

PROGRESOS EN HEPATOLOGÍA

Avances en el diagnóstico molecular de la enfermedad de Wilson

Celia Badenas Orquin

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, España. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER)-Instituto de Salud Carlos III

Recibido el 30 de diciembre de 2010; aceptado el 15 de enero de 2011
Disponibile en Internet el 17 de marzo de 2011

PALABRAS CLAVE

Enfermedad de Wilson;
Degeneración hepatolenticular;
Mutación;
Asesoramiento genético;
Secuenciación;
Diagnóstico molecular;
Diagnóstico prenatal

KEYWORDS

Wilson's disease;
Hepatolenticular degeneration;
Mutation;
Genetic counselling;
Sequencing;
Molecular diagnosis;
Prenatal diagnosis

Resumen La enfermedad de Wilson es una alteración que presenta una herencia autosómica recesiva caracterizada por la acumulación tóxica de cobre en el hígado y posteriormente en el cerebro y otros órganos. Su diagnóstico clínico se basa en la detección de concentraciones bajas de ceruloplasmina en suero, el incremento de excreción de cobre en orina, la presencia de anillos de Kayser-Fleisher en la córnea, y/o unos niveles altos de cobre en el tejido hepático. El diagnóstico puede ser difícil en el caso de ausencia de síntomas típicos, lo que puede resultar en la no administración de terapia profiláctica en estos pacientes. El estudio molecular ha mejorado el diagnóstico de la enfermedad, incluso en los casos dudosos. En el presente trabajo se detallan las diferentes técnicas aplicadas al diagnóstico molecular de la enfermedad y las mutaciones más comunes descritas. En la actualidad la secuenciación directa del gen *ATP7B* es el método más ampliamente utilizado para la detección de mutaciones. El estudio molecular y la identificación de mutaciones en el gen *ATP7B* ofrecen la posibilidad de diagnóstico en pacientes con enfermedad de Wilson y en sus familiares, permitiendo el asesoramiento genético, y la posibilidad de realizar diagnósticos prenatales y preimplantacionales.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Advances in the molecular diagnosis of Wilson's disease

Abstract Wilson's disease is an autosomal recessive disorder characterized by toxic copper accumulation in the liver and subsequently in the brain and other organs. Clinical diagnosis is based on the detection of low serum ceruloplasmin concentrations, increased urinary copper excretion, Kayser-Fleisher rings in the cornea, and/or high copper levels in hepatic tissue. Diagnosis can be difficult when the typical symptoms of the disease are absent, a situation that can lead to a lack of prophylactic therapy in these patients. Molecular study has improved the diagnosis of this disease, even in doubtful cases. The present article outlines the various techniques applied in the molecular diagnosis of Wilson's disease and the most commonly described mutations. Currently, direct sequencing of the *ATP7B* gene is the most widely used method to detect mutations. Molecular study and identification of *ATP7B* gene mutations allow diagnosis

of individuals with Wilson's disease and their relatives, as well as the possibility of genetic counselling and prenatal and preimplantation genetic diagnosis.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad de Wilson (EW, OMIM #277900) o degeneración hepatolenticular es un trastorno del metabolismo del cobre que se hereda siguiendo un patrón autosómico recesivo. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1912 por Kinnear Wilson¹. La EW puede presentar un amplio espectro clínico, con manifestaciones hepáticas, neurológicas, psiquiátricas o con una combinación de ellas, en individuos entre 3 y 60 años². El diagnóstico se basa en la detección de concentraciones bajas de ceruloplasmina en suero, el incremento de excreción de cobre en orina, la presencia de anillos de Kayser-Fleisher en la córnea, y/o unas concentraciones altas de cobre en el tejido hepático². El diagnóstico puede ser difícil en el caso de ausencia de síntomas típicos y en familiares asintomáticos. Sin embargo, un diagnóstico precoz es esencial ya que el tratamiento con agentes quelantes de cobre o cinc oral previene el daño hepático y neurológico causado por la acumulación de cobre^{3,4}. El diagnóstico molecular puede determinar la presencia o ausencia de mutaciones, permitiendo el diagnóstico de EW incluso cuando los datos clínicos son equívocos³.

