e alle diverse mutazioni presenti, per cui i sintomi si manifestano con frequenza diversa a seconda dei casi. L'esistenza di una forma autosomica dominante della sindrome di Alport è stata individuata negli ultimi anni grazie alle tecniche di sequenziamento genico di nuova generazione (NGS) che hanno permesso di evidenziare varianti genetiche di Sindrome di Alport misconosciute. La famiglia da noi studiata presenta in concomitanza alterazioni in eterozigosi dei geni Col4A3 (c.1029+5G>A con MAF 0 e c.3211-7A>G con MAF 1:100000), alterazioni in eterozigosi del gene MTHFR (sia C677T che A1298C) e alterazione in omozigosi del gene PAI-1. Mentre la variante c.3211-7A>G, come risulta da un database di genetica (ClinVar), risulta essere benigna, la variante intronica c.1029+5G>A (causata dallo skipping dell'esone) è classificabile come patogenetica per le sue caratteristiche e per il fatto che essa co-segrega con il fenotipo all'interno della famiglia. Il dato istologico, in una delle sorelle, ha messo in evidenza la presenza di una discreta sclerosi glomerulare globale e all'indagine ultrastrutturale un assottigliamento della membrana basale glomerulare. Le nuove varianti mutazionali del gene COL4A3 possono giocare un ruolo come varianti di rischio per lo sviluppo di malattia renale cronica.

PAROLE CHIAVE: nuove varianti del gene COL4A3, pannel trombofilico, iperomocisteminemia, glomerulosclerosi, nuove tecniche di sequenziamento genico, skipping dell'esone

Introduzione

La Sindrome di Alport (AS) è una patologia glomerulare ereditaria caratterizzata da ematuria, proteinuria e progressiva compromissione della funzione renale con una prevalenza di 1 su 2000 individui per la forma X-linked ad 1 su 100 individui per la forma autosomica dominante [1]. Le prevalenze effettive della patologia sarebbero ancora maggiori se dovessimo considerare le varianti non ancora esaminate. L'alta frequenza delle varianti patogene dei geni legati alla Sindrome di Alport suggerisce che altri fattori genetici e ambientali mitigano la corrispondente manifestazione clinica della malattia [2]. Geneticamente, la Sindrome di Alport è complessa. Sono note tre tipologie di ereditarietà e un ampio numero di mutazioni sono state già identificate nei geni che codificano per il collagene di tipo IV. In genere, ogni famiglia presenta un'unica mutazione. La forma X-Linked (XL-AS; approssimativamente l'85%) causata da mutazioni nel gene COL4A5 (Xq22-25), predomina ed è seguita dalla forma Autosomica Recessiva (AR-AS) causata da mutazioni nei geni COL4A3 o COL4A4 (2q35-37). Negli ultimi anni la forma Autosomica Dominante (AD-AS) legata a mutazioni in una sola delle copie del gene COL4A3 o COL4A4 (stato di eterozigosi) è stata diagnosticata sempre con una maggiore frequenza [3]. Nel 1997 venne descritta la prima famiglia che presentava un albero genealogico suggestivo di ereditarietà autosomica dominante. La caratterizzazione di questa famiglia a livello molecolare ha messo in evidenza una mutazione di *splicing* a carico del gene COL4A3 con perdita dell'esone 21. Tale mutazione è presente in eterozigosi in tutti i membri affetti, rappresentando il primo riscontro molecolare della forma autosomica dominante della sindrome di Alport [4]. L'utilizzo delle nuove tecniche di sequenziamento genico (Next Generation Sequencing) che consentono di studiare contemporaneamente i tre geni responsabili della Sindrome di Alport ha consentito di dimostrare che le mutazioni dei geni COL4A3 e/o COL4A4 sono in realtà più frequenti di quanto si riteneva in passato (sono state individuate più di 1000 mutazioni diverse nei geni COL4A5, COL4A3 e COL4A4) e che la forma dominante di SA rappresenta il 20-30% dei casi [5].

Per l'individuazione delle nuove varianti sono stati condotti test di *splicing* sia in vivo che in vitro, i quali hanno dimostrato lo skipping dell'esone nelle varianti identificate [6]. Sono stati eseguiti test di *splicing* in vitro, utilizzati minigeni e analisi di mRNA di campioni, per determinare la patogenicità di alcune varianti sinonime o silenti rilevate in alcuni pazienti con sospetta sindrome di Alport Autosomica Dominante. Nel 50% di queste varianti identificate vi era lo skipping dell'esone che potrebbe essere implicato nella perdita dei siti di legame per i fattori di trascrizione dello *splicing* ad esempio nei siti accettori e negli enhancers dello *splicing* esonico. Possiamo affermare che alcune varianti possono non alterare la sequenza amminoacidica della proteina codificata ma influenzano notevolmente lo *splicing* pre mRNA [7].

Sono stati presi in esame diversi individui provenienti da diversi ceppi familiari, diverse razze ed etnie che sottoposti ad analisi mutazionale mediante sequenziamento dell'esone e amplificazione hanno rilevato oltre 47 mutazioni che influenzano il corretto *splicing* dell'mRNA. Questo risultato amplia lo spettro genotipico delle mutazioni note nella sindrome di Alport che permetterà di effettuare le giuste correlazioni genotipo-fenotipo negli individui presi in esame [8].

Il nostro obiettivo è quello di fare conoscere le nuove varianti geniche riscontrate nella famiglia oggetto di studio, in eterozigosi; queste nuove varianti determinano una ampia variabilità fenotipica e si associano, in alcuni casi, a una difficile diagnosi di Sindrome di Alport.

