

Le “sindromi” di Alport: dalla clinica alla genetica

C. Pescucci, I. Longo, F. Mari, E. Scala, M. Bruttini, R. Caselli, A. Renieri

Genetica Medica, Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, Siena

Clinical and genetic features of the Alport “syndromes”

Alport syndrome (ATS) is a clinically and genetically heterogeneous progressive nephropathy often associated with deafness and/or ocular lesions. The histological aspect is characterized by thinning, thickening and splitting of the glomerular basement membrane (GBM). Alport syndrome is caused by mutations in COL4A3 gene (type IV collagen, alpha-3 chain), or COL4A4 gene (type IV collagen, alpha-4 chain) or COL4A5 gene (type IV collagen, alpha-5 chain) genes. Alport syndrome accounts for 1-2% of renal failure cases in Europe, and for 2-3% of transplanted patients in United States. This review focuses on the three types of Alport syndrome which differ in the clinical progression and in the mode of inheritance. The common X-linked form is caused by mutations in the COL4A5 gene and it accounts for 85% of cases. The autosomal dominant and the autosomal recessive forms are caused by mutations in either COL4A3 or COL4A4 genes. The autosomal recessive form which is responsible for the 10-15% of Alport cases, has been known since several years. On the contrary, the autosomal dominant form has only recently been identified in some families. Furthermore, this review will focus on the difficulties encountered during the genetic counselling related to the differential diagnosis between Alport syndrome and Thin Basement Membrane Disease (TBMD). We will report direct experiences of our group showing the difficulties to give an exact prognosis and a correct recurrence risk to the family. (G Ital Nefrol 2005; 22: 466-76)

KEY WORDS: Alport syndrome, COL4A3, COL4A4, COL4A5, Thin basement membrane disease (TBMD), Benign familial hematuria (BFH)

PAROLE CHIAVE: Sindrome di Alport, COL4A3, COL4A4, COL4A5, Malattia delle membrane basali sottili (TBMD), Microematuria familiare benigna (BFH)

Commento Editoriale

Questa rassegna evidenzia come i progressi della genetica danno oggi nuove risposte diagnostiche e prognostiche nella sindrome di Alport. È auspicabile che in un prossimo futuro, la genetica possa contribuire a migliorarne anche l'approccio terapeutico.

Introduzione

La sindrome di Alport (ATS) è una nefropatia progressiva, eterogenea sia dal punto di vista clinico che genetico. La nefropatia è spesso associata ad ipoacusia neurosensoriale e/o lesioni oculari. Da un punto di vista istologico, la membrana basale del glomerulo (MBG) è caratterizzata da un andamento irregolare dello spessore e dalla presenza di

tratti in cui è osservabile uno slaminamento. La malattia è causata da mutazioni in uno dei vari geni che codificano il collagene di tipo IV: il gene COL4A3 (collagene di tipo IV, catena alfa-3), oppure il gene COL4A4 (collagene di tipo IV, catena alfa-4) oppure il gene COL4A5 (collagene di tipo IV, catena alfa-5). Le catene alfa-3/alfa-4/alfa-5 del collagene di tipo IV sono espresse prevalentemente a livello della membrana basale del glomerulo, nella quale costituiscono un complesso *network* molecolare interagendo a formare strutture sovramolecolari stabilizzate da ponti disolfuro. I protomeri sono costituiti da 3 catene alfa (IV) e sono per gran parte della loro lunghezza superavvolti in una tripla elica (1). L'assenza del *network* $\alpha-3 \alpha-4 \alpha-5$ (IV) nei pazienti con sindrome di Alport causa l'alterazione della MBG e il progressivo deterioramento della funzionalità renale durante la prima o la seconda decade di vita (2). La sindrome di Alport è responsabile dell'1-2% dei casi di

insufficienza renale in Europa (3). I classici criteri clinici per la diagnosi di sindrome di Alport in pazienti con ematuria o insufficienza renale sono i seguenti: i) storia familiare positiva per ematuria o insufficienza renale cronica; ii) biopsia renale che mostri le tipiche alterazioni della membrana basale del glomerulo (assottigliamenti, ispessimenti o slaminamenti); iii) ipoacusia neurosensoriale progressiva per le alte frequenze; iv) anomalie oculari tipiche (lenticono, macchie bianche perimaculari) (4). Per effettuare la diagnosi di sindrome di Alport solo su base clinica tre dei quattro criteri indicati dovrebbero essere soddisfatti.

La sindrome di Alport è stata descritta per la prima volta nel 1927 (5). Nel 1988 è stato identificato, mediante studi di *linkage*, il *locus* maggiore sul cromosoma X, e, nel 1990, sono state identificate mutazioni a carico del gene COL4A5, localizzato in Xq22.3. Tale gene è dunque responsabile della sindrome di Alport legata al cromosoma X (4). La forma legata al cromosoma X della sindrome di Alport è la forma più comune della malattia (OMIM#301050). L'ereditarietà di questa forma viene definita come semi-dominante, in quanto i maschi, che hanno un solo cromosoma X (emizigoti) sono più gravemente affetti rispetto alle femmine, che hanno un cromosoma X con il gene mutato e uno con il gene normale (eterozigoti). Infatti, il 70% dei maschi raggiungono l'insufficienza renale prima dei 30 anni. Le femmine invece presentano come unica manifestazione della malattia la microematuria (6).

Nel 1993 sono state individuate mutazioni a carico del gene COL4A3 oppure del gene COL4A4, localizzati sul cromosoma 2 (2q36-2q37), in pazienti affetti dalla meno comune forma autosomica recessiva (OMIM#203780). Un individuo affetto da questa forma possiede due copie mutate del gene COL4A3 o del gene COL4A4. La mutazione può essere la stessa in entrambe le copie del gene specialmente se il paziente ha genitori consanguinei (stato di omozigosi per la mutazione). In alternativa, si possono avere due mutazioni differenti nelle due copie del gene soprattutto se sono trasmesse da due portatori non imparentati (stato di eterozigosi composta per la mutazione). Generalmente, in questa forma la patologia si presenta con la medesima severità sia nei maschi che nelle femmine. Sia maschi che femmine raggiungono l'insufficienza renale durante la prima o la seconda decade di vita. Gli individui eterozigoti possono essere completamente asintomatici o presentare microematuria (7, 8). Mutazioni a carico dei geni COL4A3 e COL4A4 sono state individuate, in eterozigosi, anche nella microematuria familiare benigna (BFH, OMIM#141200) (9, 10).

L'esistenza della forma autosomica dominante della sindrome di Alport è stata ipotizzata per la prima volta nel 1976 ma è rimasta a lungo dibattuta (OMIM#104200), (11). Solo recentemente si è avuta la conferma molecolare dell'esistenza della forma autosomica dominante della sindrome di Alport (12-14). In questa forma il paziente pre-

senta la mutazione in una sola delle copie del gene COL4A3 o COL4A4 (stato di eterozigosi).

In questo lavoro analizzeremo le diverse forme della sindrome di Alport, rivolgendo particolare attenzione alle differenze fenotipiche tra di esse e affrontando il problema della diagnosi differenziale in questa condizione. L'ampio spettro fenotipico legato alle malattie del collagene di tipo IV, i numerosi loci coinvolti, l'eterogeneità delle mutazioni rendono la diagnosi molecolare difficile, in particolare nelle famiglie piccole e nei casi sporadici, nei quali l'analisi di genetica formale (analisi dell'albero genealogico) non può essere attuata.

