



## Correlazioni genotipo-fenotipo delle manifestazioni oftalmiche nella sindrome di Marfan

Anna Sangiovanni<sup>1</sup>, Alessio Delfino<sup>1</sup>, Martina Maccarone<sup>1</sup>, Elena Antoniazzi<sup>1</sup>,  
Eloisa Arbustini<sup>2</sup>, Paolo Emilio Bianchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinica Oculistica e <sup>2</sup>Centro per le Malattie Genetiche Cardiovascolari,  
Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

---

### *Correlazioni genotipo-fenotipo delle manifestazioni oftalmiche nella sindrome di Marfan*

La sindrome di Marfan è un disordine del tessuto connettivo causato da mutazioni del gene della fibrillina-1 (*FBNI*). Data l'ampia variabilità fenotipica della malattia e l'identificazione di più di 1,000 mutazioni di *FBNI*, diversi studi si sono posti l'obiettivo di cercare correlazioni genotipo-fenotipo. Obiettivo del presente studio è indagare la presenza di correlazioni genotipo-fenotipo oftalmico in pazienti affetti da sindrome di Marfan. I pazienti inclusi nello studio sono 384, tutti con mutazione causale del gene *FBNI*, suddivisi in cinque gruppi sulla base della tipologia di mutazione: mutazioni missense coinvolgenti una cisteina (Cys), mutazioni missense non Cys e delezioni e inserzioni in-frame, mutazioni nonsense, delezioni e inserzioni frame-shift e mutazioni dei siti di splicing. Le manifestazioni oftalmiche principali riscontrate nel campione sono: patologia lenticolare di forma e posizione, miopia, cornea plana e patologia retinica. La frequenza di queste manifestazioni patologiche nei cinque gruppi di confronto è differente; in particolare nei pazienti con mutazioni missense coinvolgenti una cisteina è stata riscontrata una frequenza maggiore di sublussazione del cristallino (73%) con differenza statisticamente significativa ( $P < 0.001$ ) rispetto agli altri gruppi di confronto; anomalie morfologiche lenticolari (35%); miopia (43%); patologia retinica (17%). Per le ultime tre manifestazioni non è stata però rilevata una differenza statisticamente significativa. Dai nostri risultati è emersa una correlazione tra le mutazioni missense Cys (gruppo 1) e l'ectopia lentis. Questa correlazione è in accordo con l'ipotesi che la corretta localizzazione delle cisteine e dei legami disolfuro che si instaurano tra esse all'interno della proteina svolga un ruolo fondamentale nel determinare la conformazione della fibrillina-1 e l'integrità strutturale delle fibre del legamento sospensore del cristallino.

### *Genotype-phenotype correlations of ophthalmic manifestations in Marfan syndrome*

Marfan syndrome is a connective-tissue disorder due to mutations in fibrillin-1 (*FBNI*) gene. Because of highly variable clinical manifestations and identification of more than 1,000 mutations in *FBNI* many studies aimed to search for genotype-phenotype correlations. The aim of our study is investigating correlations between the genotype and the ocular phenotype in patients affected by Marfan syndrome. The study includes 384 patients presenting a mutation of *FBNI*. We splitted them into five groups according to the different *FBNI* mutations: missense mutations involving a cysteine (Cys), other missense mutations and inframe deletions/insertions, nonsense mutations, frameshift deletions/insertions and splicing mutations. The main ophthalmic manifestations in patients are lens shape and position pathology, myopia, cornea plana and retinal pathology. The frequency of these diseases

was found to be different among the comparison groups; particularly patients with missense mutations involving a cysteine were found to have a higher frequency of the following diseases: ectopia lentis (73%); lens malformation (35%); myopia (43%); retinal pathology (17%). The only statistical significant data is the percentage of patients with ectopia lentis ( $P < 0.001$ ) while the other aren't. These results give as outcome the existence of a correlation between missense mutations Cys (group 1) and ectopia lentis. The hypothesis supporting such a correlation asserts that the correct cysteine localization and disulfide bonding plays an important role in the conformation of fibrillin-1 and structural integrity of the suspensory ligaments of the lens.

---

## Introduzione

La sindrome di Marfan è un disordine ereditario del tessuto connettivo a trasmissione autosomica dominante. La malattia ha una prevalenza di 3 casi su 10,000 individui, senza differenze riguardo al sesso e all'etnia. Oltre il 90% dei casi è determinato da mutazioni del gene *FBNI* codificante la fibrillina-1, proteina che costituisce una delle principali componenti della fibre elastiche e delle fibre collagene della matrice extracellulare. Nel 75% dei casi vi è una storia familiare positiva, mentre nel restante 25%, le mutazioni di *FBNI* sono de novo [1]. Le alterazioni che la caratterizzano colpiscono diversi organi ed apparati, in particolare quello cardiovascolare, scheletrico, oculare, nervoso, cutaneo e respiratorio. La sindrome ha penetranza completa, ma è contraddistinta da un'ampia variabilità fenotipica riguardo l'età d'insorgenza, l'interessamento d'organo e la severità delle manifestazioni cliniche, sia a livello interfamiliare che intrafamiliare [2-3]. Il problema di maggiore rilevanza associato alla sindrome è la dilatazione aneurismatica del bulbo aortico associata al rischio di dissecazione dell'aorta, evento spesso alla base di decessi prematuri e improvvisi.