Caso clinico familiare

Descriviamo il caso clinico di una famiglia siciliana in cui sia gli uomini che le donne presentano insufficienza renale cronica avanzata (alcuni in trattamento emodialitico) e in alcuni componenti è

presente solo ematuria. Abbiamo seguito due sorelle di età diversa, una di 58 anni e l'altra di 70 anni, entrate nello stesso anno in dialisi. La sorella più giovane ha una storia clinica di dermatite atopica, poliabortività, tromboflebiti ricorrenti, artralgie diffuse migranti, tumore renale (per cui è stata sottoposta a nefrectomia), microematuria sin da piccola, trait talassemico, proteinuria dapprima nefritica poi nefrosica associata a insufficienza renale cronica da qualche anno in rapida progressione; all'esame ecografico presenta inversione dell'ecogenicità cortico-midollare con associate cisti renali e con esami immunologici tutti negativi. Altresì non presenta lesioni oculari e l'esame audiometrico risulta essere nella norma.

La sorella più anziana ha una storia di microematuria, proteinuria in range nefritico (e non nefrosico come la sorella più giovane), normoacusia, dolori articolari diffusi, cisti renali, meningioma cerebrale, fibrosi epatica, tiroidite, ANA positività (1:60), trait talassemico, insufficienza renale cronica da qualche anno e perdita della memoria. Il padre e lo zio paterno erano in dialisi (il padre aveva effettuato nel '78 biopsia renale con diagnosi di verosimile Sindrome di Alport e lo zio paterno non ha effettuato biopsia renale ma aveva proteinuria in range nefritico e all'ecografia presentava cisti renali); il nonno aveva insufficienza renale ma non era in dialisi. Al cugino (figlio dello zio paterno) per trombosi dell'oliva portale, del ramo portale di destra e della vena splenica veniva riscontrata una mutazione in omozigosi del gene MTHFR (Figura1).

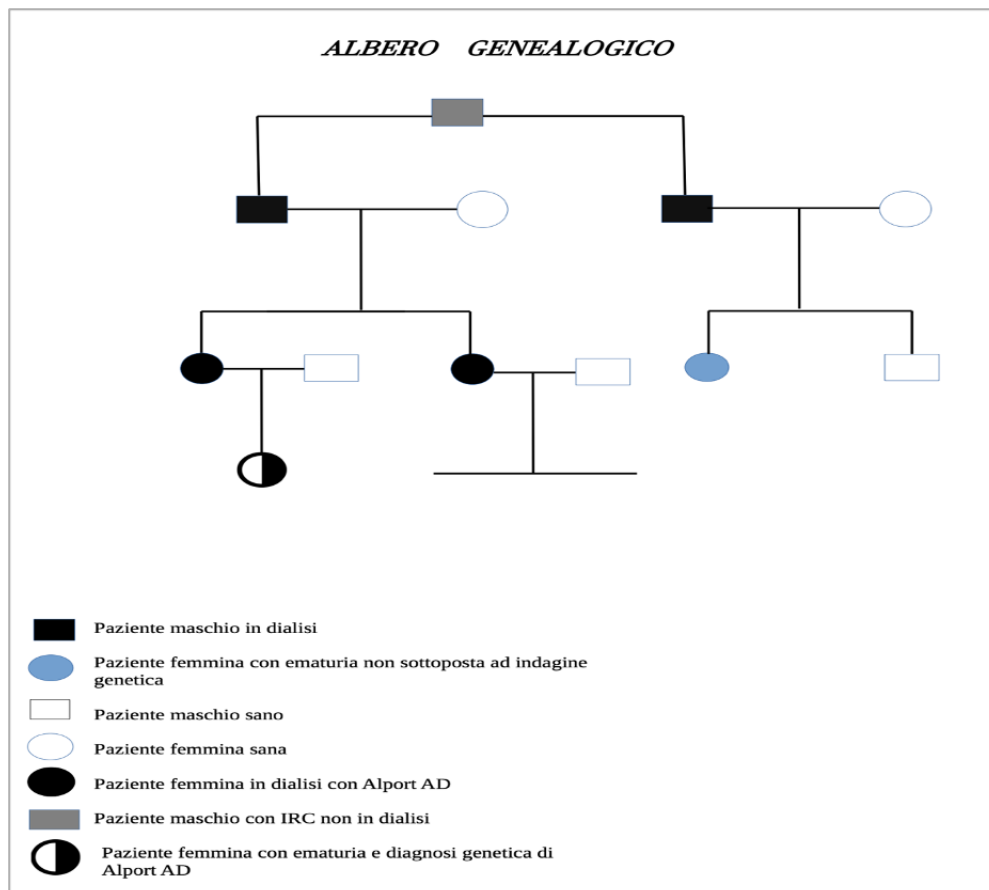


Figura 1. Albero genealogico della famiglia.

In considerazione della storia familiare di nefropatia e della sintomatologia clinica la sorella più giovane è stata sottoposta a biopsia renale (Figura 2). La sorella più anziana non ha effettuato la biopsia renale perché al momento della nostra osservazione i suoi reni erano già di piccole dimensioni.