La sindrome di Alport legata al cromosoma X

La sindrome di Alport legata al cromosoma X (ATS-XL) è dovuta a mutazioni nel gene COL4A5 (Xq22.3). Questo gene ha una dimensione di circa 250 kb e contiene 51 esoni, che codificano per un trascritto di circa 6.5 kb (15). La catena proteica alfa-5 è costituita da 1685 aminoacidi ed è strutturata in tre domini, un dominio N terminale chiamato 7S, un dominio centrale a tripla elica ed un dominio C terminale globulare. Quattro domini 7S e due domini C terminali interagiscono tra di loro a formare delle maglie molecolari che costituiscono la struttura portante della membrana basale. Il grande dominio centrale è un dominio collagenico a tripla elica che si estende per un totale di 1430 aminoacidi ed è caratterizzato da una serie di sequenze del tipo Gly-X-Y, dove accanto alla glicina (Gly), fondamentale per il ripiegamento della molecola, possiamo trovare vari amminoacidi. La ripetizione Gly-X-Y presenta 22 brevi interruzioni. Le interruzioni conferiscono alla molecola maggiore flessibilità e sensibilità alla proteolisi rispetto ai collagene I, II, III. Il dominio C terminale globulare è chiamato dominio NC (non collagenico) ed è formato da 229 residui (16). Quando si hanno mutazioni in questo gene, la proteina prodotta può essere assente a causa di delezioni (viene cioè a mancare il gene COL4A5, che codifica per la proteina stessa), oppure la proteina può essere alterata. La proteina alterata può essere tronca a causa di mutazioni nonsense (mutazioni in cui una tripletta che codifica per un amminoacido viene sostituita da una tripletta che codifica per un codone di stop) o a causa di mutazioni *frameshift* (mutazioni, delezioni o inserzioni, che causano lo slittamento del registro di lettura del codice genetico portando così alla sintesi di amminoacidi sbagliati e alla formazione di un codone di stop prematuro che causa l'interruzione della proteina stessa). In presenza di mutazioni missenso (mutazioni in cui una tripletta che codifica per un amminoacido viene sostituita da una tripletta che codifica per un amminoacido differente), la proteina mutata differisce dalla proteina normale solo per un amminoacido. Infine, la proteina può essere riarrangiata a causa di mutazioni dei siti di *splicing*, che causano un'alterazione nel processo di maturazione dell'RNA messaggero, portando ad una proteina che

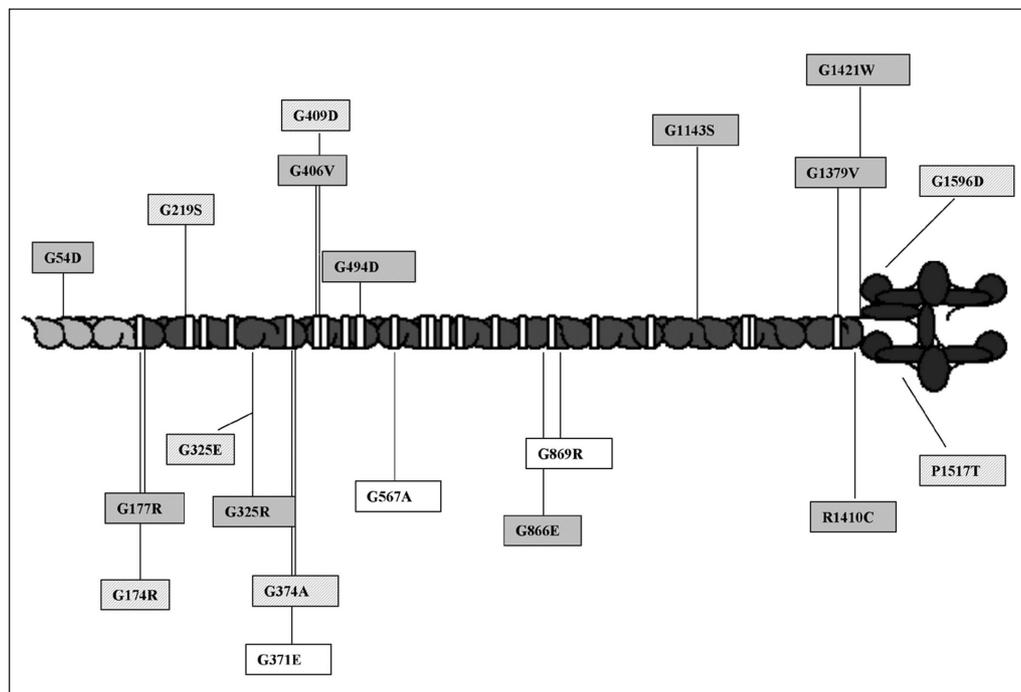


Fig. 1 - Struttura della catena alfa-5 del collagene di tipo IV e posizione delle mutazioni missenso nei diversi domini. Il dominio 7S è rappresentato in grigio chiaro, in grigio la regione tripla elica, con le tipiche interruzioni nella struttura indicate in bianco, in grigio scuro il dominio globulare NC. Mutazioni a carico dei residui di glicina nel dominio tripla elica sono in relazione con insorgenza in età variabile dell'insufficienza renale terminale nei maschi: in grigio la forma adulta (progressione in insufficienza renale terminale dopo i 30 anni), barrata la forma giovanile (progressione in insufficienza renale terminale prima dei 30 anni) e in bianco i casi in cui l'età di insorgenza non è determinabile a causa della giovane età del paziente (modificato da Renieri et al. 1996) (6).

manca di una regione codificante (esone) o che al contrario comprende una regione non codificante (introne). Le mutazioni missenso nei geni del collagene di tipo IV, in genere, colpiscono l'amminoacido glicina e risultano patogenetiche perché la sostituzione di una glicina con un amminoacido più grande o con una carica diversa interferisce con la corretta formazione dell'eterotrimerico del collagene. La Figura 1 mostra la struttura della proteina e la posizione di alcune mutazioni missenso.

La ATS-XL segue un'ereditarietà legata al cromosoma X semidominante. Ciò significa che le femmine eterozigoti per una mutazione nella catena α -5 del collagene di tipo IV mostrano, in genere, un'espressione della malattia molto più lieve rispetto ai maschi con la mutazione in emizigosi. La Figura 2 illustra l'albero genealogico di una famiglia all'interno della quale segrega la forma ATS-XL. Essendo la forma più frequente della malattia, con un'incidenza stimata nei maschi di 1 su 5000, la ATS-XL è senz'altro la meglio conosciuta da un punto di vista clinico. Dal 1991 al 1994 è stato effettuato in Italia uno Studio Multicentrico sulla sindrome di Alport, che ha permesso un censimento delle famiglie italiane e la raccolta dei corrispondenti campioni biologici (17, 18). Tale studio ha consentito la messa a punto di un test diagnostico molecolare presso la U.O.C. Genetica Medica di Siena. L'analisi molecolare di questo ampio numero di famiglie ha messo in evidenza che non sempre i pazienti affetti da ATS-XL rispettano i tre criteri clinici stabiliti come necessari per la diagnosi su base clinica della malattia (17, 18). Dal 1991 ad oggi sono stati registrati in Italia 447 casi di sindrome di Alport, 382 casi familiari e 65 sporadici. Di tutti i casi giunti alla nostra osserva-

zione circa l'82% sono casi di ATS-XL.

L'analisi di ampie casistiche ha permesso di definirne dettagliatamente le caratteristiche fenotipiche. Da un punto di vista clinico la ATS-XL è estremamente eterogenea, mostra un'ampia variabilità nella progressione verso l'insufficienza renale terminale e importanti differenze per quanto riguarda la sintomatologia extrarenale (presenza o assenza di ipoacusia e/o di anomalie oculari). Parallelamente a questa variabilità clinica si osserva anche una notevole variabilità a livello microscopico delle lesioni della MBG.