### *Fibrillina-1*

La fibrillina-1 è una glicoproteina delle matrici extracellulare codificata dal gene *FBNI* mappato sul braccio lungo del cromosoma 15 (15q21), gene che comprende 65 esoni e si estende per circa 235 kb. È una proteina che ha un peso molecolare di 320 kD ed è costituita da domini multipli. Tre di questi domini, il modulo EGF-like, il modulo TGFβ1 binding-protein-like e il modulo Fib, ibrido dei due moduli precedenti, sono ripetuti [4]. Il dominio EGF-like è ricco di cisteine che interagiscono fra loro formando ponti disolfuro, i quali determinano la conformazione a foglietto β della proteina. Il modulo è ripetuto 47 volte, 43 delle quali contiene una sequenza che media il legame con il calcio, necessario per stabilizzare la struttura terziaria della proteina, per promuovere le interazioni tra proteine e per resistere alla proteolisi [5-7]. Il dominio TGFβ1 binding-protein-like è ripetuto 7 volte e contiene otto residui di cisteina. Completano la proteina tre regioni non ripetute: un dominio ricco di proline, la regione amino-terminale e la regione carbossi-terminale. I monomeri di fibrillina-1 polimerizzano per costituire le microfibrille extracellulari distribuite in numerosi tessuti, sia elastici come la pelle, i tendini e la parete dei vasi, che non elastici come la cartilagine e le fibre zonulari (apparato sospensore del cristallino).

### *Genetica e fisiopatologia*

Ad oggi sono state descritte più di 1,000 mutazioni di *FBNI* distribuite lungo l'intero gene senza predilezione per alcuna regione [8-11]. Diversi sono i tipi di mutazione riscontrati e si possono raggruppare in due classi principali: mutazioni missense e mutazioni che risultano in una proteina più corta. Le prime sono per lo più localizzate nei domini EGF-like, le seconde comprendono le mutazioni nonsense, le inserzioni e delezioni e gli errori di splicing. Due sono le ipotesi patogenetiche proposte per spiegare come mutazioni del gene *FBNI* siano responsabili dello sviluppo della sindrome di Marfan: l'aploinsufficienza

e la dominanza negativa. Nel primo caso la fibrillina-1 mutata non è sintetizzata o è rapidamente distrutta con conseguente riduzione del livello di proteina nei tessuti; nel secondo invece la fibrillina-1 mutata si lega con le molecole normali esercitando così un effetto tossico sulla deposizione, stabilità e funzione della proteina prodotta dall'allele non mutato [12-13]. È possibile che alcune mutazioni agiscano attraverso il meccanismo di aploinsufficienza, mentre altre mediante un effetto dominante negativo [14].

### **Manifestazioni oftalmiche**

In letteratura sono state descritte numerose manifestazioni oculari [15-17] associate alla sindrome di Marfan, in particolare a carico del cristallino, dell'iride e del corpo ciliare, della cornea, del bulbo oculare e della retina [18]. Le anomalie lenticolari sono le principali e si distinguono in tre tipi: anomalie di posizione, sublussazione e lussazione del cristallino; anomalie di forma, microsferofachia e coloboma lenticolare; ed alterazioni di trasparenza, ossia la cataratta [19-20]. La miopia è la seconda più frequente manifestazione, spesso precoce e severa, può essere associata sia a un aumento della lunghezza assiale del bulbo oculare che ad un aumento di curvatura del cristallino per rilassamento delle fibre zonulari o sferofachia. Altra ametropia riscontrata è l'astigmatismo, spesso marcato e irregolare, dovuto alla possibile inclinazione della lente sublussata. Le patologie retiniche sono la corioretinosi miopica, complicanza di una miopia elevata ed il distacco di retina [21]. Nei pazienti affetti da sindrome di Marfan la curvatura corneale tende ad essere inferiore alla norma con conseguente decremento del suo potere diottrico, tale reperto è definito cornea plana [22]. A carico dell'iride e corpo ciliare sono possibili l'ipoplasia dell'iride e del muscolo dilatatore della pupilla, che sembra causare la scarsa dilatazione della pupilla e l'ipoplasia del muscolo ciliare. È stato poi riportato che la prevalenza di glaucoma negli individui affetti da sindrome di Marfan è maggiore rispetto alla popolazione generale, in particolare il glaucoma primario ad angolo aperto è il più comune e sembra determinato da alterazioni a livello del canale di Schlemm con impedimento al deflusso dell'umor acqueo [23].

Di tutte queste manifestazioni l'ectopia lentis è l'unica che rientra nei criteri diagnostici maggiori per la sindrome di Marfan. Tuttavia la presenza di un miopia > -3 diottrie rappresenta uno dei criteri presi in considerazione per valutare l'interessamento sistemico associato alla sindrome [24-25].

### **Background**

Peculiarità della sindrome di Marfan è l'ampia variabilità fenotipica in particolare riguardo l'interessamento dei diversi apparati e la gravità delle manifestazioni cliniche. Alla luce di questa eterogeneità fenotipica alcuni studi si sono posti il problema di cercare correlazioni genotipo-fenotipo nei soggetti affetti con mutazione causale di *FBNI*. Da questi studi sono emerse una serie di correlazioni genotipo-fenotipo legate sia la tipologia di mutazione che alla localizzazione della mutazione, tra queste vi è un'associazione statisticamente significativa tra mutazioni missense che sostituiscono o creano una cisteina e l'ectopia lentis [10, 26-32].