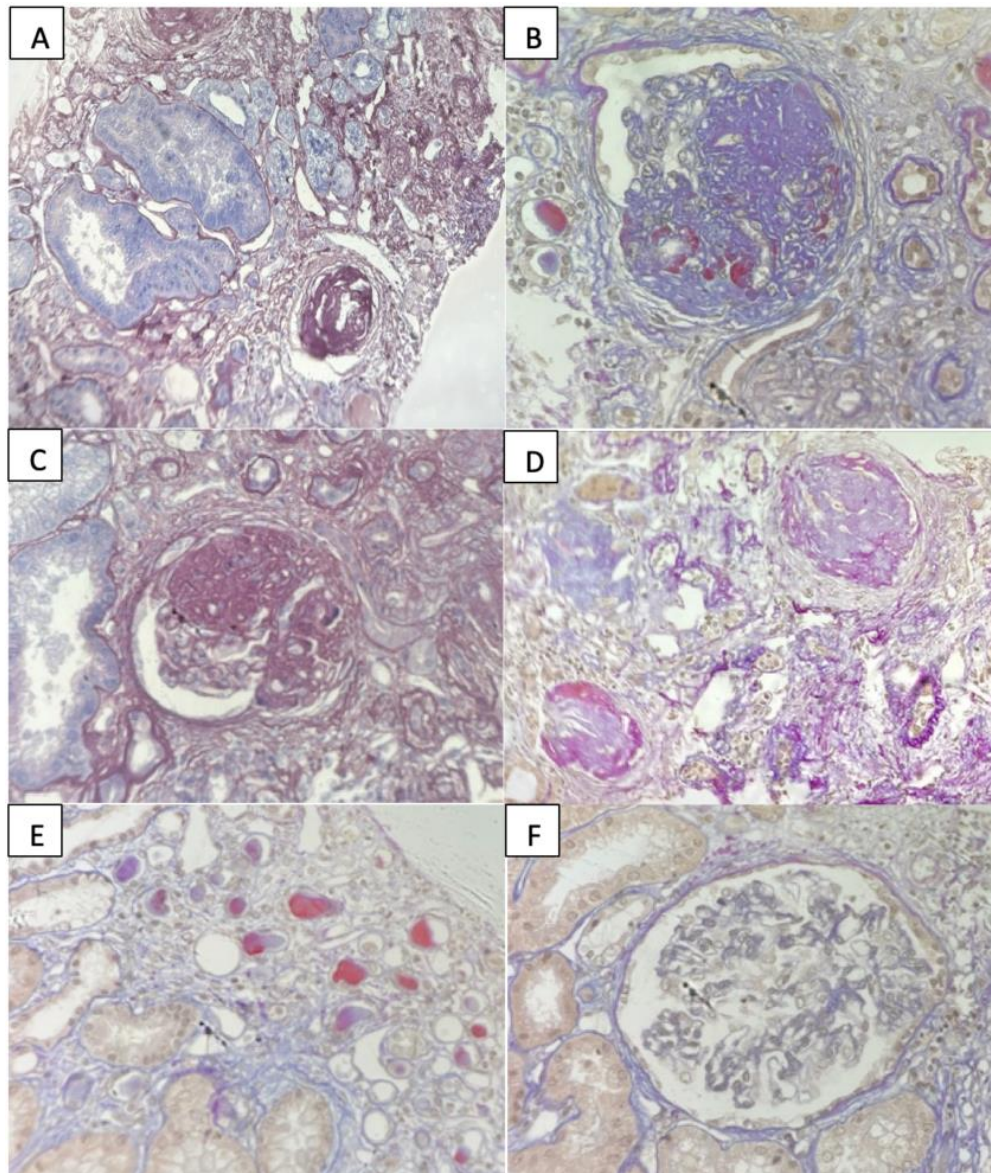


Figura 2. Biopsia renale della paziente più giovane. A: Glomerulo con sclerosi totale; B: Glomerulo con sclerosi dell'80%; C: Altro glomerulo sclerotico all'80%; D: Due glomeruli entrambi con sclerosi totale; E: Atrofia tubulare; F: Glomerulo normale.

L'esame istologico della sorella più giovane metteva in evidenza una discreta (11 glomeruli su 14 isolati) sclerosi glomerulare globale o superiore all'80% del flocculo, fibrosi interstiziale, atrofia tubulare e lieve danno vascolare arterio-arteriosclerotico. L'indagine immunoistochimica ha messo in evidenza una positività discreta per IgM (++) ; altresì è stata eseguita indagine immunoistochimica per le catene alfa 3 e alfa 5 del COL IV che sono risultate entrambe normalmente espresse. L'indagine ultrastrutturale evidenziava un assottigliamento della membrana basale glomerulare (valore medio di 110-120 nanometri) con spiccata evidenza della lamina densa e in alcuni tratti con lieve ampliamento dello spazio sotto-endoteliale. La lamina densa in limitati segmenti appare reduplicata.

La sorella più anziana ha una figlia di 41 anni anch'essa con storia di microematuria fin da piccola e difficoltà nel concepimento; di seguito si riporta ultimo suo esame delle urine (Tabella 1).

Esame Urine Chimico-fisico (met. Riflettometrico)			
pH	5,0 *↓	Unità di misura	[5,5 - 7,5]
Glucosio	0	mg/dL	[< 10]
Corpi chetonici	0	mg/dL	[< 5]
Proteine	< 15	mg/dL	[< 15]
Rapporto proteine/creatinina – screening	< 150	mg/g	[< 150]
Rapporto albumina/creatinina – screening	< 30	mg/g	[< 30]
Emoglobina	> 0.75 *↑	mg/dL	[< 0,03]
Esterasi Leucocitaria	Vedasi dato		[Assente]
Leucociti			[Assenti]
Nitriti	Assenti		[Assenti]
Densità Relativa (met. rifrattometrico)	1,016		[1,005 - 1,030]
Conducibilità (met. Impedenziometrico)	19,5	mS/cm	[3,0 - 38,0]
Esame citofluorimetrico e morfologico (met. Citometria a flusso in fluorescenza)			
Eritrociti	195	cell/μL	[< 15]
Leucociti	< 20	cell/μL	[< 20]
Cellule Ep. Squamose	55 *↑	cell/μL	[< 20]
Batteri	Assenti		[Assenti]

Tabella 1. Esame delle urine della figlia della paziente più anziana.

Per la storia clinica delle due sorelle si è proceduto a effettuare in entrambe uno studio genetico con analisi mutazionale del pannello dei geni associati a sindrome di Alport con il riscontro di varianti genomiche non note in letteratura. Si tratta di varianti presenti in eterozigosi del gene COL4A3; sono varianti a penetranza completa con trasmissione agli individui della stessa famiglia che differiscono tra loro per clinica, sintomatologia e comorbidità presenti al momento della rilevazione (NM_000091.4: c.1029+5G>A con MAF 0 e NM_000091.4: c.3211-7A>G con MAF 1:100000) (Figura 3).