Jais et al (2000) descrivono un'ampia analisi di correlazione genotipo-fenotipo su 195 famiglie con diagnosi molecolare di ATS-XL, fornendo precise informazioni sulla storia naturale della patologia (19). Tale studio è il risultato di una *Concerted Action* sulla sindrome di Alport finanziata dall'Unione Europea alla quale hanno partecipato 12 paesi, compresa l'Italia. I risultati di tale studio indicano che in tutti i pazienti maschi esaminati sono presenti le tipiche alterazioni strutturali della membrana basale del glomerulo, ematuria (in genere microematuria), e nel 95% di essi è presente anche proteinuria. Inoltre, si osserva ipoacusia neurosensoriale progressiva in circa il 79% dei casi, mentre difetti oculari si hanno in circa il 32.5%. Complessivamente, per i pazienti maschi affetti dalla forma ATS-XL è stato stimato un rischio pari al 90% di sviluppare insufficienza renale e ipoacusia entro i 40 anni (Fig. 3a). Per quanto riguarda la correlazione genotipo-fenotipo sembra che mutazioni che portano alla produzione di una proteina trunca (nonsense e *frameshift*) o alla sua totale mancanza (delezioni), causino una progressione più rapida

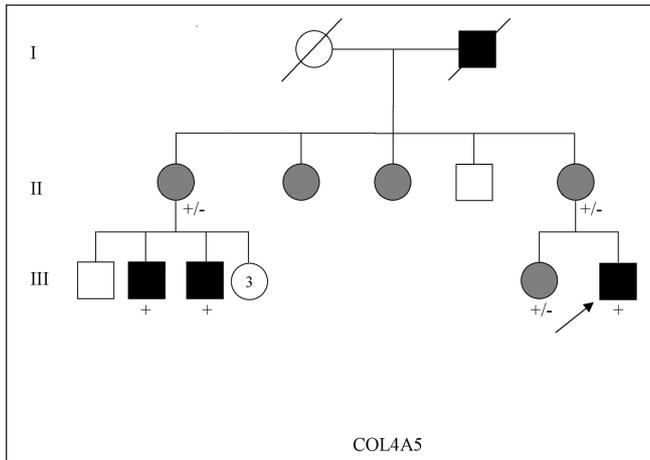


Fig. 2 - Albero genealogico di una famiglia in cui segrega la forma legata al cromosoma X della sindrome di Alport. La paziente II-1 ha mostrato lieve insufficienza renale all'età di 64 anni, i pazienti III-2, III-3 e III-8 hanno mostrato insufficienza renale terminale rispettivamente all'età di 22, 18 e 33 anni. Le pazienti II-2, II-3, II-5 e III-7 mostrano microematuria intermittente. L'analisi mediante Southern blotting del gene COL4A5 ha rivelato la presenza di una delezione in tutti i membri affetti della famiglia: +, delezione del gene COL4A5 in emizigosi; +/- delezione in eterozigosi. La freccia indica il probando, cioè il caso indice. I simboli in nero indicano la manifestazione clinica più grave. I simboli in grigio indicano la manifestazione clinica più lieve (modificato da Renieri et al, 1995) (17).

verso l'insufficienza renale, che si verificherebbe nel 90% di questi casi entro i 30 anni. Tale percentuale sarebbe del 70% per i pazienti con produzione di proteina riarrangiata (alterazioni dei siti di *splicing*) e si ridurrebbe invece al 50% per quelli con una singola sostituzione aminoacidica (17, 19). È importante tenere presente che la ATS-XL presenta una manifestazione clinica decisamente più lieve nelle femmine (Fig. 3b), nelle quali spesso l'unica manifestazione della malattia resta la microematuria. Uno studio analogo a quello effettuato sui maschi con ATS-XL è stato effettuato, nell'ambito della medesima *Concerted Action* europea, sulle donne eterozigoti per mutazioni nel gene COL4A5 (20). I risultati di questo studio indicano che il 96% delle femmine presenta microematuria e che la proteinuria compare nel 75% dei casi, mentre le anomalie oculari e l'ipoacusia sono presenti rispettivamente nel 15% e nel 28% delle pazienti. Complessivamente questo studio ha confermato che la prognosi nelle femmine eterozigoti è decisamente migliore, con un rischio di sviluppare insufficienza renale terminale prima dei 40 anni che si aggira intorno al 12%, rischio che tuttavia aumenta fino al 30% se considerato a 60 anni (Fig. 3b). È comunque importante sottolineare che in generale la ATS-XL è caratterizzata da una notevole eterogeneità intrafamiliarità del quadro clinico nelle femmine. Tale eterogeneità rende difficile stabilire la prognosi nelle singole pazienti anche quando sia nota la storia clinica di altre parenti femmine.

Quando, dall'analisi delle caratteristiche dell'albero

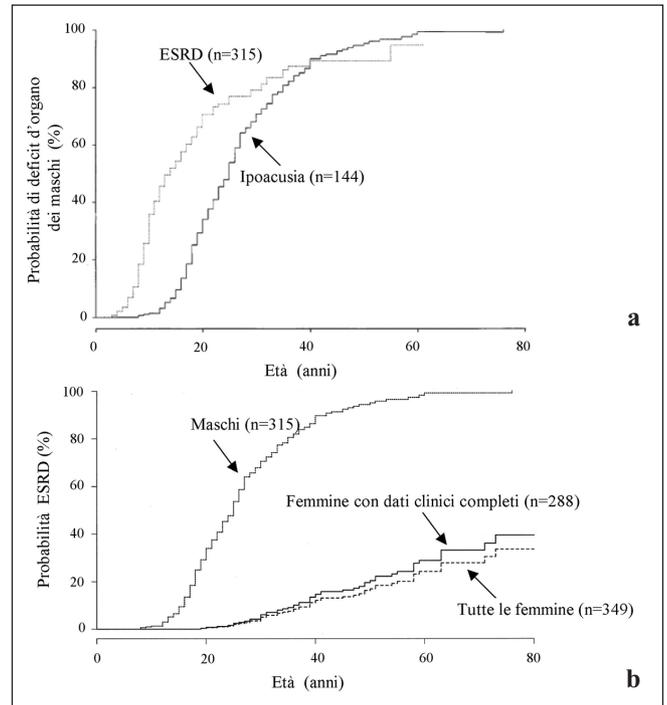


Fig. 3 - Progressione del danno d'organo nella sindrome di Alport legata al cromosoma X.

a) Percentuale di maschi che raggiungono insufficienza renale terminale e che sviluppano ipoacusia neurosensoriale per le alte frequenze in funzione dell'età. È indicato tra parentesi il numero di pazienti considerati: 315 maschi per il danno renale e 144 maschi per la valutazione dell'ipoacusia (modificato da Jais et al 2003) (30). ESRD= insufficienza renale terminale.

b) Progressione del danno d'organo in funzione dell'età, espresso come probabilità di raggiungere insufficienza renale terminale, nei maschi e nelle femmine con ATS-XL. La valutazione della progressione del danno nelle femmine è stata effettuata distintamente considerando solo le femmine con dati clinici completi o l'intera casistica (modificato da Jais et al 2003) (30). ESRD= insufficienza renale terminale.

genealogico (Fig. 2) e dalle caratteristiche cliniche sopradescritte, si pone il sospetto di ATS-XL deve essere effettuato un test molecolare, al fine di confermare tale diagnosi. Si tratta dell'analisi mutazionale dei 51 esoni che costituiscono il gene COL4A5. La metodica utilizzata dagli anni 90 ad oggi è la tecnica di SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphisms*) (18). Recentemente, è stata introdotta una tecnica più rapida e sensibile denominata DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) (14). Una volta identificata una alterazione in uno degli esoni del gene mediante una di queste due tecniche, la mutazione deve essere caratterizzata mediante sequenziamento diretto. Il test è lungo, indaginoso e richiede non meno di 6-12 mesi per essere completato. L'analisi molecolare del gene COL4A5 è importante anche per poter offrire ai pazienti una eventuale diagnosi prenatale, che può essere effettuata solo se la mutazione è stata precedentemente caratterizzata all'interno della famiglia. Dal 1994 il test

molecolare per la sindrome di Alport è disponibile presso la Genetica Medica di Siena, come prestazione del SSN.