### **Scopo del lavoro**

Per quanto riguarda il sistema oculare, negli studi condotti fino ad ora di correlazione genotipo-fenotipo nella sindrome di Marfan, è stata indagata solo l'ectopia lentis. Poiché sono state descritte diverse manifestazioni patologiche a livello oculare e numerose mutazioni del gene *FBNI*, si è deciso di indagare la correlazione geno-fenotipica delle manifestazioni oftalmiche.

## Materiali e metodi

Presso la Fondazione IRCSS Policlinico San Matteo di Pavia si trova il Centro per le Malattie Genetiche Cardiovascolari (CMGC), uno fra i centri specializzati nella diagnosi e cura di patologie cardiovascolari di origine genetica, tra cui la sindrome di Marfan. Tale centro, prevede un percorso diagnostico multidisciplinare: prima clinico con la valutazione delle manifestazioni della sindrome a livello dei diversi apparati attraverso visita specialistica ortopedica, cardiologica e oculistica, e poi genetico con il prelievo di sangue per lo studio del gene *FBN1*. A completamento del percorso viene eseguita una consulenza genetica. Presso la Clinica Oculistica della stessa Fondazione tra il 2003 e 2011 sono stati valutati quasi 2000 pazienti afferenti al CMGC con sospetto di sindrome di Marfan. I pazienti risultati positivi ad una prima indagine clinica, comprendente visita cardiologica, ortopedica ed oculistica, sono stati sottoposti ad indagine molecolare del gene *FBN1*.

### *Visita oculistica*

Tutti i pazienti giunti presso la clinica oculistica sono stati interrogati per raccogliere una completa anamnesi oculare e sottoposti ad una serie di esami strumentali:

- acuità visiva per lontano;
- biomicroscopia (lampada a fessura): eseguita in un primo momento in miosi per la valutazione del segmento anteriore dell'occhio ed in seguito in midriasi per la valutazione della posizione, forma e trasparenza del cristallino e dell'integrità del legamento sospenditore;
- oftalmoscopia indiretta per la valutazione del segmento posteriore dell'occhio, mediante combinazione di lente a contatto (lente di Goldmann) o non a contatto (lente di Volk) e lampada a fessura;
- cheratometria; consiste nella misurazione della curvatura corneale ed è stata effettuata con lo IOLmaster. In particolare sono state misurate la K1, raggio corneale con curvatura minore e la K2, raggio corneale con curvatura maggiore e da queste è stata ricavata la Km (media tra K1 e K2).

### *Analisi molecolare del gene FBNI*

La ricerca delle mutazioni sul gene *FBNI* (15q21.1) è stata effettuata prelevando un campione di sangue periferico dal paziente, previa informazione e acquisizione del consenso informato. Il DNA estratto dal sangue è stato amplificato con PCR (reazione a catena della polimerasi) usando primers specifici noti per il gene *FBNI*. Sui prodotti della PCR è stata effettuata l'analisi DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography) tramite il WAVE DNA fragment analysis system (Transgenomic) e nei casi di pattern di anomalità all'analisi del DHPLC i prodotti sono stati sequenziati.

### *Analisi statistica*

Sono state calcolate statistiche descrittive per tutte le variabili; media e deviazione standard per le variabili numeriche distribuite normalmente, mediana ed intervallo interquartile per le variabili continue distribuite in modo asimmetrico e frequenze assolute e percentuali per le variabili categoriche. Per i confronti tra gruppi sono stati utilizzati il test t di Student (due gruppi) o l'Anova (più di due gruppi) per variabili continue distribuite normalmente, il test di Mann-Whitney (due gruppi) o di Kruskal-Wallis (più di due gruppi) per variabili continue distribuite in modo asimmetrico, il test Chi quadrato o il test esatto di Fisher (ove appropriato) per le variabili categoriche. In tutti i casi sono stati utilizzati test a due code. È stato considerato significativo un valore di P-value <0.05.

## Risultati

In 384 pazienti visitati presso la Clinica Oculistica è stata trovata la mutazione causale nel gene *FBNI*. Ai fini dello studio il campione di pazienti è stato suddiviso in 5 gruppi in funzione della tipologia di mutazione:

1. Gruppo 1: mutazioni missense coinvolgenti l'aminoacido cisteina (Cys).
2. Gruppo 2: mutazioni missense non coinvolgenti l'aminoacido cisteina e delezioni ed inserzioni in-frame, cioè che non spostano la cornice di lettura a livello dell'mRNA.
3. Gruppo 3: mutazioni nonsense, determinanti la trasformazione di un codone codificante per un aminoacido in un codone di stop (PTC) con blocco prematuro della sintesi della proteina.
4. Gruppo 4: mutazioni frame-shift, cioè che causano lo slittamento del modulo di lettura delle triplette dell'mRNA e traduzione non corretta della proteina a valle della mutazione.
5. Gruppo 5: mutazioni che alterano il processo di splicing.

Le mutazioni missense rappresentano il 51% delle mutazioni nel campione di pazienti (196 su 384), di queste il 45% coinvolgono una cisteina (89 su 384). Le mutazioni nonsense sono il 21% (81 su 384), le inserzioni e delezioni in-frame 2% (6 su 384), le frameshift 12% (46 su 384) e le mutazioni dei siti di splicing 14% (55 su 384) (Figura 1). Il 48% dei pazienti sono femmine, il 52% maschi. La distribuzione dell'età alla diagnosi nel campione di pazienti è mostrata in figura 2, la mediana è di 26 anni con un intervallo interquartile di 12-40 anni. Tra i cinque gruppi di confronto non si riscontra una differenza statisticamente significativa per la variabile età alla diagnosi ( $P=0.31$ ).