<p>ANALISI MOLECOLARE PER UN PANNELLO DI GENI ASSOCIATI A SDR ALPORT</p> <p>Materiale esaminato: DNA da leucociti da sangue periferico. Metodica utilizzata: Sequenziamento di nuova generazione con Illumina MiniSeq e kit Agilent Sureselect custom. Geni analizzati: COL4A3, COL4A4, COL4A5</p> <p>Regioni analizzate: Regione codificante e giunzioni introne-esone. Regioni con copertura inferiore a 20x: circa 3%</p> <p>RISULTATO:</p> <p>Identificate la seguenti varianti del gene COL4A3 in eterozigosi:</p> <p>NM_000091.4:c.1029+5G>A con MAF 0 (GnomAD 4.1)</p> <p>NM_000091.4:c.3211-7A>G con MAF 1:100000 (GnomAD 4.1 NON-UKB)</p> <p>Negativa la ricerca della variante m.3243A>G (profondità di lettura 1100x)</p> <p>COMMENTO:</p> <p>Lo stesso genotipo è stato identificato nella sorella</p>
--

Figura 3. Analisi genetica delle due pazienti.

La variante NM_000091.4: c.3211-7>G, nel database di genetica ClinVar, è risultata essere verosimilmente benigna, mentre diverso è il ruolo della variante genetica intronica c.1029+5G>A presente in eterozigosi. Quest'ultima essendo una variante genetica nuova è assente sui database di popolazione e non è descritta in letteratura scientifica, ma è predetta alterare lo splicing del gene.

Quest'ultima variante sembrerebbe determinare la perdita di un introne e può avere un ruolo come variante di rischio per lo sviluppo di malattia renale cronica contribuendo a una maggiore complessità nella manifestazione clinica della Sindrome di Alport.

Tale famiglia è stata sottoposta a screening patogenetico al fine di studiarne la trasmissione delle diverse varianti mutazionali.

Per questo motivo anche la figlia della sorella più anziana è stata sottoposta a screening genetico che ha documentato la stessa variante genetica (Figura 4).

*Sequenziamento NGS dei geni COL4A3, COL4A4, COL4A5,
associati a Sindrome di Alport*

Motivo della indagine
Paziente con sospetta sindrome di Alport per microematuria isolata e ipoacusia, con familiarità positiva per cisti renali (nonno e zio materno) e insufficienza renale terminale (dialisi mamma e zia materna).

Indagine eseguita
Sequenziamento mediante metodica Next-Generation Sequencing dei geni COL4A3 (NM_000091), COL4A4 (NM_000092), COL4A5 (NM_033380), associati a sindrome di Alport.

Risultati

Gene	Posizione genomica (hg19)	Posizione codificante	Cambio aminoacidico	Zigosità	Ereditarietà*	Commento
COL4A3 NM_000091	Chr2: g.228122365G>A	c.1029+5G>A	/	Eterozigote	Autosomica dominante e Autosomica recessiva	Variante patogenetica

*Ereditarietà autosomica dominante: associata a varianti patogenetiche in eterozigosi (ossia presenti in una sola copia, materna o paterna, del gene). *Ereditarietà autosomica recessiva: associata a varianti patogenetiche in omozigosi o doppia eterozigosi (ossia presenti in entrambe le copie, materna e paterna, del gene).

Figura 4. Analisi genetica della figlia della paziente più anziana.

Le indagini hanno identificato nel gene COL4A3 in eterozigosi la nuova variante genetica intronica causata dallo skipping dell'esone: NM_000091 (COL4A3): c.1029+5G>A classificabile come patogenetica per le sue caratteristiche e per il fatto che essa co-segrega con il fenotipo all'interno della famiglia.

Per spiegare la progressione della nefropatia, si è proceduto a richiedere (in considerazione anche della storia familiare ovvero della presenza della mutazione in omozigosi del gene MTHFR nel cugino paterno) lo studio del pattern trombofilico (Tabella 2).

In entrambe le nostre pazienti è stata riscontrata una mutazione del gene MTHFR C677T e A1298C in eterozigosi e quella di PAI-1 in omozigosi. La mutazione MTHFR è un difetto genetico che provoca la riduzione o la perdita di attività dell'enzima metilen-tetraidrofolato reduttasi. La conseguenza di tale fenomeno è l'aumento dei valori di omocisteina nel sangue che si associa da una diminuzione dei livelli ematici di acido folico.

Le mutazioni dell'MTHFR, presenti nelle nostre pazienti, si associano quindi a iperomocisteinemia che già vent'anni fa è stata riconosciuta caratteristica comune nei pazienti con insufficienza renale.

Nelle due sorelle infatti, vi sono livelli elevati di omocisteina (Tabella 3).

Biomolecolare			
(La ricerca delle mutazioni è stata eseguita mediante PCR ed ibridazione con sonde allele specifiche)			
Mutazione G1691A Fattore V Leiden	Assente	Genotipo	Omozigote Normale-Wild Type
Mutazione C677T MTHFR	Presente	Genotipo	Eterozigote
Mutazione A 1298C MTHFR	Presente	Genotipo	Eterozigote
Fattore V° Leiden (Mutaz. H 1299 R)	Assente	Genotipo	Omozigote Normale-Wild Type
Mutazione G 20210 A FATT. SECONDO	Assente	Genotipo	Omozigote Normale-Wild Type
PAI-1	Presente	Genotipo	Omozigote 5G

Tabella 2. Pattern trombofilico di entrambe le pazienti.