Test di verifica

1) L'ereditarietà della sindrome di Alport dovuta a mutazioni nel gene COL4A5 è:

- Autosomica dominante
- X-legata dominante
- X-legata recessiva
- X-legata semidominante
- Autosomica recessiva.

2) Nella forma X-legata della sindrome di Alport:

- I maschi sono più gravemente affetti rispetto alle femmine
- Le femmine sono più gravemente affette rispetto ai maschi
- Maschi e femmine sono ugualmente affetti.

3) Se la proteina (catena alfa-5) è assente o tronca, i pazienti hanno una prognosi:

- Peggiora (insufficienza renale terminale entro i 30 anni nel 90% dei casi)
- Migliore (insufficienza renale terminale oltre i 60 anni)
- Uguale a quella dei pazienti con sostituzione aminocidica
- Uguale a quella dei pazienti con proteina riarrangiata.

4) La sindrome di Alport è una malattia del collagene di tipo:

- IV
- I
- II
- IX
- XI.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

La sindrome di Alport autosomica recessiva

La forma autosomica recessiva della sindrome di Alport è responsabile di circa il 10-15% dei casi di ATS ed è dovuta a mutazioni nel gene COL4A3 oppure nel gene COL4A4 localizzati sul cromosoma 2 in 2q36-q37 (ATS-AR, OMIM#203780), (7, 8). Studi di immunocistochimica avevano già nel 1989 riscontrato l'assenza delle catene α -3 e α -4, nelle MBG dei pazienti con ATS (21). Il coinvolgimento definitivo di tali geni è stato confermato dalla scoperta di mutazioni in alcune famiglie (8).

I geni COL4A3 e COL4A4 sono costituiti rispettivamente da 52 e 48 esoni. La loro struttura è simile a quella descritta per il gene COL4A5 e comprende tre domini, un

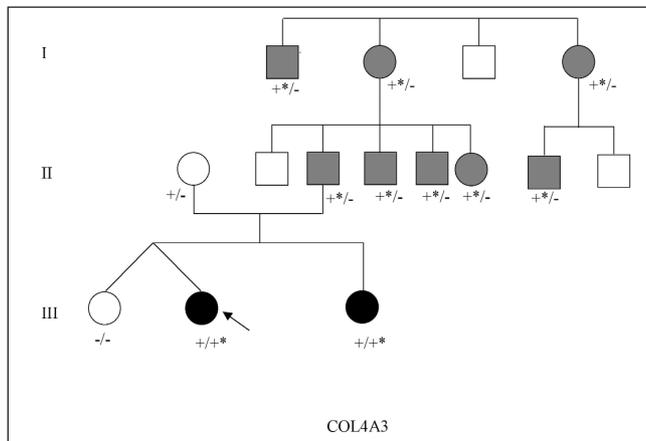


Fig. 4 - Albero genealogico in cui segrega la forma autosomica recessiva della sindrome di Alport. La paziente III-2 è una ragazza di 17 anni con insufficienza renale cronica, sordità bilaterale, e ritardo della crescita, la gemella III-1 non mostra alcun segno clinico, mentre la sorella III-3 presenta microematuria. Il padre II-3, ha microematuria, episodi di macroematuria ma la funzionalità renale è normale. La madre II-1, non mostra alcun segno clinico. +: mutazione 3209insA nel gene COL4A3, +*: mutazione 3386del27 nel gene COL4A3. I simboli + e +* indicano che si tratta di due diverse mutazioni nello stesso gene. La freccia indica il probando, cioè il caso indice. I simboli in nero indicano la manifestazione clinica più grave. I simboli in grigio indicano la manifestazione clinica più lieve (modificato da Longo et al 2002) (13).

dominio N terminale chiamato 7S, un dominio centrale a tripla elica ed un dominio C terminale globulare. Il dominio collagenico a tripla elica è caratterizzato da sequenze del tipo Gly-X-Y. Le interruzioni del motivo Gly-X-Y sono 23 nel COL4A3 e 26 nel COL4A4.

La trasmissione autosomica recessiva della malattia è suggerita da alcune caratteristiche fenotipiche e dell'albero genealogico: 1) presenza di femmine affette altrettanto gravemente quanto i maschi; 2) assenza di sintomatologia nei genitori, che possono avere microematuria o nessun segno clinico; 3) presenza di consanguineità nella famiglia. È importante osservare che nella casistica raccolta dallo Studio Multicentrico Italiano in realtà il tasso di consanguineità è molto basso, se paragonato alle casistiche provenienti da altri paesi europei. Pertanto, il numero di famiglie con ATS-AR individuate nella casistica italiana è più basso rispetto a quella europea. Nel 2002 abbiamo descritto due famiglie con ATS-AR (13). Le mutazioni in entrambe le famiglie erano in uno stato di eterozigosi composta, a conferma dell'assenza di consanguineità. Dal 2002 il test molecolare per la forma autosomica recessiva della sindrome di Alport è disponibile presso la Genetica Medica di Siena, come prestazione del SSN.

Caso clinico

Giunge alla nostra osservazione una ragazza di 17 anni, con insufficienza renale cronica (creatininemia 2 mg %),

sordità bilaterale mista e ritardo della crescita (Fig. 4). Episodi di microematuria e proteinuria sono presenti fin dai 5 mesi di età, è inoltre riportato un episodio di macroematuria all'età di 7 mesi. A 13 anni è stata effettuata una biopsia renale che ha evidenziato ispessimenti e slaminamenti della MBG suggerendo una diagnosi di ATS. Il padre della probanda, all'età di 43 anni, presenta microematuria e qualche episodio di macroematuria, ma la sua funzionalità renale è nella norma (creatininemia 0.9 mg %), come l'audiogramma. La madre non presenta alcun segno della malattia. La probanda ha una gemella sana ed una sorella di 9 anni che mostra microematuria e che ha avuto un episodio di macroematuria all'età di 2 anni (creatininemia 0.4 mg %). Nel ramo paterno della famiglia è segnalata una microematuria che segrega con modalità autosomica dominante. È stata effettuata l'analisi del gene COL4A3 e del gene COL4A4, responsabili della forma autosomica recessiva di ATS, usando la tecnica di SSCP. Sono stati analizzati tutti i 52 esoni del gene COL4A3 ed i 48 esoni del gene COL4A4. Tale analisi è molto lunga e indaginata dato l'elevato numero di frammenti (esoni) da analizzare. Un'analisi parziale del gene COL4A3, nella probanda, ha mostrato nell'esone 39 una delezione di 27 paia di basi in posizione 3386, in eterozigosi (c.3386 del 27). La delezione era stata trasmessa dal padre (II-3) alle due figlie affette (III-2, III-3) e non alla figlia sana (III-1) (Fig. 4). Abbiamo quindi effettuato un'analisi di *linkage* per verificare il contributo materno. Da tale analisi è emerso che la madre (II-1) ha trasmesso lo stesso aplotipo (serie di alleli che si trovano associati su un singolo cromosoma) alle figlie affette (III-2, III-3) e un aplotipo diverso alla figlia sana (III-1). Tale analisi faceva ipotizzare che le due sorelle affette avessero ereditato una seconda mutazione dalla madre. Effettivamente, l'analisi completa del gene COL4A3, ha evidenziato nella probanda una seconda mutazione nell'esone 37 dello stesso gene (c.3209 insA). La mutazione è stata ritrovata nella madre (II-1), portatrice asintomatica, e nella sorella affetta (III-3). È stata così confermata l'ipotesi di una forma autosomica recessiva della ATS in questa famiglia.