La incidencia de la EW varía entre las diferentes poblaciones entre 1/30.000 y 1/100.000, con una frecuencia estimada de portadores de 1/90⁵. Existen poblaciones en las que la prevalencia es mayor, como en las Islas Canarias, donde se ha calculado en 1/2.600⁶. El gen *ATP7B* es el único gen descrito causante de la EW y codifica para una ATPasa transportadora de cobre. Este gen se halla localizado en el cromosoma 13 (13q14.3), tiene 80 kb, contiene 21 exones y produce una proteína de 1.465 aminoácidos⁷⁻¹⁰. El gen *ATP7B* tiene un 57% de identidad con el gen *ATP7A*, que está implicado en la enfermedad de Menkes. La proteína ATP7B es un transportador transmembrana intracelular de cobre, que tiene un papel esencial en la incorporación de cobre a la ceruloplasmina y en el transporte de cobre fuera del hepatocito a la bilis. Se expresa principalmente en el hígado, riñón y placenta. Una función incorrecta de *ATP7B* da como resultado la formación de una ceruloplasmina inestable, que es rápidamente degradada. También da como resultado la acumulación de cobre en los hepatocitos¹¹. Este exceso de cobre se acumula en tejidos extrahepáticos, incluyendo el cerebro y la córnea (donde es visible como anillos de Kayser-Fleischer), siendo la responsable de las manifestaciones clínicas de la EW¹².

Hasta el momento se han descrito más de 500 mutaciones causantes de la enfermedad, localizadas a lo largo de todo el gen (The Human Gene Mutation Database in Cardiff, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Se han llevado a cabo numerosos estudios en pacientes con EW, y estos han revelado que el espectro de mutaciones en el gen *ATP7B* es específico de poblaciones. Además, existe una alta heterogeneidad, lo que dificulta el estudio molecular en los individuos con EW. Por otro lado, más del 50% de las mutaciones descritas son del tipo *missense* (o de cambio

de sentido), lo que añade un nuevo problema al determinar la posible implicación de este tipo de mutaciones en la enfermedad. La distribución de mutaciones difiere entre los grupos étnicos, así como la presencia de mutaciones prevalentes¹³⁻²⁰. La mutación más frecuente en poblaciones caucásicas es la H1069Q. Esta mutación se encuentra en un 50-80% de los casos en Europa, principalmente en la Europa del Este, mientras que su frecuencia decrece hacia el Oeste y el Sur de Europa, donde la frecuencia se sitúa entre 10 y el 30%^{12,14}. Existen otras mutaciones comunes en Europa, pero sus frecuencias son inferiores al 10%. Por otro lado, ciertas mutaciones se encuentran preferentemente en determinadas regiones geográficas, por ejemplo, una delección de la región 5'UTR (c.-447_427del) en la población de Cerdeña¹⁶. En las poblaciones asiáticas (japonesa, china, coreana) la mutación más frecuente es la R778L (14-50% de los casos)¹⁴.

En la población española, existen escasos estudios^{6,21-23}. En ella, la mutación M645R representa el 27% de los cromosomas mutados²², mientras que la mutación H1069Q sólo se ha detectado en el 5% de los pacientes. En la población canaria, la mutación L708P se ha detectado en el 82% de familias, no detectándose la mutación europea más común H1069Q²³. En nuestra casuística de 32 pacientes con EW molecularmente confirmada, la mutación M645R representó el 30% de los cromosomas mutados, la H1069Q el 9%, pero es de destacar que el 31% de las mutaciones eran únicas (detectadas en un único paciente).

Existen varios estudios que han intentado establecer una correlación genotipo-fenotipo valorando la edad de inicio, la presentación hepática o neurológica, la presencia de anillos de Kayser-Fleischer o los niveles de ceruloplasmina en suero. Sin embargo, no se ha podido demostrar que dicha correlación exista, lo que indica la existencia de otros factores ambientales y genéticos que afectan a la expresión fenotípica^{6,13,24,25}.

Búsqueda de mutaciones en el gen *ATP7B*

El análisis molecular del gen *ATP7B* es la forma más precisa para realizar el diagnóstico de la EW, pero su estudio es complejo, debido tanto a la variabilidad poblacional como al gran número de mutaciones detectadas. Se han utilizado diferentes estrategias para la detección de mutaciones. Desde la clonación del gen hasta hace pocos años la técnica de SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*) ha sido la más ampliamente utilizada, sobre todo cuando se trata de identificar mutaciones en una nueva población^{13,15,21,26-28}. Otras tecnologías similares (DHPLC, DGGE, HRM) también han sido utilizadas, pero en menor proporción²⁹⁻³².