Dosaggio Omocisteina (micromol/L) (Test immunoenzimatico in elettrochemiluminescenza)	v.n.5,00-15,00
Sorella di 70 anni	79,5
Sorella di 58 anni	22,9

Tabella 3. Dosaggio della omocisteina di entrambe le pazienti.

Discussione

La Sindrome di Alport è dovuta a mutazione nei geni codificanti per le catene del collagene di tipo IV che risulta essere il principale componente della membrana basale, a sua volta è interposta tra epitelio ed endotelio a livello glomerulare. Le catene del collagene di tipo IV sono dette catene alfa. Sono state identificate sei catene per il collagene di tipo IV codificate da sei geni. I geni codificanti per le catene alfa 3 ed alfa 4 (COL4A3 e COL4A4) sono localizzati sul cromosoma 2, quelli codificanti per le catene alfa 5 ed alfa 6 (COL4A5 e COL4A6) sono localizzati sul cromosoma X e i geni che codificano per le catene alfa 1 e alfa 2 (COL4A1 e COL4A2) sono localizzati sul cromosoma 13 [9]. Le catene di collagene sono ampiamente distribuite nei vari distretti corporei e per tale motivo la sintomatologia della Sindrome di Alport è molto varia e va da sintomi tipicamente associati a un danno renale ad alterazioni sensoriali (ipoacusia, lenticono e macchie retiniche) [10], a manifestazioni rare come leiomiomi soprattutto a livello bronchiale ed esofageo [11] ad aneurismi dell'aorta toraco-addominale in particolar modo nei soggetti di sesso maschile [12].

La malattia si può presentare con una grande variabilità fenotipica, legata principalmente ai geni coinvolti e all'estensione della mutazione per cui i diversi sintomi possono appalesarsi con frequenza diversa a secondo dei casi [13]. Esiste comunque una grande difficoltà nella interpretazione delle varianti dovuta all'incompleta o conflittuale evidenza di patogenicità. Delle recenti linee guida hanno indicato che le caratteristiche cliniche, la storia familiare di insufficienza renale o persistente ematuria, insieme alla identificazione di varianti genetiche, supportano in maniera forte la diagnosi di Sindrome di Alport [14].

I familiari di I grado di una persona affetta da Sindrome di Alport in forma autosomica dominante hanno il rischio del 50% di presentare la variante patogenetica, indipendentemente dal sesso.

La forma autosomica dominante è caratterizzata da lenta progressione del danno renale, da notevole variabilità intra ed interfamiliare e da una penetranza che è del 95%. I pazienti presentano un quadro clinico caratterizzato da microematuria, proteinuria (in alcuni casi isolata) e insufficienza renale dopo la terza decade. Le manifestazioni extra-renali sono rare (non sono state descritte le anomalie oculari tipiche dell'Alport e l'ipoacusia insorge in tarda età) [15].

La progressione della malattia, a seconda dell'ereditarietà, è molto variabile e va da un andamento molto rapido che richiede una terapia renale sostitutiva in adolescenza o nella prima età adulta a uno molto lento caratterizzato da una funzione renale normale per lunghi periodi di tempo [16].

La rapida progressione della malattia renale nella sorella più giovane, che è entrata in dialisi all'età di 58 anni, probabilmente è dovuta al riscontro in quest'ultima di proteinuria in range nefrosico.

A causa delle iniziali difficoltà nell'effettuare una diagnosi corretta, abbiamo sottoposto entrambe le sorelle anche a Test di Fabry, risultato negativo (Figura 5).

Età: **70 anni**

Sesso: **M** **F**

Indagine Familiare:

Cognome e Nome del Probando Affetto:

Grado di parentela:

Malattia di Anderson-Fabry: studio delle alterazioni enzimatiche e genetiche		
Analisi	Valore attività enzimatica dell'alpha-galactosidase A	Valori di Riferimento (nmoli/ml/h)
Enzimatica: Metodo fluorimetrico su DBS	Nella norma	Uomini < 1 soggetto Fabry ≤ 3 <u>sospetta</u> inefficienza enzimatica > 3 sano Donne Nelle donne i valori dell'attività enzimatica non sono indicativi e presuppongono <u>comunque</u> l'indagine genetica
Genetica: Ricerca mutazioni nel gene GLA mediante sequenziamento Sanger	Non sono state riscontrate mutazioni nelle porzioni codificanti del gene GLA.	

Età: **58 anni**

Sesso: **M** **F**

Indagine Familiare:

Cognome e Nome del Probando Affetto:

Grado di parentela:

Malattia di Anderson-Fabry: studio delle alterazioni enzimatiche e genetiche		
Analisi	Valore attività enzimatica dell'alpha-galactosidase A	Valori di Riferimento (nmoli/ml/h)
Enzimatica: Metodo fluorimetrico su DBS	Nella norma	Uomini < 1 soggetto Fabry ≤ 3 <u>sospetta</u> inefficienza enzimatica > 3 sano Donne Nelle donne i valori dell'attività enzimatica non sono indicativi e presuppongono <u>comunque</u> l'indagine genetica
Genetica: Ricerca mutazioni nel gene GLA mediante sequenziamento Sanger	Non sono state riscontrate mutazioni nelle porzioni codificanti del gene GLA.	

Figura 5. Test di Fabry di entrambe le pazienti.

Proprio per le difficoltà diagnostiche presenti in alcuni casi e per consentire un inquadramento affidabile, l'Alport Syndrome Classification Working Group ha proposto un nuovo schema di classificazione fondato su criteri genetici, clinici e molecolari invece che solo su tratti istologici e clinici [17] (Tabella 4).