È stata indagata la presenza o l'assenza delle principali manifestazioni oftalmiche associate alla sindrome di Marfan: sublussazione, anomalie morfologiche e opacità del cristallino, cornea plana ( $Km \leq 41.5$  D), miopia (superiore a -3 diottrie), patologia retinica, subatrofia iridea ed infine glaucoma. La frequenza delle singole manifestazioni nel campione di pazienti è riportata in figura 3. Il 38% dei pazienti presenta una sublussazione del cristallino, le direzioni della sublussazione più frequenti sono quelle superiore (31%), supero-nasale (28%) e supero-temporale (20%) (Figura 4). Il 21% dei soggetti presenta anomalie della morfologia lenticolare, quali microsferofachia, coloboma e margine irregolare, il 14% opacità lenticolare. Il 50% dei pazienti presenta una cornea plana, definita come valore di  $Km < 41.5$  D. La frequenza di miopia  $> -3$  diottrie è 35%, quella di patologia retinica, intesa come distacco di retina è 11%. Il 14% dei pazienti presenta subatrofia iridea e il 2% è affetto da glaucoma. È stata valutata la frequenza delle manifestazioni patologiche all'interno di ciascuno dei cinque gruppi di confronto per indagare la presenza di correlazioni genotipo-fenotipo (Tabella 1). L'ectopia lentis si presenta con percentuale maggiore (73%) nel gruppo 1 (mutazioni missense Cys) e con percentuale minore nei gruppi 3 (22%) e 4 (24%) e tra i gruppi di confronto si evidenzia una differenza statisticamente significativa ( $P < 0.001$ ) (Figura 5). La frequenza maggiore (35%) di malformazioni lenticolari si riscontra nel gruppo 1 (mutazioni missense Cys) rispetto agli altri quattro gruppi di confronto, ma non si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i cinque gruppi ( $P=0.055$ ). La frequenza di opacità lenticolare all'interno dei cinque gruppi è maggiore nel gruppo 2 (20%) e inferiore nel gruppo 1 (4%) ma non si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i cinque gruppi di confronto ( $P=0.079$ ). È stata valutata la frequenza di patologia lenticolare, intesa come la presenza di almeno un'anomalia del cristallino. La frequenza maggiore di patologia lenticolare è maggiore nel gruppo 1 (75%) e si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i cinque gruppi ( $P < 0.001$ ) (Tabella 2). La frequenza di miopia  $> -3$  diottrie è maggiore (43%) nel gruppo 1 e minore nel gruppo 4 (17%), ma non si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i cinque gruppi ( $P=0.111$ ). La patologia retinica, intesa come distacco di retina, è presente con frequenza maggiore nei gruppi 1 (17%) e 5 (18%), con frequenza minore (2%) nel gruppo 4. Non si evidenzia una differenza statisticamente

significativa tra i cinque gruppi di confronto ( $P=0.058$ ). La frequenza maggiore di subatrofia iridea si riscontra nei gruppi 1 e 3 (19%), la frequenza minore nel gruppo 4 (10%), ma non si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i cinque gruppi di confronto ( $P=0.296$ ). La frequenza maggiore di glaucoma si riscontra nei gruppi 2 e 5 (4%), mentre nei gruppi 3 e 4 nessun paziente presenta tale patologia, non si evidenzia però una differenza statisticamente significativa tra i cinque gruppi ( $P=0.303$ ). È stata valutata la Best Corrected Visual Acuity (BCVA) nel totale del campione di pazienti ed in ogni gruppo di confronto (Figura 6). Questa mostra una mediana di 1 (10/10) con un intervallo interquartile di 0.8-1 (8/10-10/10). Il gruppo 1 presenta la BCVA inferiore (mediana di 9/10 e intervallo interquartile di 6/10-10/10) mentre i gruppi 3 e 4 quella migliore (mediana di 10/10). Si evidenziano differenze statisticamente significative tra il gruppo 1 e il gruppo 2 ( $P<0.001$ ), tra il gruppo 1 e il gruppo 3 ( $P<0.001$ ) e tra il gruppo 1 e il gruppo 4 ( $P<0.001$ ).

## Discussione

L'età media dei pazienti al momento della diagnosi è di 26 anni, si tratta quindi di un campione di pazienti giovani. Non si evidenzia una differenza tra i gruppi di confronto, non vi è quindi una correlazione tra un particolare tipo di mutazione e il precoce sviluppo di manifestazioni oculari.

L'ectopia lentis (EL) è la più nota manifestazione oculare nella sindrome di Marfan, la frequenza è pari al 38% e si discosta in modo sostanziale dalle percentuali riportate in letteratura [18, 20], variabili da 50% al 80%. A nostro parere il motivo di tale differenza risiede nella diversità dell'iter diagnostico: alla nostra clinica giungono pazienti con diagnosi o sospetto diagnostico di sindrome di Marfan in cui vengono indagate le principali manifestazioni oftalmiche correlate alla patologia, mentre nella maggior parte degli studi riscontrabili in letteratura il percorso è inverso. All'evidenza clinica di EL consegue una valutazione diagnostica per sindrome di Marfan (essendo la causa più frequente di EL), ne consegue, logicamente, che i pazienti affetti da sindrome di Marfan che non presentano manifestazioni oftalmiche verranno sottoposti all'iter diagnostico del caso con minore probabilità.