Questo caso mette in evidenza che individui più gravemente affetti come la probanda, possono avere una ATS-AR dovuta alla presenza di due mutazioni nel gene COL4A3. Individui meno gravemente affetti come il padre e il ramo paterno che manifestano solo microematuria possono avere tale manifestazione come conseguenza di una mutazione in eterozigosi.

Test di verifica

1) Una femmina affetta da sindrome di Alport AR generalmente sviluppa insufficienza renale entro i:

- a. 70 anni
- b. 60 anni

- c. 2 anni
- d. 80 anni
- e. 20 anni.

2) La presenza di consanguineità in una famiglia con sindrome di Alport indirizza l'ipotesi diagnostica verso:

- a. ATS-XL
- b. ATS-AD
- c. Non fornisce alcun tipo di indicazione
- d. Pone il sospetto per le forme autosomiche della malattia
- e. ATS-AR.

3) I geni responsabili della sindrome di Alport autosomica recessiva sono:

- a. COL4A5 e COL4A6
- b. COL4A3 e COL4A5
- c. COL4A3 e COL4A4
- d. COL4A4 e COL4A6
- e. COL4A4 e COL4A2.

4) I genitori di un probando affetto da sindrome di Alport autosomica recessiva sono:

- a. Almeno uno dei due è affetto come il figlio
- b. Entrambi sono affetti come il figlio
- c. Hanno sempre microematuria
- d. Possono essere del tutto asintomatici o presentare microematuria
- e. Presentano sempre sordità
- f. Devono aver avuto episodi di macroematuria.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

La sindrome di Alport autosomica dominante

Nel 1927 Alport pose l'attenzione su una famiglia inglese descritta da Guthrie nel 1902 nella quale 12 su 15 membri di due generazioni sia maschi che femmine avevano una nefropatia con sordità (5). Alport sottolineava la differenza nella gravità del coinvolgimento renale tra i maschi e le femmine (5). Per lungo tempo la sindrome di Alport è stata considerata una malattia autosomica dominante dove le femmine erano meno affette dei maschi e si riproducevano più spesso (11). Le proporzioni riportate di maschi affetti nati da un padre affetto erano di 83% sani contro 17% affetti (11). Oggi possiamo a posteriori interpretare lo sbilanciamento dei rapporti a favore dei figli sani con il fatto che la forma più comune di sindrome di Alport è la ATS-XL in cui il 100% dei figli maschi di un padre affetto sono sani. Con l'identificazione del gene COL4A5 (anno 1990) e dei geni COL4A4 e COL4A3 per la forma recessiva (anno 1994) l'esistenza della forma autosomica dominante era stata messa in discussione (4, 8). Solo molti anni dopo

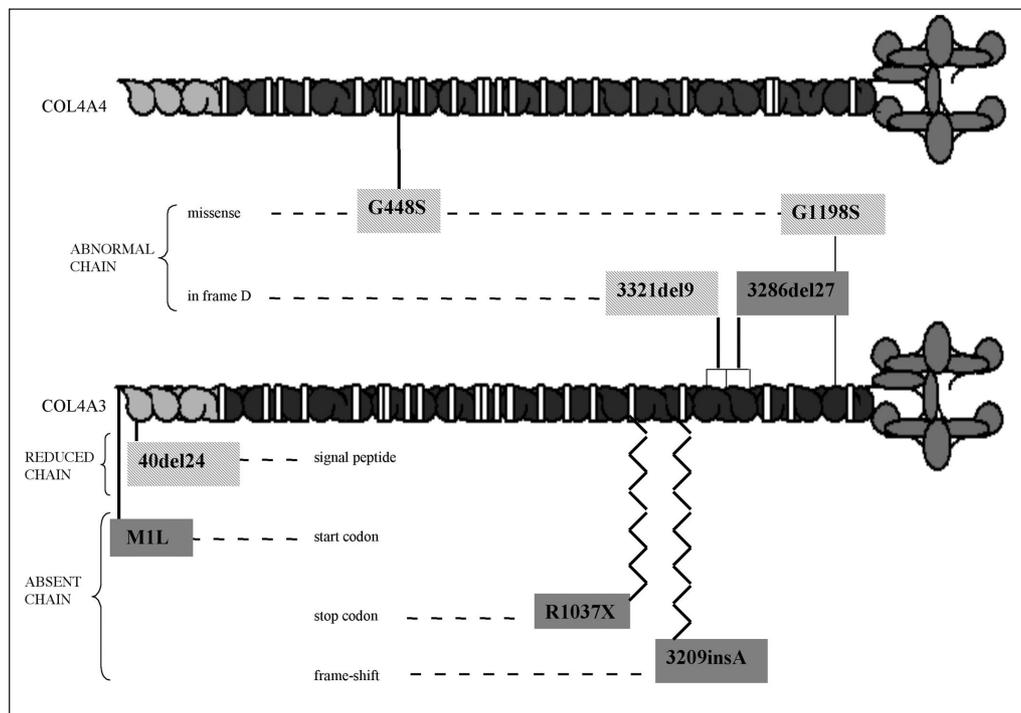


Fig. 5 - Distribuzione delle mutazioni patogenetiche nei geni COL4A4 (pannello superiore) e COL4A3 (pannello inferiore), individuate in 56 famiglie con sindrome di Alport. In grigio sono evidenziate le mutazioni ritrovate in famiglie a trasmissione autosomica recessiva, a righe sono evidenziate le mutazioni ritrovate in famiglie a trasmissione autosomica dominante (modificato da Longo et al 2002) (13).

(anno 2000) sono state identificate mutazioni in eterozigosi a carico del gene COL4A3 o del gene COL4A4 in famiglie con Alport autosomica dominante (12-14). La presenza di una forma autosomica dominante spiega la presenza del 17% dei figli maschi affetti da padre affetto riportata da Shaw e Kallen nel 1976 (11). Jefferson et al nel 1997 descrivono una famiglia con albero genealogico suggestivo di ereditarietà autosomica dominante, in cui lo studio di *linkage* suggeriva l'associazione tra i geni COL4A3/COL4A4 e l'ATS-AD (22). La caratterizzazione a livello molecolare di tale famiglia ha evidenziato una mutazione di *splicing* a carico del gene COL4A3, che causa la perdita dell'esone 21 (12). Tale mutazione segrega nella famiglia con la malattia ed è presente, in eterozigosi, in tutti i membri affetti, rappresentando la prima evidenza molecolare dell'esistenza della forma autosomica dominante della sindrome di Alport. Si inizia in questo modo a definire la ATS-AD anche clinicamente. Questa viene, infatti, inquadrata come una forma complessivamente più lieve della malattia: tutti i membri affetti della famiglia, ad eccezione del probando e del padre, presentano solo microematuria e proteinuria, con una lieve compromissione della funzionalità renale. Il probando, raggiunge l'insufficienza renale terminale a 35 anni e presenta una lieve ipoacusia neurosensoriale, mentre il padre è riferito soffrire di insufficienza renale prima della morte.