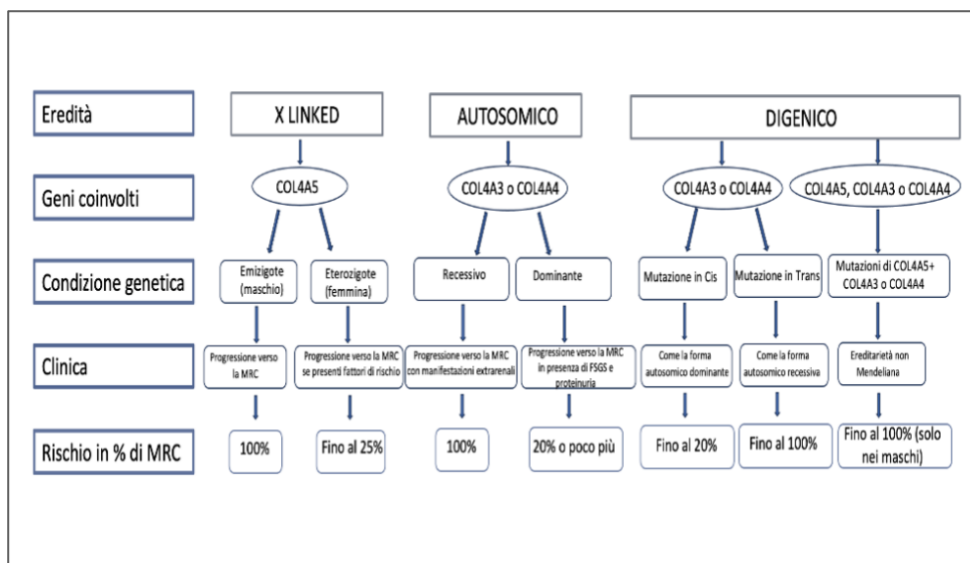


Tabella 4. Nuovo sistema di classificazione della sindrome di Alport.

L'ampia variabilità fenotipica riscontrata nella famiglia, correlata alla variante mutazionale c.1029+5G>A del gene COL4A3 (non presente in letteratura), è associata anche a mutazioni dei geni del pattern trombofilico. Entrambe le sorelle infatti presentano una mutazione combinata, in eterozigosi, sia dell'MTHFR C677T e A1298C, che è riconosciuto essere associato a un alto rischio trombotico, malattie coronariche, aborti spontanei e difetti del tubo neurale [18, 19]. La paziente più giovane è infatti andata incontro a poliabortività con conseguente difficoltà nel concepimento. Gli aborti ricorrenti in gravidanza rappresentano una condizione molto frequente nelle pazienti che presentano polimorfismi dei geni della trombofilia [20].

Altresì entrambe le sorelle presentano, in omozigosi, il polimorfismo 4G/5G del gene PAI-1, che determina, in generale, una maggiore suscettibilità al tromboembolismo venoso soprattutto se associato ad altri disordini genetici del pattern trombofilico [21] e determina anche una maggiore suscettibilità al cancro [22].

In seguito alla mutazione di MTHFR si avrà una ostacolata conversione della omocisteina in metionina e questo determinerà un aumento dell'omocisteinemia. Si parla di iperomocisteinemia quando il suo valore risulta essere superiore a 15 $\mu\text{mol/L}$.

Nelle due sorelle vi sono livelli di omocisteina pari a 79,5 $\mu\text{mol/L}$ (in quella più anziana) e 22,90 $\mu\text{mol/L}$ (in quella più giovane). Il valore più basso di una delle due sorelle è verosimilmente correlato all'assunzione di acido folico che la paziente assume da due anni.

Prove crescenti mostrano che un livello elevato di omocisteina (Hcy) sia associato a un aumento del rischio di malattia renale cronica (CKD) [23]. L'associazione tra omocisteina plasmatica e GFR sembra essere lineare [24]. Kai et al. hanno scoperto che l'apoptosi dei podociti indotta dall'iperomocisteinemia svolge un ruolo importante nel danno renale nei topi [25]. È stato infatti dimostrato che l'Hcy induce disfunzione endoteliale inibendo la proliferazione delle cellule endoteliali e promuovendo una risposta infiammatoria. Ciò suggerisce che esiste una relazione tra iperomocisteinemia e danno renale, che alla fine porta ad apoptosi dei podociti, glomerulosclerosi focale o globale, atrofia tubulare, fibrosi interstiziale e diminuzione dell'eGFR.

È ipotizzabile che il danno ossidativo esercitato dall'iperomocisteinemia possa essere considerato concausa di aterosclerosi e, oltre a indurre una disfunzione dell'endotelio vascolare, possa essere causa di glomerulosclerosi che porterebbe alla progressione della insufficienza renale [26].

L'iperomocisteinemia porta quindi a un danno endoteliale ed è un importante fattore di rischio per le patologie cardiovascolari [27]. Nella paziente più anziana, in cui vi sono i più alti valori di omocisteina, vi è anche un'alterazione della memoria a lungo termine. Alcuni studi hanno messo in evidenza che l'iperomocisteinemia può favorire il declino cognitivo ed è un fattore di rischio non soltanto per le patologie cerebrovascolari ma anche per la demenza degenerativa. Questo avviene perchè l'iperomocisteinemia ha un'azione vasculotossica nei confronti dei piccoli vasi cerebrali, favorisce la formazione dei ROS che promuovono l'infiammazione, inibisce il recettore GABA con conseguente riduzione dell'attività della NADPH ossidasi e quindi favorisce lo stress ossidativo, attiva il recettore NMDA che promuove l'eccitotossicità e di conseguenza la degenerazione neuronale. Tutto ciò porta al declino cognitivo [28].

Nella famiglia oggetto dello studio l'estrema variabilità fenotipica è da correlare non solo alla presenza di una variante mutazionale del gene COL4A3 ma anche a mutazioni del pattern trombofilico che, insieme, possono determinare una progressione della malattia renale e quindi potrebbero essere considerate singolarmente come varianti di rischio per lo sviluppo e la progressione dell'insufficienza renale cronica.