En el momento actual, la secuenciación directa es la técnica más utilizada en el diagnóstico molecular de la EW^{4,33-38}. Ello es debido a que es capaz de detectar el cambio específico de la secuencia de ADN y además detecta el 98% de los

cromosomas mutados. En contrapartida, requiere un estudio largo, costoso y laborioso si se necesita secuenciar el gen entero.

Todas las técnicas anteriores permiten detectar cambios puntuales o pequeñas deleciones o inserciones en la secuencia de ADN. Una estrategia seguida por muchos grupos consiste en la selección de determinados exones reduciendo así costes y el tiempo del análisis. La selección de estas regiones va a depender de la población, y es necesario basarse en estudios anteriores. Así, el análisis de los exones 8, 13, 14 y 15 cubre el 60-70% de las mutaciones en Europa del Este o Central. Según nuestra casuística y la de Margarit et al²² en la población española, este estudio detectaría el 26% de los cromosomas mutados, mientras que el análisis de los exones 2, 5, 6 y 14 detectaría el 66%.

Existe otra técnica denominada MLPA (*Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*) que permite detectar deleciones y duplicaciones parciales o totales de un gen. Para la mayoría de enfermedades hereditarias, las deleciones o duplicaciones parciales suponen menos del 10% de mutaciones detectadas. No existen publicaciones referentes a la utilización de esta tecnología aplicadas a la EW en la actualidad. No obstante, en nuestra casuística de 32 pacientes molecularmente diagnosticados, un paciente presentó una deleción del exón 1 en heterocigosis que fue detectada por MLPA. El otro alelo era portador de la mutación M645R. El estudio familiar permitió comprobar la segregación de ambas mutaciones (fig. 1). La utilización de esta metodología en pacientes en los cuales sólo se ha detectado una mutación puede mejorar el diagnóstico de esta enfermedad.

Detección de una mutación prevalente

Se han descrito técnicas para estudiar una mutación determinada, como la H1069Q^{24,39}, o la deleción de 15 pares de bases en el promotor del gen *ATP7B* que identifica el 60,5% de cromosomas mutados en la población sarda¹⁶. La identificación de la mutación H1069Q únicamente puede ser útil en poblaciones con un gran porcentaje de esta mutación, pero no así en otras, como la española, donde su prevalencia es baja (sobre el 10%).

Desarrollo de paneles para detectar un determinado número de mutaciones

Diversos grupos han desarrollado paneles para detectar las mutaciones más frecuentes en su población. Para ello se ha de seleccionar un panel que represente la población en estudio. En estos casos, la utilidad es alta para la población específica, pero acostumbra a ser limitada cuando se estudian otras poblaciones.

Lovicu et al⁴⁰ describen una PCR específica que permite la amplificación conjunta de 6 fragmentos donde se localizan las mutaciones que identifican el 85% de cromosomas en la población sarda. La misma técnica fue utilizada por Huster et al⁴¹, en la que se incluyen 4 mutaciones europeas comunes. Dichas mutaciones (H1069Q, P1134P-fs, M769V y W779X) identifican el 61,3% de los cromosomas mutados en pacientes con EW del este de Alemania. Este panel de mutaciones detectaría únicamente un 10% de los cromosomas mutados si se estudiara la población española, y un 2,4% de

la población canaria. Recientemente, el grupo de Mak et al⁴² ha diseñado un panel para la detección de las 28 mutaciones más prevalentes en la población china de Hong Kong.

Gojová et al⁴³ desarrollaron un *microarray* de ADN para detectar 87 mutaciones y 17 polimorfismos en el gen *ATP7B*. En este *array* se han incorporado las mutaciones descritas para la población checa, pero también se han introducido mutaciones prevalentes de otras poblaciones (como la española). La utilización de este chip hubiese detectado el 95,6% de cromosomas mutados en la población canaria, y con resultados contradictorios para la población española: 94,4% según Margarit et al²², pero únicamente el 68% en nuestra casuística. La ventaja principal de esta técnica es que permite detectar un número elevado de mutaciones en un solo experimento, pero existen limitaciones en cuanto a la posible presencia de polimorfismos en los lugares donde se encuentran situados los oligonucleótidos, la utilización de maquinaria especializada y su coste. En un futuro, cuando los costes de producción y procesamiento del chip sean más baratos y las mutaciones en la EW estén más delineadas se podría incrementar su sensibilidad. De todas maneras, puede no ser competitiva con las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, capaces de detectar mutaciones no preidentificadas.