Recentemente, sono stati descritti dal nostro gruppo altri quattro casi di ATS-AD (23). Di questi, tre sono casi sporadici e uno familiare. Tre casi presentano mutazioni in eterozigosi nel gene COL4A3, mentre un caso ha una mutazione nel gene COL4A4. Complessivamente, i pazienti mostrano un quadro clinico lieve, caratterizzato da microe-

maturia, proteinuria e una funzionalità renale conservata in un'età compresa fra i 35 e i 40 anni. Il test molecolare per la forma autosomica dominante di sindrome di Alport è tecnicamente lo stesso di quello per la forma autosomica recessiva, essendo coinvolti gli stessi geni (Fig. 5). Dal 2003 tale test molecolare è stato modificato passando dalla tecnica di SSCP alla più sensibile tecnica di DHPLC.

Caso clinico

Recentemente è giunta alla nostra attenzione una paziente di 31 anni in gravidanza con microematuria isolata dall'età di 13 anni e diagnosi istologica di sindrome di Alport. Il padre della paziente aveva subito trapianto renale a 52 anni. La paziente ha fatto richiesta di diagnosi prenatale. I tempi della gravidanza non sono normalmente compatibili con il test molecolare dei geni della sindrome di Alport (vedi pagina 10). Dal momento che l'albero genealogico e le caratteristiche cliniche della famiglia erano compatibili con la forma ATS-XL semidominante e che la maggior parte dei casi di ATS sono dovuti a mutazione nel gene COL4A5 abbiamo ipotizzato che la signora fosse affetta da ATS-XL e abbiamo effettuato un'indagine prenatale di *linkage* basandoci su questa ipotesi (Fig. 6). L'analisi ha mostrato che il feto maschio aveva ricevuto lo stesso aplotipo del nonno affetto, facendo ipotizzare la presenza della malattia anche nel feto. La madre ha portato a termine la gravidanza e il bambino a 9 mesi presentava microematuria. Il fenotipo del bambino era pertanto in linea con quanto predetto dalla diagnosi prenatale a confer-

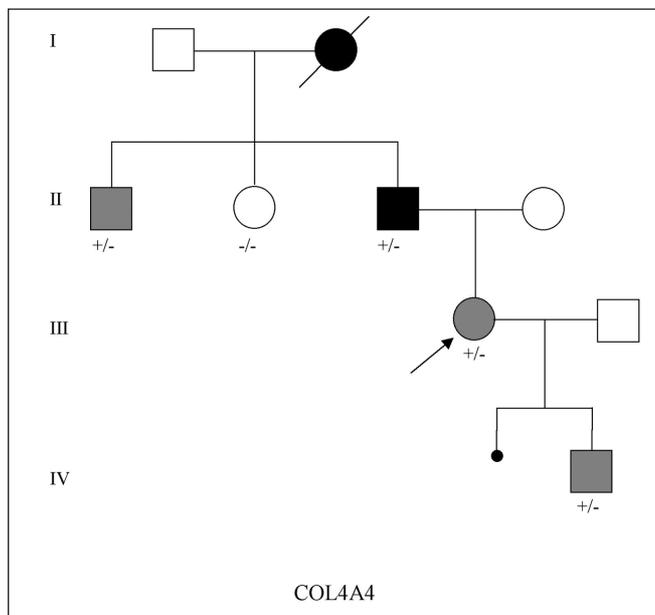


Fig. 6 - Albero genealogico di una famiglia in cui segrega la forma autosomica dominante della sindrome di Alport. La probanda (III-1) è una donna di 31 anni con microematuria isolata dall'età di 13 anni, il figlio IV-1 già a 9 mesi presentava microematuria. Il padre della probanda (II-3) ha subito un trapianto renale all'età di 52 anni. Lo zio II-1 ha lieve insufficienza renale all'età di 59 anni. La zia II-2 non mostra alcun segno della malattia. La nonna I-2 era morta per insufficienza renale. Il simbolo +: indica la mutazione c.2869G>C presente nei soggetti II-1, II-3, III-1, IV-1. La freccia indica il probando, cioè il caso indice. I simboli in nero indicano la manifestazione clinica più grave. I simboli in grigio indicano la manifestazione clinica più lieve (modificato da Pescucci et al, 2003) (22).

ma dell'ipotesi diagnostica di ATS-XL. Solo molti mesi dopo è stata portata a termine l'analisi mutazionale del gene COL4A5 nella signora e tale analisi ha dato esito negativo (vedi pagina 10 per una breve descrizione dei test genetici). Contemporaneamente, l'analisi del pedigree è stata estesa e siamo venuti a conoscenza che uno zio paterno (II-1), a 59 anni, mostrava microematuria e una lieve compromissione della funzionalità renale e che la madre era deceduta, a 41 anni, con insufficienza renale (Fig. 6). L'introduzione di questi nuovi elementi clinici sui familiari, in associazione con il risultato negativo dell'analisi mutazionale del gene COL4A5, faceva rivalutare l'ipotesi diagnostica di ATS-XL a favore della meno nota forma autosomica dominante. Il DNA della probanda è stato quindi analizzato, mediante DHPLC, nei geni COL4A3 e COL4A4. Tale analisi ha messo in evidenza una mutazione a carico di un residuo di glicina nel dominio collagenico del gene COL4A4 (c.2869G>C, p.G957R), presente nella probanda (III-1), nel padre (II-3), nel figlio (IV-2). La stessa mutazione si è rivelata presente nello zio e assente nella zia paterna sana (II-2) (Fig. 6). L'analisi diretta di mutazione ha quindi messo in evidenza la segregazione, all'interno di questa famiglia, della forma ATS-AD (14).

Questo caso clinico mette in evidenza la difficoltà che esiste nel distinguere tra forma autosomica dominante e forma ATS-XL, soprattutto quando si analizzano nuclei familiari piccoli. Al fine di stabilire, all'interno di ciascuna famiglia, la corretta modalità di segregazione della malattia sono necessarie accurate valutazioni cliniche e genetiche delle famiglie stesse. Tale accuratezza di indagine diventa ancora più necessaria quando siamo di fronte a richieste di diagnosi prenatale (24). Questi risultati indicano, inoltre, che la diagnosi prenatale basata sul *linkage* diventa improponibile nelle famiglie piccole, nelle quali non è possibile stabilire con esattezza la modalità di trasmissione analizzando l'albero genealogico. Tale conclusione è particolarmente rilevante se si considera l'aumento delle richieste di diagnosi prenatale nella sindrome di Alport (25).

Caratteristiche cliniche della forma autosomica dominante

Recentemente il nostro gruppo ha descritto, oltre alla famiglia sopra riportata, altre tre famiglie con ATS-AD, per un totale di 25 pazienti. L'analisi di questa casistica ha consentito di tentare una definizione della storia clinica della sindrome di Alport autosomica dominante, fino ad oggi poco nota dato il limitato numero di casi individuati. In questo lavoro sono stati studiati da un punto di vista clinico 25 pazienti con mutazioni in eterozigosi nei geni COL4A3 o COL4A4. Il 9% dei pazienti presenta proteinuria, il 22% episodi di macroematuria, solo il 19% dei pazienti presenta ipoacusia neurosensoriale bilaterale, mentre nessuno ha anomalie oculari. Per quanto riguarda il dato sulla funzionalità renale, tutti i pazienti fra i trenta e i quaranta anni hanno funzionalità renale conservata, mentre tre pazienti su otto (37.5%) presentano insufficienza renale terminale dopo i 50 anni. Se paragoniamo questo dato con quanto accade nella forma X-legata semidominante, nella quale circa il 90% dei pazienti maschi a 40 anni mostra una progressione della malattia fino all'insufficienza renale terminale, emerge chiaramente che la caratteristica più rilevante di questa forma è senz'altro la lenta progressione del danno renale. A questo si accompagna una minor frequenza di danni extra-renali. Nella casistica da noi studiata vengono inoltre riportati tre pazienti (di 12, 22 e 90 anni), appartenenti a tre diverse famiglie, che presentano mutazione ma sono del tutto asintomatici. Come succede per altre malattie autosomiche dominanti, anche la ATS-AD è sottoposta al fenomeno della penetranza incompleta (23). Tale ridotta penetranza deve essere tenuta in considerazione nella valutazione del rischio di ricorrenza e nella diagnosi prenatale.