Nella forma autosomica dominante della sindrome di Alport è comune l'ematuria, la proteinuria (anche se può non essere presente) e l'insufficienza renale è rara anche se il suo rischio è aumentato se si aggiungono altri fattori patogenetici [29].

A un recente meeting di un Gruppo di Studio sulle varianti dell'Alport, si è stabilito di estendere lo screening genetico alla ricerca di mutazioni nei geni COL4A3, COL4A4 e COL4A5 oltre che ai pazienti con fenotipo classico (con ematuria, insufficienza renale e/o storia di ematuria o insufficienza renale familiare), anche ai pazienti con proteinuria, sindrome nefrosica steroideo-resistente, pazienti con glomerulosclerosi focale e segmentale (FSGS) glomerulonefrite ad IgA e pazienti con insufficienza renale cronica senza una causa apparente [30].

Ogni catena alfa del collagene di tipo IV ha un dominio amino non collagenico (NC), un dominio intermedio collagenico e un dominio carbossi non collagenico. Il dominio intermedio collagenico ha la sequenza Glicina-Xaa-Yaa dove X e Y sono spesso Prolina e Idrossiprolina. Sono stati individuati "hotspot" mutazionali di singoli aminoacidi come ad esempio in corrispondenza della Glicina nel dominio intermedio collagenico e della Cistina nel dominio carbossi non collagenico, che vengono considerate varianti ipomorfiche con un fenotipo clinico più lieve. Non è possibile definire la soglia della MAF (minore frequenza allelica) sopra la quale queste varianti sono considerate benigne soprattutto in considerazione della differente ereditarietà dell'Alport. L'interpretazione delle varianti ipomorfiche rimane comunque una sfida [31]. L'ampio spettro fenotipico delle patologie del collagene di tipo IV e l'eterogeneità mutazionale rendono difficile la diagnosi (anche tra ematuria familiare e sindrome di Alport) soprattutto nei piccoli nuclei familiari e nei casi sporadici dove l'analisi genetica fallisce.

Le varianti di alcuni pazienti con sospetto di Sindrome di Alport non vengono rilevate né con il sequenziamento dell'esone né con i test NGS (Next Generation Sequencing) per cui sono stati analizzati gli mRNA urinari dei geni COL4A3-A5 e gli mRNA di COL4A5 dei fibroblasti cutanei che hanno mostrato le mutazioni di geni non evidenziate con altri test genetici. In particolare è stata utilizzata la PCR e il sequenziamento diretto per l'analisi degli esoni con sequenze introniche vicine, corrispondenti ad anomalie dell'mRNA in cui il salto dell'esone è stato causa di una variante intronica e la ritenzione di un frammento intronico è stata causa di ulteriori varianti. L'analisi dell'mRNA per i

geni rappresentanti della Sindrome di Alport dal campione delle urine o dai fibroblasti può essere oggi usata come nuova linea di diagnosi nei pazienti con sospetto di Sindrome di Alport risultati negativi al test genetico [32].

Sono comunque necessari più studi per le patologie del collagene di tipo IV per cercare di rendere più semplice la diagnosi, la terapia e di conseguenza anche la prognosi [33].

Conclusioni

La Sindrome di Alport autosomica dominante è una patologia di recente riscontro, grazie all'utilizzo delle nuove tecniche di sequenziamento genico (Next Generation Sequencing), con un basso rischio di lesioni oculari e ipoacusia, ma con un significativo rischio di sviluppare insufficienza renale in età avanzata rispetto alla forma X-linked. È difficile riuscire a fare una diagnosi differenziale, specialmente nei pazienti giovani, con l'ematuria familiare benigna e con le forma X-linked della sindrome di Alport nelle famiglie dove solo le femmine sono malate. La forma autosomica dominante della Sindrome di Alport è quindi caratterizzata da una lenta progressione del danno renale, da una consistente variabilità intra ed interfamiliare e da una penetranza che sembra aggirarsi intorno al 95%. Una corretta diagnosi è possibile solo se si riesce ad effettuare una indagine clinica completa nei vari componenti della famiglia, unitamente allo studio dell'albero genealogico e all'analisi genetica; solo alla fine si riesce a conoscere la prognosi. Nel caso della famiglia oggetto di studio, oltre ad essere presenti varianti mutazionali in eterozigosi del gene COL4A3 (non presenti in letteratura), sono presenti mutazioni di alcuni geni del pattern trombofilico ed entrambe le condizioni possono giocare un ruolo importante come varianti di rischio per lo sviluppo della malattia renale cronica, contribuendo a una maggiore complessità nella manifestazione clinica della Sindrome di Alport.