L'EL si presenta con percentuale maggiore (73%) nel gruppo 1 (mutazioni missense coinvolgenti una cisteina) e con percentuale minore nei gruppi 3, mutazioni nonsense (22%) e 4, delezioni e inserzioni out of frame (24%), mutazioni queste ultime che determinano entrambe la formazione di una proteina più corta. Inoltre tra i cinque gruppi di confronto si evidenzia una differenza statisticamente significativa ( $P<0.001$ ) per quanto riguarda la frequenza di EL. Ciò è in accordo con quanto descritto precedentemente in letteratura [10, 26-32] e con l'ipotesi che la corretta localizzazione delle cisteine e dei ponti disolfuro giochino un ruolo fondamentale nel determinare la struttura della fibrillina-1 con particolare interesse strutturale nelle fibre del legamento sospensore del cristallino. Nel campione di pazienti la direzione di EL più frequentemente è la superiore ed in particolare nelle direzioni superiore (31%), supero-nasale (28%) e supero-temporale (20%), mentre in letteratura è riportato che la direzione più comune della sublussazione del cristallino è supero-temporale [18, 20]. Tale diversità può essere spiegata, in parte, considerando che non esiste un parametro oggettivo che indichi la direzione della sublussazione, ma tale valutazione è fatta dal medico oftalmologo mediante biomicroscopia ed è quindi operatore-dipendente. In ogni caso, certamente, la direzione preferenziale di EL risulta essere la superiore e, nella nostra esperienza, le sublussazioni in campo nasale ed inferiore sono maggiormente correlate ad uno stadio più avanzato di patologia oculare. Tra i cinque gruppi di confronto non si evidenzia una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda la direzione di EL. Le anomalie della morfologia lenticolare, quali microsferofachia, coloboma, margine irregolare e l'opacità lenticolare mostrano una frequenza rispettivamente del 21% e 14%, ma non vi sono dati di letteratura con cui

fare un confronto. Non si evidenziano differenze statisticamente significative tra i cinque gruppi di confronto nonostante vi sia una frequenza maggiore di anomalie morfologiche lenticolari nel gruppo 1 (35%). Questo dato fa ipotizzare che la fibrillina-1 oltre ad avere un ruolo nel mantenere l'integrità strutturale delle fibre del legamento sospensore del cristallino, abbia un ruolo nella morfogenesi lenticolare durante l'embriogenesi. I pazienti appartenenti al gruppo 1 presentano la frequenza maggiore di cristallino patologico (75%), includendo in tale sottogruppo tutte e tre le patologie lenticolari; EL, malformazione lenticolare ed opacità lenticolare. Tale differenza, rispetto agli altri gruppi, risulta essere statisticamente significativa ( $P < 0.001$ ). Questo dato sembra confortare ulteriormente l'ipotesi che le mutazioni coinvolgenti la cisteina determinino un fenotipo lenticolare più grave. La miopia rappresenta la seconda più comune manifestazione oftalmica nei soggetti affetti da sindrome di Marfan. La presenza di miopia, in particolare miopia superiore alle -3 diottrie rappresenta uno dei criteri diagnostici che contribuisce al score sistemico per la valutazione dell'interessamento generale nella MFS [25]. Tale criterio è stato incluso nelle variabili analizzate nello studio ed è stato riscontrato nel 35% dei pazienti, rappresentando la terza manifestazione oftalmica dopo la EL e la cornea plana nel campione. La miopia si presenta con frequenza maggiore (43%) nel gruppo 1 e minore nel gruppo 4 (17%), ma non si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i cinque gruppi di confronto ( $P = 0.111$ ). La seconda manifestazione oftalmica nel campione di pazienti (50%) è la cornea plana, cioè una cornea con curvatura ridotta. Il valore soglia utilizzato nello studio per definire una cornea plana è una  $K_m \leq 41.5$  D ed è stato scelto poiché era incluso nei criteri diagnostici minori della nosologia di Ghent del 1996 [24]. La cornea plana è stata recentemente eliminata dai criteri diagnostici (revisione della nosologia del 2010), ma rimane una delle manifestazioni oftalmologiche di maggior rilievo (almeno in termini di frequenza). Probabilmente la scelta di eliminare questo sensibile dato dall'arsenale dei criteri diagnostici è da correlare al fatto che non rappresenta un parametro valutato routinariamente dall'oftalmologo, ma che deve essere esplicitamente richiesto dal genetista. Le ultime tre manifestazioni oftalmiche analizzate nello studio sono la patologia retinica, intesa come distacco di retina, la subatrofia iridea ed il glaucoma, che hanno una frequenza rispettivamente dell'11%, 14% e 2% nel campione di pazienti. In accordo con la letteratura [18, 20] la frequenza di distacco di retina è maggiore nei soggetti affetti da sindrome di Marfan rispetto alla popolazione generale, ciò è associato con un'augmentata lunghezza assiale del bulbo, per cui la retina è sottoposta ad uno stiramento anomalo con conseguente riduzione dell'efficienza vascolare e maggiori probabilità di lesioni regmatogene. Si riscontra con frequenza maggiore nei gruppi 1 (17%) e 5 (18%) ma non si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i cinque gruppi ( $P = 0.058$ ). La subatrofia iridea presenta una frequenza concorde con quella riportata in letteratura [18, 20], non è però specifica per la sindrome e quindi non ha utilità diagnostica; per tale motivo è stata rimossa dai criteri diagnostici di Ghent rivisti nel 2010. La frequenza di glaucoma nel campione di pazienti affetti da sindrome di Marfan è uguale a quella della popolazione generale [33], rappresenta quindi, nel nostro campione, una manifestazione aspecifica e senza utilità diagnostica. Per quanto riguarda la frequenze di subatrofia iridea e di glaucoma, non si evidenziano differenze statisticamente significative tra i cinque gruppi di confronto.