L'insieme di questi dati conferma l'esistenza della forma ATS-AD, a lungo dibattuta. Tale forma è un'entità clinicamente distinta rispetto alla forma autosomica recessiva, nota già da tempo, ed è caratterizzata da una lenta progressione del danno renale, da una consistente variabilità intra ed inter-

familiare e da una penetranza che sembra aggirarsi intorno al 95% (14). Tale forma è apparentemente molto rara ma probabilmente la sua frequenza è sottostimata. Rifacendosi ai dati di Shaw e Kallen del 1976 sopra citati potrebbe ammontare a circa il 17% di tutti i casi di sindrome di Alport.

Test di verifica

1) Quale modalità di trasmissione ha la sindrome di Alport?

- Legata al cromosoma X
- Dominante
- Autosomica recessiva, autosomica dominante e legata al cromosoma X
- Autosomica dominante e autosomica recessiva
- Autosomica recessiva.

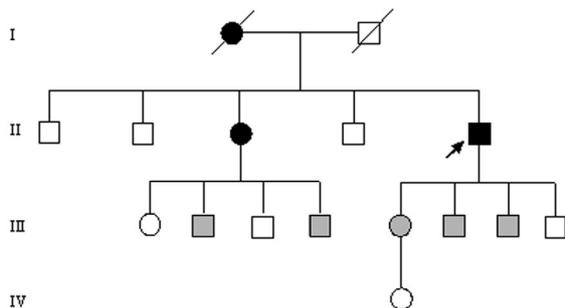
2) La forma autosomica dominante e la forma autosomica recessiva della sindrome di Alport sono dovute a mutazioni di quale/i gene/i?

- COL4A3 e COL4A5
- COL4A5
- COL4A4 e COL4A5
- COL4A4 e COL4A3
- COL1A1.

3) Una signora affetta da sindrome di Alport è entrata in dialisi all'età di 55 anni. Per tale motivo la signora può essere affetta da:

- ATS-XL
- ATS-AR
- Non esistono femmine affette da ATS in dialisi.

4) Dall'osservazione dell'albero genealogico sotto riportato si può dedurre che:



- L'ereditarietà nella famiglia è di tipo X-legato
- Non è possibile stabilire il tipo di ereditarietà nella famiglia
- L'ereditarietà è di tipo autosomico recessivo
- L'ereditarietà è di tipo autosomico dominante.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

La diagnosi differenziale tra le "sindromi" di Alport e la microematuria familiare benigna

La malattia delle membrane basali sottili (TBMD) è caratterizzata istologicamente da un assottigliamento della MBG, rilevabile ad un esame di microscopia elettronica e clinicamente da microematuria isolata, geneticamente da una trasmissione autosomica dominante. La progressione della TBMD verso l'insufficienza renale cronica, anche se riportata in letteratura è molto rara. Per tale motivo la TBMD viene indicata anche come microematuria familiare benigna (BFH) (9). Da un punto di vista genetico la TBMD è probabilmente eterogenea, ma la modalità di trasmissione è sempre descritta come autosomica dominante (26). Poiché un assottigliamento diffuso della MBG potrebbe indicare anche uno stadio precoce di ATS, è stata suggerita una stessa base biologica. Nel 1996 è stata riportata una famiglia con ATS-AR in cui nove soggetti del ramo paterno, che mostravano evidenze cliniche di BFH, erano tutti eterozigoti per una mutazione a carico del gene COL4A4 (27). Tale lavoro suggeriva che i soggetti affetti da BFH potessero essere dei portatori della ATS-AR. La conferma è arrivata da Boye et al, 1998, che studiando la ATS-AR, hanno individuato una famiglia in cui una mutazione del gene COL4A4 in eterozigosi segregava con microematuria ed assottigliamento della membrana basale (28). Infine nel 2001 è stata riportata per la prima volta una famiglia in cui la TBMD era associata ad una mutazione in eterozigosi nel gene COL4A4, ma nessun membro della famiglia mostrava ATS-AR o ATS-XL (28). La stessa mutazione riportata da Buzza, era stata precedentemente identificata da Boye, nel 1998, in eterozigosi composta, in una famiglia con ATS-AR. Successivamente è stato dimostrato che anche mutazioni nel gene COL4A3 sono responsabili di TBMD (30). Pertanto, secondo le conoscenze attuali i portatori di mutazioni in eterozigosi per il gene COL4A4 o COL4A3 possono essere portatori asintomatici di ATS-AR affetti da BFH, o affetti dalla forma ATS-AD. Quindi pare chiaro che non c'è un confine netto tra le diagnosi di ATS-AR, BFH e ATS-AD, ma che esse rappresentano un continuum fenotipico con diversi livelli di gravità. In questa ottica sarebbe più corretto parlare di "malattie del collagene IV". Da un punto di vista clinico è tuttavia importante mantenere l'etichetta di ATS-AR, ATS-AD e BFH perché questa ha un valore prognostico. Per certi aspetti l'analisi molecolare di questi geni del collagene può aiutare la diagnosi ma ha un valore limitato per emettere una prognosi. La diagnosi definitiva sul paziente a cui è correlato l'aspetto prognostico deriva dalla valutazione ponderata dell'analisi molecolare insieme ai dati derivanti da un dettagliato albero genealogico e dai dati derivanti da un attento *follow-up* del paziente e dei familiari. Ricordiamo infine che in alcune famiglie affette da TBMD l'analisi di *linkage* ha escluso un'associazione con i geni COL4A3 e COL4A4, indicando il coinvolgimento di altri geni nella TBMD (25). Un recente lavo-

ro suggerisce che mutazioni a carico dei geni COL4A3 e COL4A4 siano responsabili di circa il 35% dei casi (30). Un recente studio da noi riportato dimostra che pazienti con diagnosi di TBMD e portatori di una mutazione nei geni del collagene COL4A4 o COL4A3 hanno probabilmente una forma non troppo benigna della malattia (10).

Caso clinico

Alla fine del 2003 è giunta alla nostra attenzione una ragazza di 12 anni che presentava microematuria dall'età di 2 anni. Oltre alla microematuria venivano riportati anche episodi di macroematuria. Recentemente era insorta proteinuria (0.4 g/die). Nel 1997, una biopsia renale mostrava frequente assottigliamento delle membrane basali glomerulari e l'anatomopatologo refertava reperti ultrastrutturali compatibili con malattia delle membrane sottili. I genitori in apparente buona salute non mostravano microematuria e la creatinemia era nella norma. Il nonno paterno, di 80 anni, presentava insufficienza renale cronica da causa ignota. Il quadro clinico della paziente (macroematuria e proteinuria) e l'anamnesi familiare (genitori sani) facevano fortemente sospettare la forma autosomica recessiva di sindrome di Alport. Tuttavia l'analisi dei geni COL4A3 e COL4A4 non evidenziava nessuna mutazione. Con nostra grande sorpresa l'analisi del gene COL4A5 ha rivelato la mutazione c.4625C>T all'interno della regione terminale globulare, che causa la trasformazione della glutammina in posizione 1475 in un codone di stop (p.Q1475X). Questa mutazione è di chiaro significato patogenetico in quanto causa la perdita di quasi tutta la porzione globulare della catena α -5 interferendo così con la normale interazione tra le triple eliche. La mutazione non è presente nei genitori e nel nonno paterno la cui insufficienza renale è probabilmente di diversa origine. La paziente è pertanto affetta da una forma X legata della sindrome di Alport da mutazione *de novo*. L'insorgenza *de novo* della mutazione spiega l'assenza della malattia nei genitori della paziente. In questo caso l'analisi molecolare ha dato un risultato che l'insieme dei dati clinici e genealogici davano come meno probabile. L'analisi molecolare ha permesso pertanto il corretto inquadramento diagnostico e prognostico della paziente. È stato possibile inoltre dare un esatto rischio di ricorrenza per la prole. Il 50% dei figli maschi della paziente saranno affetti da ATS

XL ed il 50% delle femmine saranno portatrici con la prognosi discussa nel paragrafo dedicato alla forma X legata.