BIBLIOGRAFIA

1. Cerkauskaite A., Savide J. et al. Identification of 27 novel variants in genes COL4A3, COL4A4, and in COL4A5 in Lithuanian Families with Alport Syndrome. *Frontiers in Medicine* 28 Marzo 2022. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.859521>.
2. Gibson J, Fieldhouse R et al. Prevalence estimates of predicted pathogenic COL4A3-COL4A5 variants in a population sequencing database and their implications for Alport Syndrome. *JASN* (2021) 32: 2273-90. <https://doi.org/10.1681/ASN.2020071065>.
3. Frank T.L., Van Der Loop, Laurence Heidet et al. Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation *Kidney International*, Vol 58 (2000), pp. 1870-1875. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2000.00358.x>.
4. Pescucci, I. Longo et al. Le "sindromi" di Alport: dalla clinica alla genetica. *Giornale Italiano di Nefrologia* Anno 22 n.5, 2005/pp466-476.
5. Moriniere V, Dahan K et al. Improving mutation screening in familiar hematuric nephropathies through next generation sequencing. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 2014 Dec; 25 (12): 2740-51. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013080912>.
6. Zhang Y, Wang X. et al. Abnormal mRNA splicing effect of COL4A3 to COL4A5 unclassified variants. *Kidney Int Rep* 2023 Jul; 8 (7): 1399-1406 <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2023.04.001>.
7. Rini Rossanti, Tomoko Horinouchi et al. Evaluation of suspected autosomal Alport Syndrome synonymous variants. *Kidney* 360 2022 3:497-505 <https://doi.org/10.34067/KID.0005252021>.
8. Stefanie Weber, Katja Strasser. Identification of 47 novel mutations in patients with Alport Syndrome and thin basement membrane nephropathy. *Pediatric Nephrology* 2016 Vol 31, 941-955. <https://doi.org/10.1007/s00467-015-3302-4>.
9. Frascà Giovanni Maria, Taruscia D. et al. Il percorso diagnostico della Sindrome di Alport e della malattia a membrane basali sottili. *Giornale Italiano di Nefrologia* 2015; 32 (S64).
10. Savige Judy, Ratnaik S. et al. Retinal Abnormalities characteristic of Inherited renal disease *JASN* 22 (8) 1403-1415 august 2011. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010090965>.
11. Antignac Corinne, Zhou Jing et al. Alport syndrome and diffuse leiomyomatosis: deletions in the 5' end of the COL4A5 collagen gene. *Kidney International* 1992 Nov 42 (5):1178-1183. <https://doi.org/10.1038/ki.1992.402>.
12. Kashtan CE, Segal Y et al. Aortic abnormalities in males with Alport syndrome. *NDT* 2010 Nov; 25 (11): 3554-3560. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq271>.
13. Heidet L, Arrondel C et al. Structure of the human type IV collagen gene COL5A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 2001 Jan; 12 (1): 97-106. <https://doi.org/10.1681/ASN.V12197>.
14. Savige J, Storey H et al. Consensus statement on standards and guidelines for the molecular diagnostics of Alport syndrome: refining the ACMG criteria. *Eur J Hum Genet.* (2021) 29: 1186-97. <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00858-1>.
15. Pescucci C, Mari F, Longo I. et al. Autosomal-dominant Alport syndrome: natural history of a disease due to COL4A3 or COL4A4 gene. *Kidney Int.* 2004;65: 1598-603. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00560.x>.
16. Clifford E Kashan. Alport Syndrome: achieving early diagnosis and treatment. *Am J Kidney disease* 201 Feb 77(2):272-279. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.03.026>.
17. Clifford E. Kashtan, Jie Ding et al. Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV alpha345: a position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group. *Kidney International* (2018) 93, 1045-1051. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.12.018>.
18. Fang Liu, Danuzia Silva et al. MTHFR A1298C and C677T polymorphisms are associated with increased risk of venous thromboembolism: a retrospective chart review study. *Acta haematol.*2017; 138(4): 208-215. <https://doi.org/10.1159/000480447>.
19. Liew Siaw-Cheok, Esha Das Gupta. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated disease. *Eur J Med Genet.* 2015 Jan, 58 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.10.004>.
20. Wen Yuanjia, He H. et al. Trombophilic gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2023 Jul; 40 (7): 1533-1558. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02823-x>.
21. Wang J, Wang C et al. Association between the plasminogen activator inhibitor -1 4G/5G polymorphism and risk of venous thromboembolism: a meta-analysis. *Thromb Res.* 2014; 134: 1241-8. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.09.035>.
22. Wang S, Cao Q. et al. PAI-1 4G/5G polymorphism contributes to cancer susceptibility: evidence from meta-analysis. *Ploose One* February 20, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056797>.
23. Chen Wei, Feng J. et al. Association of hyperhomocysteinemia and chronic kidney disease in the general population: a systematic

- review and meta-analysis. *BMC Nephrology* 24, 247 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12882-023-03295-y>.
24. Kong X et al. Hyperhomocysteinemia increases the risk of chronic kidney disease in a Chinese middle-aged and elderly population-based cohort. *Int Urol Nephrol.* 2017; 49 (4):661-7. <https://doi.org/10.1007/s11255-016-1452-3>.
 25. Kai W et al. Mechanism of hyperhomocysteinemia induced renal injury in CBS+/-mice. *Chin J Tissue Eng Res.* 2021; 25(11): 1728-1732. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3084>.
 26. Finocchiaro P, Zoccali C. Iperomocistemia e progressione delle nefropatie. *Giornale Italiano di Nefrologia* Anno 22 n.6, 2005 pp.590-596.
 27. Shih Yu-Lin et al. Elevated homocysteine levels as an indicator for chronic kidney disease in community-dwelling middle-aged and elderly populations in Taiwan: a community-based cross-sectional study. *Front Med (Lausanne)* 2022 Aug 8 <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.964101>.
 28. Homocysteine, cognitive functions, and degenerative dementias: state of the art. *Biomedicines* 2022 Oct 28; 10 (11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112741>.
 29. Savige J., Renieri Alessandra et al. Digenic Alport Syndrome. *CJASN* Nov 2022 17 (11): 1697-1706. <https://doi.org/10.2215/CJN.03120322>.
 30. Savige J, Storey H et al. Consensus statement on standards and guidelines for the molecular diagnostics of Alport syndrome: refining the ACMG criteria. *European Journal of Human Genetics* (2021) 29:1186-1197. <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00858-1>.
 31. Parkin JD, San Antonio JD et al. Mapping structural landmarks, ligand binding sites, and missense mutations to the collagen IV heterotrimers predicts major functional domains, novel interactions and variation in phenotypes in inherited disease affecting basement membranes. *Human Mutat.* 2011; 32: 127-43. <https://doi.org/10.1002/humu.21401>.
 32. Xiaoyuan Wang, Yanqin Zhang et al. *Scientific Reports* 2021 11:18097. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97414-0>.
 33. Longo I, Porcedda P. et al. COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport Syndrome. *Kidney International* Vol 61 (2002) 1947-1956. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00379.x>.