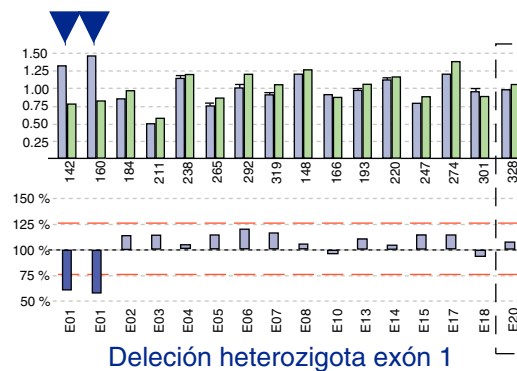
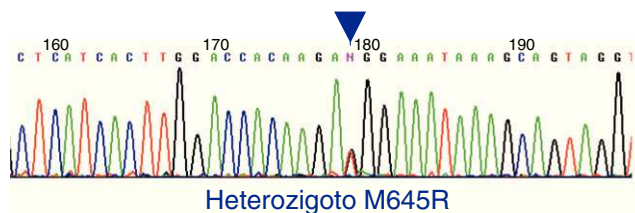
Interpretación del diagnóstico molecular de la enfermedad de Wilson

El fenotipo de la EW es diverso a nivel clínico y bioquímico, por lo que establecer un diagnóstico puede ser difícil en ciertos pacientes³. El análisis molecular puede determinar la presencia o ausencia de mutaciones en el gen *ATP7B*, ayudando así al diagnóstico de la enfermedad, sobre todo en los casos en que el diagnóstico clínico es dudoso.

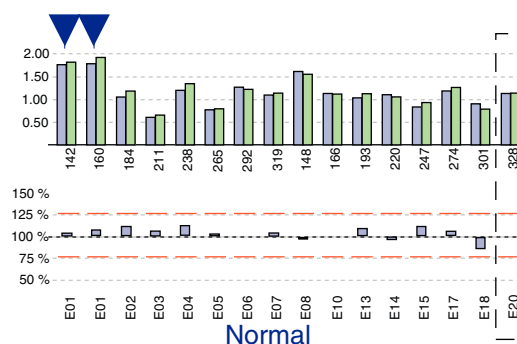
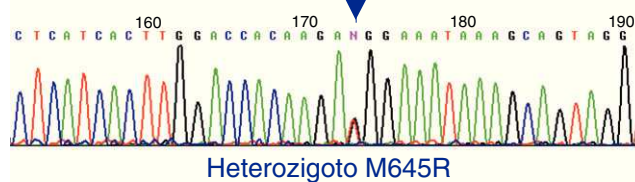
El estudio molecular del gen *ATP7B* puede dar 3 tipos de resultados: 1) detección de 2 mutaciones; 2) detección de una única mutación, o 3) no detección de mutaciones.

1. El resultado molecular puede ayudar al diagnóstico clínico cuando se detectan 2 mutaciones causativas, que o bien hayan sido previamente descritas o a las que se les pueda atribuir un efecto en la proteína (por ejemplo, mutaciones tipo *nonsense* o deleciones o inserciones que cambien la pauta de lectura). Para ayudar a la interpretación de resultados existen bases de datos donde se recogen las mutaciones descritas en el gen *ATP7B* como las de la Universidad de Alberta (<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.asp>) o la de Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).
2. Una dificultad mayor la tenemos en el caso de un paciente en el cual únicamente se detecta una mutación en el gen *ATP7B*. En el caso de que existan síntomas clínicos indicativos de EW (evidencia de daño en el tejido hepático, síntomas neuropsiquiátricos asociados a anillos de Kayser-Fleischer, o imágenes cerebrales que sugieran EW) se tiene que iniciar el tratamiento⁴. Una respuesta al mismo en estos individuos reforzará la idea de que el diagnóstico es correcto. En cambio en pacientes en que la enfermedad progrese a pesar de la terapia será necesario reconsiderarlo. La mejora en el diagnóstico molecular de la EW hace pensar que este tipo de pacientes será cada vez menos frecuente.