Riassunto

La sindrome di Alport (ATS) è una nefropatia progressiva eterogenea sia dal punto di vista clinico che genetico. La nefropatia è spesso associata ad ipoacusia neurosensoriale e/o lesioni oculari. Da un punto di vista istologico, la membrana basale del glomerulo (MBG) è caratterizzata da un andamento irregolare dello spessore e dalla presenza di tratti in cui è osservabile uno slaminamento. La malattia è causata da mutazioni in uno dei vari geni che codificano il collagene di tipo IV: gene COL4A3 (collagene di tipo IV, catena alfa-3), oppure gene COL4A4 (collagene di tipo IV, catena alfa-4) oppure gene COL4A5 (collagene di tipo IV, catena alfa-5). La sindrome di Alport è responsabile dell'1-2% di casi di insufficienza renale in Europa e del 2-3% dei casi di trapianto renale negli Stati Uniti. In questo lavoro affronteremo le tre modalità di trasmissione associate alla sindrome di Alport partendo dalla forma più comune, legata al cromosoma X, associata al gene COL4A5, che da sola è responsabile di circa l'85% dei casi. Passeremo poi alle forme autosomiche, associate ai geni COL4A3 e COL4A4. La forma recessiva, responsabile di circa il 10-15% dei casi, è nota già da alcuni anni. Al contrario l'esistenza di una forma autosomica dominante è stata dimostrata solo recentemente grazie all'identificazione di alcune famiglie. Affronteremo inoltre il problema della consulenza genetica, legato anche alla diagnosi differenziale con la malattia delle membrane basali sottili (TBMD). Illustreremo esperienze dirette del nostro gruppo, che mostrano le difficoltà che si possono trovare in sede di consulenza genetica nel dare alle famiglie una prognosi certa o un rischio di ricorrenza nella prole.

Indirizzo degli Autori:
Prof.ssa Alessandra Renieri
Professore Associato Genetica Medica
Università di Siena - Policlinico Le Scotte
Viale Bracci, 2
53100 Siena
e-mail: renieri@unisi.it

Bibliografia

1. Gunwar S, Ballester F, Noelken M, et al. Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. *J Biol Chem* 1998; 273 (15): 8767-75.
2. Boutaud A, Borza D, Bondar O, et al. Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NCI domains. *J Biol Chem* 2000; 275 (39): 30716-24.
3. Wing A, Brunner F. Twenty-three years of dialysis and transplan-

- tation in Europe: experiences of the EDTA Registry. *Am J Kidney Dis* 1989; 14 (5): 341-6.
4. Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, et al. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990; 248: 1224-7.
 5. Alport AC. Hereditary familial congenital hemorrhagic nephritis. *Brit Med J* 1927; 1: 504-6.
 6. Renieri A, Bruttini M, Galli L, et al. X-linked Alport syndrome: an SSCP-based mutation survey over all 51 exons of the COL4A5 gene. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1192-204.
 7. Smeets HJ, Lemmik HH, Van Den Heuvel LPea. Molecular and immunological studies in X-linked and autosomal recessive in Alport syndrome. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 1230.
 8. Mochizuki T, Lemmink HH, Maryiama M, et al. Identification of mutations in the α -3(IV) and α -4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nature Genetics* 1994; 8: 77-82.
 9. Frascà GM, Onetti-Muda A, Renieri A. Thin glomerular basement membrane disease. *J Nephrol* 2000; 13: 15-9.
 10. Frascà GM, Onetti-Muda A, Mari F, et al. Thin glomerular basement membrane disease: clinical significance of a morphological diagnosis- a collaborative study of the Italian Renal Immunopathology Group. *Nephrol Dial Transplant* in press.
 11. Shaw RF, Kallen RJ. Population genetics of Alport's syndrome: hypothesis of abnormal segregation and the necessary existence of mutation. *Nephron* 1976; 16: 427.
 12. Van der Loop FTL, Heidet L, Timmer EDJ, et al. Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation. *Kidney International* 2000; 58: 1870-5.
 13. Longo I, Porcedda P, Mari F, et al. COL4A3/A4 mutation: from benign familial hematuria to autosomal dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney Int* 2002; 61: 1947-56.
 14. 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 (5): 1598-603.
 15. Zhou J, Leinonen A, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagen COL4A5 gene. *J Biol Chem* 1994; 269 (9): 6608-14.
 16. Zhou J, Herz JM, Leinonen A, Tryggvason K. Complete amino acid sequence of the human α -5 collagen chain and identification of a single base mutation in exon 29 from the 3' end converting glycine-521 in the collagenous domain to cysteine in an Alport syndrome patient. *J Biol Chem* 1992; 267: 12475-81.
 17. Renieri A, Galli L, Grillo A, et al. Major COL4A5 gene rearrangements in patients with juvenile type Alport syndrome. *Am J Med Genet* 1995; 59: 380-5.
 18. Renieri A, De Marchi M. New approaches to the DNA diagnosis of Alport syndrome. In Tryggvason K, ed. *Molecular pathology and genetics of Alport syndrome*. Basel: Karger AG; 1996. pp. 183-97.
 19. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, et al. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol* 2000; 17: 649-57.
 20. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, et al. X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a "European Community Alport Syndrome Concerted Action" study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2603-10.
 21. Kleppel MM, Santi PS, Cameron JD, et al. Human tissue distribution of novel basement membrane collagen. *Am J Pathol* 1989; 134: 813-25.
 22. Jefferson JA, Lemmink HH, Hughes AE, et al. Autosomal dominant Alport Syndrome linked to the type IV collagen α -3 and α -4 genes (COL4A3 and COL4A4). *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1595-9.
 23. Pescucci C, Longo I, Bruttini M, et al. Type-IV collagen related diseases. *J Nephrol* 2003; 16 (2): 314-6.
 24. Turco A, Rossetti S, Bresin E, Corra S. Erroneous genetic risk assessment of Alport syndrome. *Lancet* 1995; 346 (8984): 1237.
 25. Pajari H, Koskimies O, Muhonen T, Kaariainen H. The burden of genetic disease and attitudes towards gene testing in Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 1999; 13(6): 471-6.
 26. Piccini M, Casari G, Zhou J, et al. Evidence for genetic heterogeneity in benign familial hematuria. *Am J Nephrol* 1999; 19: 464-7.
 27. Lemmink HH, Nillesen WN, Mochizuki T, et al. Benign familial hematuria due to mutation of the type IV collagen α -4 gene. *J Clin Inv* 1996; 98: 1114-8.
 28. Boye E, Mollet G, Forestier L, et al. Determination of the genomic structure of the COL4A4 gene and of novel mutations causing autosomal recessive Alport Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 1998; 63: 1329-40.
 29. Buzza M, Wang Y, Dagher H, et al. COL4A4 mutation in thin basement membrane disease previously described in Alport syndrome. *Kidney Int* 2001; 60 (2): 480-3.
 30. Wang Y, Rana K, Tonna S, et al. COL4A3 mutations and their clinical consequences in thin basement membrane nephropathy (TBMN). *Kidney Int* 2004; 65 (3): 786-90.