I pazienti affetti da sindrome di Marfan inclusi nello studio presentano una buona Best Corrected Visual Acuity (BCVA), quelli appartenenti al gruppo 1 presentano la BCVA più bassa (8/10) e si evidenziano differenze statisticamente significative tra il gruppo 1 e il gruppo 2 ( $P < 0.001$ ), tra il gruppo 1 e il gruppo 3 ( $P < 0.001$ ) e tra il gruppo 1 e il gruppo 4 ( $P < 0.001$ ). Tale risultato è probabilmente dovuto alla frequenza più alta di patologia lenticolare, miopia e patologia retinica nei pazienti appartenenti al gruppo 1 (mutazione missense coinvolgente una cisteina). Questi ultimi dati supportano ulteriormente l'ipotesi di un fenotipo oftalmologico più grave nei pazienti con mutazioni coinvolgenti la cisteina.

Dal confronto tra le cinque tipologie di mutazione si evidenzia che i pazienti appartenenti al gruppo 1, portatori di una mutazione missense coinvolgente una cisteina, mostrano la percentuale maggiore di

sublussazione del cristallino, anomalie della morfologia lenticolare, miopia e patologia retinica, che come si evince dallo studio rappresentano le principali manifestazioni oftalmiche associate alla sindrome di Marfan. Si può quindi ipotizzare che la corretta localizzazione delle cisteine e dei ponti disolfuro giochi un ruolo fondamentale nel determinare la struttura e la funzione della fibrillina-1 all'interno delle diverse strutture oculari e che mutazioni missense che coinvolgono una cisteina determinino un sovvertimento strutturale della proteina tale da favorire l'insorgenza delle manifestazioni patologiche. Il riscontro di tale associazione riserva un indubbio valore sulla gestione clinica del paziente con mutazione missense in cisteina. L'oftalmologo deve porre attenzione a tutti i pazienti affetti da sindrome di Marfan, ma ancora più attenzione ai pazienti con mutazioni coinvolgenti cisteine, non potendo prescindere da un'accurata visita oftalmologica al momento della diagnosi, con particolare attenzione al cristallino. In questi pazienti il follow-up sarà necessariamente più stretto.

## Tabelle e figure

**Tabella 1. Frequenza di manifestazioni oftalmiche nei cinque gruppi di confronto.**

Variabili	Stato	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	Gruppo 4	Gruppo 5	P-value
Sublussazione del cristallino	presente	61 (73%)	33 (30%)	17 (22%)	11 (24%)	18 (33%)	<0.001
	assente	23 (27%)	77 (70%)	61 (78%)	34 (76%)	36 (68%)	
Morfologia lenticolare	patologica	19 (35%)	15 (16%)	15 (22%)	5 (12%)	8 (18%)	0.055
	normale	35 (65%)	78 (84%)	53 (78%)	35 (88%)	36 (82%)	
Opacità lenticolare	presente	2 (4%)	19 (20%)	10 (14%)	6 (15%)	6 (13%)	0.079
	assente	51 (96%)	75 (80%)	64 (86%)	35 (85%)	40 (87%)	
Miopia >-3 D	presente	20 (43%)	31 (35%)	24 (38%)	7 (17%)	17 (36%)	0.111
	assente	26 (57%)	57 (65%)	39 (62%)	33 (83%)	30 (74%)	
Patologia retinica	presente	13 (17%)	8 (8%)	7 (9%)	1 (2%)	9 (18%)	0.058
	assente	65 (83%)	98 (92%)	72 (91%)	45 (98%)	41 (82%)	
Subatrofia iridea	presente	16 (19%)	11 (11%)	15 (19%)	4 (9%)	6 (12%)	0.296
	assente	70 (81%)	92 (89%)	63 (81%)	40 (10%)	44 (88%)	
Glaucoma	presente	2 (2%)	4 (4%)	0	0	2 (4%)	0.303
	assente	84 (98%)	102 (96%)	79 (100%)	45 (100%)	50 (96%)	

**Tabella 2. Frequenza di patologia lenticolare nei cinque gruppi di confronto.**

Patologia lenticolare	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	Gruppo 4	Gruppo 5	P-value
Presente	67 (75%)	52 (46%)	24 (30%)	17 (37%)	25 (45%)	<0.001
Assente	22 (25%)	61 (54%)	55 (70%)	29 (63%)	30 (55%)	



Figura 1. Distribuzione delle mutazioni nei cinque gruppi di confronto.

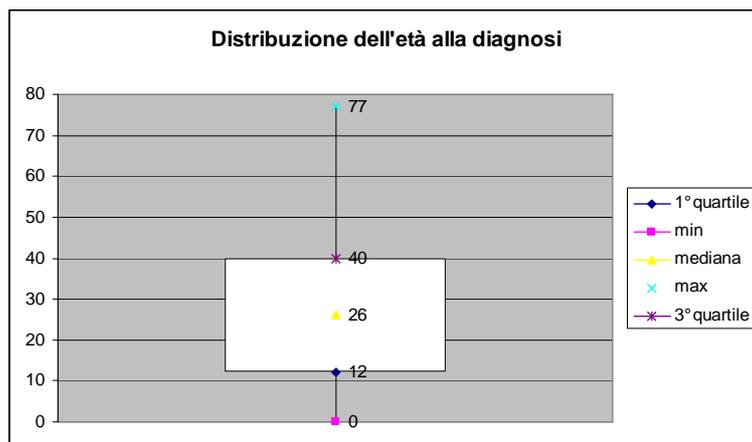


Figura 2. Box-plot dell'età alla diagnosi nel campione di pazienti.