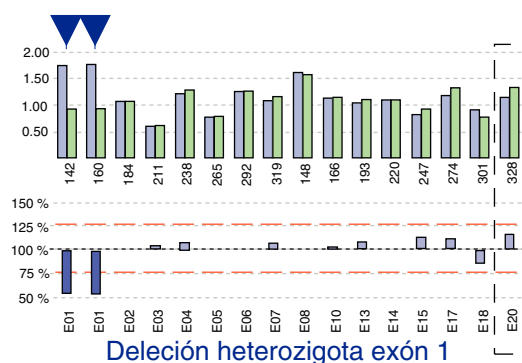
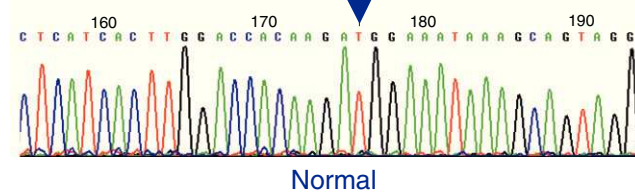
CASO ÍNDICE: M645R/delección exón 1



PADRE: M645R/normal



MADRE: delección exón 1/normal



EXÓN 6

MLPA

Figura 1 Estudio molecular del gen *ATP7B* en un paciente con enfermedad de Wilson y sus progenitores. A la derecha se muestra el electroferograma de parte de la secuencia exón 6 del gen *ATP7B* donde se encuentra localizada la mutación M645R: el caso índice y su padre son portadores de la mutación. A la izquierda se muestran los resultados del análisis por MLPA de los diferentes exones del gen, donde se detecta una delección heterocigota del exón 1. El caso índice y su madre son portadores de dicha mutación.

3. En el caso de no detectar mutaciones, el resultado no descarta completamente el diagnóstico de EW, ya que se ha descrito que el estudio mutacional identifica la presencia de mutaciones en un 65% de todos los alelos en pacientes con sospecha clínica de EW³⁶. En estos casos se puede ofrecer un estudio indirecto del gen *ATP7B*. El estudio indirecto (o análisis de ligamiento) no diagnostica el caso índice pero permite identificar portadores y pacientes asintomáticos en la familia del mismo. En este caso es indispensable que el diagnóstico clínico no sea dudoso⁴⁴. Para realizar este tipo de estudio además del caso índice es necesaria una muestra de los padres y hermanos. El resultado dependerá de que los marcadores genéticos estudiados sean informativos en esa familia. Se ha descrito que la utilización de marcadores flanqueantes del gen *ATP7B* resulta informativa en un 90% de las familias⁴⁴. En estos casos es posible el diagnóstico de otros individuos de riesgo, detección de portadores y diagnóstico prenatal y preimplantacional.

Asesoramiento genético

Dado que es una enfermedad autosómica recesiva, los padres de un paciente con EW son portadores obligados, y tienen una probabilidad de tener descendencia afectada del 25%. Este hecho hace necesario realizar un cridado en cascada de los familiares del caso índice.

En función del resultado del caso índice, se puede hacer el estudio de familiares de riesgo. Es necesario confirmar el estudio de portadores en ambos progenitores, ya que se han descrito casos muy poco frecuentes de mutaciones localizadas en el mismo alelo⁴⁵. La búsqueda de mutaciones en hermanos del caso índice requiere únicamente del estudio de las mutaciones detectadas en él, lo que hace que sea más barato y rápido. La presencia de mutaciones idénticas al caso índice identificará a pacientes afectados de EW (ya que pueden ser asintomáticos). La identificación de mutaciones permite además establecer diagnósticos prenatales y preimplantacionales.

Por otro lado, un enfermo de Wilson tiene un riesgo incrementado de tener descendencia afectada, ya que la probabilidad de que el enfermo pase el alelo mutado es del 100%, y la probabilidad de que su pareja sea portadora de una mutación es la de la población general (1/90)⁵. Por lo tanto, su probabilidad de tener descendencia con EW es de 1/180, mientras que la de la población general es de 1/32.400 (1/90 x 1/90 x 1/4). Se puede reducir dicha probabilidad haciendo un cribado de las mutaciones más frecuentes en la población de la pareja. Por ejemplo, un estudio de parte del gen que detecte el 70% de las mutaciones reduciría el riesgo a 1/600. En la población española esto podría conseguirse estudiando los exones 2, 5, 6 y 14 que detectan el 66% de los cromosomas mutados reportados (según nuestra casuística y Margarit et al²²). En el caso de identificar una mutación en la pareja, es posible ofrecer entonces un diagnóstico prenatal o preimplantacional.