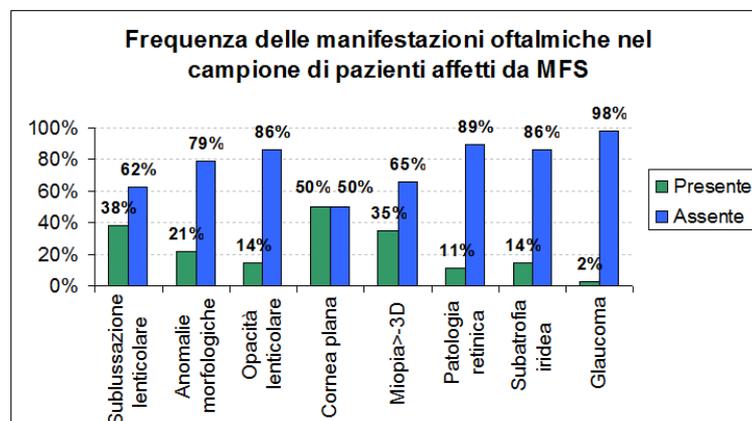


Figura 3. Frequenza delle manifestazioni oftalmiche nel campione di pazienti.

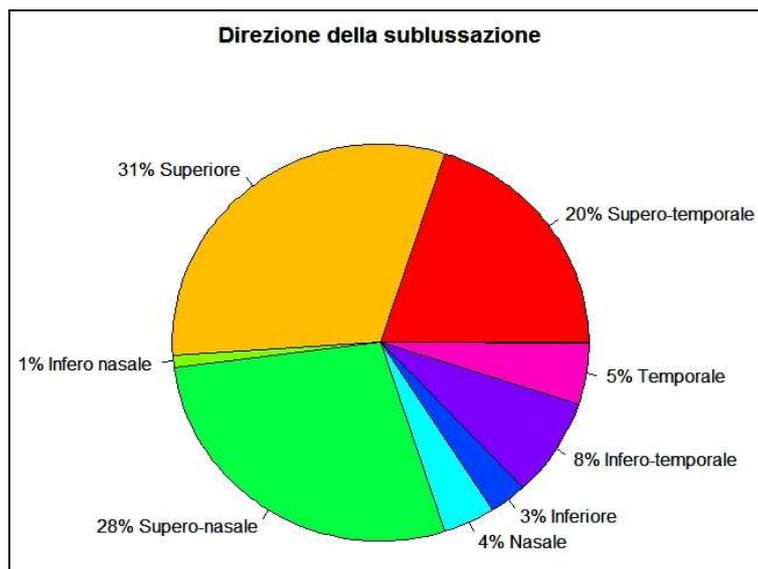


Figura 4. Frequenza delle direzioni della sublussazione nel campione di pazienti.

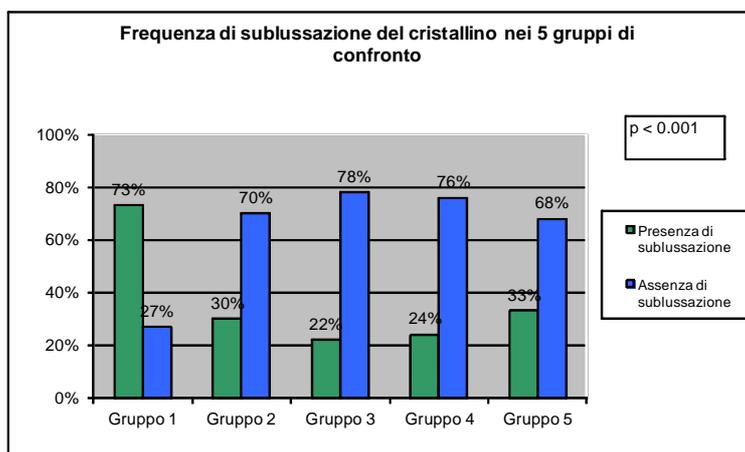


Figura 5. Frequenza di ectopia lentis (EL) nei cinque gruppi di confronto.

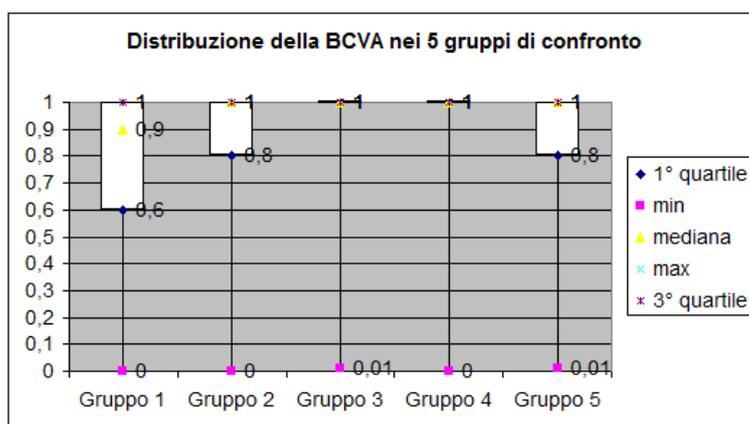


Figura 6. Box-plot della BCVA nei cinque gruppi di confronto.

## Bibliografia

1. Dietz HC, Pyeritz RE. Mutations in the human gene for fibrillin-1(FBN1) in the Marfan Syndrome and related disorders. *Hum Mol Genet* 1995;4:1799-1809.
2. Pyeritz RE. The Marfan syndrome. *Annu Rev Med* 2000;51:481-510.
3. Judge DP, Dietz HC. Marfan's syndrome. *Lancet* 2005;366:1965-1976.
4. Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 1986;103:2499-2509.
5. Knott V, Downing AK, Cardy CM et al. Calcium binding properties of an epidermal growth factor-like domain pair from human fibrillin-1. *J Mol Biol* 1996;255:22-27.
6. Reinhardt DP, Mechling DE, Boswell BA et al. Calcium determines the shape of fibrillin. *J Biol Chem* 1997;272:7368-7373.
7. Reinhardt D, Ono RN, Sakai LY. Calcium stabilizes fibrillin-1 against proteolytic degradation. *J Biol Chem* 1997;272:1231-1236.
8. Collod-Beroud G, Le Bourdelles S, Ades L et al. Update of the UMD-FBN1 mutation database and creation of an FBN1 polymorphism database. *Hum Mutat* 2003;22:199-208.
9. Faivre L, Collod-Beroud G, Loyes BL et al. Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study. *Am J Hum Genet* 2007;81:454-466.
10. Faivre L, Collod-Beroud G, Child A et al. Contribution of molecular analyses in diagnosing Marfan syndrome and type I fibrillinopathies: an international study of 1009 probands. *J Med Genet* 2008;45:384-390.
11. <<www.ensembl.org>>
12. Dietz HC, McIntosh I, Sakai LY et al. Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics* 1993;17:468-475.
13. Liu W, Qian C, Comeau K et al. Mutant fibrillin-1 monomers lacking EGF-like domains disrupt microfibril assembly and cause severe Marfan syndrome. *Hum Mol Genet* 1996;5:1581-1587.
14. Robinson PN, Arteaga-Solis E, Baldock C et al. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet* 2006;43:769-787.
15. Ashworth JL, Kieley CM, McLeod D. Fibrillin and the eye. *Br J Ophthalmol* 2000;84:1312-1317.
16. Mir S, Wheatley HM, Maumenee-Hussels IE. A comparative histologic study of the fibrillin microfibrillar system in the lens capsule of normal subjects and subjects with Marfan syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:84-93.
17. Farnsworth P, Burke P, Dotto M. Ultrastructural abnormalities in a Marfan syndrome lens. *Arch Ophthalmol* 1977;95:1601-1606.
18. Maumenee IH. The eye in the Marfan syndrome. *Trans Am Ophth Soc* 1981;79:684-733.
19. Nelson LB, Maumenee IH. Ectopia Lentis. *Surv Ophthalmol* 1982;27:143-160.
20. Nemet AY, Assia EI, Apple DJ et al. Current Concepts of Ocular Manifestations in Marfan Syndrome *Surv Ophthalmol* 2006;51:561-575.
21. Remulla JF, Tolentino FI. Retinal detachment in Marfan's syndrome. *Int Ophthalmol Clin* 2001;41:235-240.
22. Heur M, Costin B, Crowe S et al. The Value of Keratometry and Central Corneal Thickness Measurements in the Clinical Diagnosis of Marfan Syndrome. *Am J Ophthalmology* 2008;145:997-1001.
23. Izquierdo NJ, Traboulsi EI, Enger C et al. Glaucoma in the Marfan syndrome. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1992;90:111-117.
24. De Paepe A, Devereux R, Dietz H et al. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am J Med Genet* 1996;62:417-426.
25. Loyes BL, Dietz HC, Braverman AC et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet* 2010;47:476-485.
26. Pepe G, Giusti B, Evangelisti L et al. Fibrillin-1 (FBN1) gene frameshift mutations in Marfan patients: genotype-phenotype correlations. *Clin Genet* 2001;59:444-450.
27. Robinson PN, Booms P, Katzke S et al. Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Hum Mutat* 2002;20:153-161.
28. Biggin A, Holman K, Brett M et al. Detection of thirty novel FBN1 mutations in patients with Marfan syndrome or a related fibrillinopathy. *Hum Mutat* 2004;23:99.
29. Rommel K, Karck M, Haverich A et al. Identification of 29 novel and nine recurrent fibrillin-1 (FBN1) mutations and genotype-phenotype correlations in 76 patients with Marfan syndrome. *Hum Mutat* 2005;26:529-539.
30. Turner CLS, Emery H, Collins AL et al. Detection of 53 FBN1 mutations and genotype-phenotype correlations in 113 unrelated probands referred with Marfan syndrome, or related fibrillinopathy. *Am J Med Genet Part A* 2007;149:161-170.
31. Rand-Hendriksen S, Tjeldhorn L, Lundby R et al. Search for correlations between FBN1 genotype and complete Ghent phenotype in 44 unrelated norwegian patients with Marfan syndrome. *Am J med Genet P* 2007;143:1968-1977.
32. Faivre L, Collod-Beroud G, Callewaert B et al. Clinical and mutation-type analysis from an international series of 198 probands with a pathogenic FBN1 exons 24-32 mutation. *Eur J Hum Genet* 2009;17:491-501.
33. Izzotti A, Di Marco B, De Flora S et al. Glaucoma: epidemiologia molecolare, patogenesi, prevenzione. *Recenti progressi in medicina* 2006;1:37-45.