Esta misma argumentación se puede hacer con los hermanos de un caso índice, ya que su riesgo inicial de ser portadores es del 50%. En el caso de ser portadores de una mutación, se recomienda el cribado de mutaciones frecuentes en la pareja, al igual que en el caso de enfermos.

En la actualidad el diagnóstico molecular de la EW se lleva a cabo en la mayoría de los casos por secuenciación directa. El estudio molecular y la identificación de mutaciones en el gen *ATP7B* ayudan al diagnóstico clínico confirmando la enfermedad y ofrecen la posibilidad del diagnóstico a familiares, el asesoramiento genético, y poder realizar diagnósticos prenatales y preimplantacionales.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain*. 1912;34:295–509.
2. Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology*. 2008;47:2089–111.
3. Schilsky ML. Wilson disease: current status and the future. *Biochimie*. 2009;91:1278–81.
4. Schilsky ML, Ala A. Genetic testing for Wilson disease: availability and utility. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010;12:57–61.
5. Scheinberg IH, Sternlieb I. Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. *Am J Clin Nutr*. 1996;63:S842–5.
6. Garcia-Villarreal L, Daniels S, Shaw SH, Cotton D, Galvin M, Geskes J, et al. High prevalence of the very rare Wilson disease gene mutation Leu708Pro in the Island of Gran Canaria (Canary Islands, Spain): a genetic and clinical study. *Hepatology*. 2000;32:1329–36.
7. Frydman M, Bonne-Tamir B, Farrer LA, Conneally PM, Magazanik A, Ashbel S, et al. Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:1819–21.
8. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet*. 1993;5:327–37.
9. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet*. 1993;5:344–50.
10. Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;197:271–7.
11. Mercer JF. The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends Mol Med*. 2001;7:64–9.
12. Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, et al. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int*. 2003;23:139–42.
13. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Genet*. 1995;9:210–7.
14. Ferenci P. Regional distribution of mutations of the *ATP7B* gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum Genet*. 2006;120:151–9.
15. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Altuntas B, Giacchino R, et al. Mutation analysis in patients of Mediterranean descent with Wilson disease: identification of 19 novel mutations. *J Med Genet*. 1999;36:833–6.
16. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Figus A, Lilliu F, et al. Molecular characterization of wilson disease in the Sardinian population-evidence of a founder effect. *Hum Mutat*. 1999;14:294–303.
17. Firneisz G, Lakatos PL, Szalay F, Polli C, Glant TT, Ferenci P. Common mutations of *ATP7B* in Wilson disease patients from Hungary. *Am J Med Genet*. 2002;108:23–8.

18. Deguti MM, Genschel J, Cancado EL, Barbosa ER, Bochow B, Mucenic M, et al. Wilson disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients. *Hum Mutat.* 2004;23:398.
19. Okada T, Shiono Y, Hayashi H, Satoh H, Sawada T, Suzuki A, et al. Mutational analysis of ATP7B and genotype-phenotype correlation in Japanese with Wilson's disease. *Hum Mutat.* 2000;15:454–62.
20. Yoo HW. Identification of novel mutations and the three most common mutations in the human ATP7B gene of Korean patients with Wilson disease. *Genet Med.* 2002;4(6 Suppl):S43–8.
21. Margarit E. Gene symbol: ATP7B. Disease: Wilson's disease *Hum Genet.* 2005;118:544–5.
22. Margarit E, Bach V, Gomez D, Bruguera M, Jara P, Queralt R, et al. Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population - identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene. *Clin Genet.* 2005;68:61–8.
23. Brage A, Tome S, Garcia A, Carracedo A, Salas A. Clinical and molecular characterization of Wilson disease in Spanish patients. *Hepatol Res.* 2007;37:18–26.
24. Maier-Dobersberger T, Ferenci P, Polli C, Balac P, Dienes HP, Kaserer K, et al. Detection of the His1069Gln mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction. *Ann Intern Med.* 1997;127:21–6.
25. Shah AB, Chernov I, Zhang HT, Ross BM, Das K, Lutsenko S, et al. Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses. *Am J Hum Genet.* 1997;61:317–28.
26. Loudianos G, Lovicu M, Solinas P, Kanavakis E, Tzetis M, Manolaki N, et al. Delineation of the spectrum of Wilson disease mutations in the Greek population and the identification of six novel mutations. *Genet Test.* 2000;4:399–402.
27. Al Jumah M, Majumdar R, Al Rajeh S, Awada A, Al Zaben A, Al Traif I, et al. A clinical and genetic study of 56 Saudi Wilson disease patients: identification of Saudi-specific mutations. *Eur J Neurol.* 2004;11:121–4.
28. Nanji MS, Nguyen VT, Kawasoe JH, Inui K, Endo F, Nakajima T, et al. Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease. *Am J Hum Genet.* 1997;60:1423–9.
29. Vrabelova S, Letocha O, Borsky M, Kozak L. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol Genet Metab.* 2005;86:277–85.
30. Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut.* 2007;56:115–20.
31. Mak CM, Lam CW, Tam S, Lai CL, Chan LY, Fan ST, et al. Mutational analysis of 65 Wilson disease patients in Hong Kong Chinese: identification of 17 novel mutations and its genetic heterogeneity. *J Hum Genet.* 2008;53:55–63.
32. Lin CW, Er TK, Tsai FJ, Liu TC, Shin PY, Chang JG. Development of a high-resolution melting method for the screening of Wilson disease-related ATP7B gene mutations. *Clin Chim Acta.* 2010;411:1223–31.
33. Ye S, Gong L, Shui QX, Zhou LF. Wilson disease: identification of two novel mutations and clinical correlation in Eastern Chinese patients. *World J Gastroenterol.* 2007;13:5147–50.
34. Gupta A, Chattopadhyay I, Dey S, Nasipuri P, Das SK, Gangopadhyay PK, et al. Molecular pathogenesis of Wilson disease among Indians: a perspective on mutation spectrum in ATP7B gene, prevalent defects, clinical heterogeneity and implication towards diagnosis. *Cell Mol Neurobiol.* 2007;27:1023–33.
35. Abdelghaffar TY, Elsayed SM, Elsobky E, Bochow B, Buttner J, Schmidt H. Mutational analysis of ATP7B gene in Egyptian children with Wilson disease: 12 novel mutations. *J Hum Genet.* 2008;53:681–7.
36. Davies LP, Macintyre G, Cox DW. New mutations in the Wilson disease gene. ATP7B: implications for molecular testing *Genet Test.* 2008;12:139–45.
37. Park S, Park JY, Kim GH, Choi JH, Kim KM, Kim JB, et al. Identification of novel ATP7B gene mutations and their functional roles in Korean patients with Wilson disease. *Hum Mutat.* 2007;28:1108–13.
38. Wan L, Tsai CH, Hsu CM, Huang CC, Yang CC, Liao CC, et al. Mutation analysis and characterization of alternative splice variants of the Wilson disease gene ATP7B. *Hepatology.* 2010;52:1662–70.
39. Witt H, Landt O. Rapid detection of the Wilson's disease H1069Q mutation by melting curve analysis with the LightCycler. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39:953–5.
40. Lovicu M, Dessi V, Zappu A, De Virgili S, Cao A, Loudianos G. Efficient strategy for molecular diagnosis of Wilson disease in the sardinian population. *Clin Chem.* 2003;49:496–8.
41. Huster D, Weizenegger M, Kress S, Mossner J, Caca K. Rapid detection of mutations in Wilson disease gene ATP7B by DNA strip technology. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42:507–10.
42. Mak CM, Lam CW, Lai ST, Hui Y, Tam S. Rapid diagnosis of Wilson disease by a 28-mutation panel: real-time amplification refractory mutation system in diagnosing acute Wilsonian liver failure. *Clin Chim Acta.* 2008;398:39–42.
43. Gojova L, Jansova E, Kulm M, Pouchla S, Kozak L. Genotyping microarray as a novel approach for the detection of ATP7B gene mutations in patients with Wilson disease. *Clin Genet.* 2008;73:441–52.
44. Cox DW. Molecular advances in Wilson disease. *Prog Liver Dis.* 1996;14:245–64.
45. Dedoussis GV, Genschel J, Sialvera TE, Bochow B, Manolaki N, Manios Y, et al. Wilson disease: high prevalence in a mountainous area of Crete. *Ann Hum Genet.* 2005;69:268–74.