

## Twee families met de ziekte van Wilson: een klinisch en diagnostisch overzicht

S.B. van der MEULEN, J.G.J. POWELS, A.P. ABBES, B.E.J.M. BRUGGEMAN en H. ENGEL

**De ziekte van Wilson is een autosomaal recessieve aandoening van het kopermetabolisme en wordt gekenmerkt door de ophoping van koper in de lever, huid, hersenen en nieren. D.m.v. "linkage"-onderzoek is recent aangetoond, dat het gen verantwoordelijk voor de ziekte van Wilson op de lange arm van chromosoom 13 ligt (13q14.3-21). Tot nu toe zijn ongeveer 134 mutaties beschreven. De incidentie wordt mondiaal geschat tussen de 1:35.000 en 1:100.000 levend geboren. De frequentie van heterozygote dragers is 1:90 en de allelfrequentie 0,56%. In Nederland wordt de prevalentie geschat op 1:75.000. In dit artikel geven wij een klinisch en diagnostisch overzicht van de ziekte van Wilson en beschrijven we twee patiënten met de ziekte van Wilson en hun families, waarbij in beide families een bekende heterozygote His1069Gln-mutatie en in elke familie één nieuwe heterozygote mutatie, respectievelijk een Leu549Pro en een 3742CA-insertie is gevonden.**

*Trefwoorden: ziekte van Wilson; autosomaal recessief; koperstapeling; mutaties in ATP7B-gen; ceruloplasmine*

De ziekte van Wilson is een autosomaal recessieve aandoening van het koper metabolisme en wordt gekenmerkt door de ophoping van koper in de lever, huid, hersenen en nieren. Er treedt accumulatie van koper op t.g.v. een afname van 60-80% in de uitscheiding van koper in de gal en er vindt geen inbouw van koper in het ceruloplasmine plaats. Zonder behandeling is deze aandoening fataal (1, 2). In 1912 beschreef Samuel Alexander Kinnier Wilson een zeldzame en fatale erfelijke aandoening gekenmerkt door onwillekeurige bewegingen en spasticiteit. Pathologisch onderzoek liet een combinatie zien van levercirrose en een bilaterale verzachting van de nucleus lenticularis. Wilson beschreef dit als progressieve lenticulaire degeneratie (3). Koper is een essentieel sporenelement deel uitmakend van vele enzymen, o.a. superoxide dismutase, lysyl oxidase, dopa- $\beta$ -hydroxylase, ceruloplasmine en cytochroom c. Deze enzymen spelen een rol bij vele oxidatieve processen, zoals detoxificatie van vrije radicalen, neurotransmittersynthese, rijping van bindweefsel en ijzeropname

*Klinisch Chemisch Laboratorium, Isala klinieken, Zwolle.*

Correspondentie: S. B. van der Meulen, Isala klinieken, Postbus 10.400, 8000 GK Zwolle.  
E-mail: s.meulen@wxs.nl

(4). Koperopname overschrijdt de behoefte van het lichaam, zodat een effectief excretiemechanisme noodzakelijk is. Koperopname, ongeveer 1 mg per dag, vindt voornamelijk plaats in het duodenum en de maag en wordt na opname in het bloed gebonden aan albumine en naar de lever getransporteerd. In de lever wordt het koper in het transporteiwit ceruloplasmine ingebouwd. Op deze manier wordt 80-90% van het circulerende koper gebonden. Koper wordt met de gal uitgescheiden, ongeveer 0,5-1,5 mg per dag. Verder wordt een klein deel in de urine uitgescheiden. Een volwassen lichaam bevat 70-150 mg koper, waarvan zich 8% in de lever bevindt (5). Uiteindelijk raakt de opname van koper in de hepatocyten verzadigd en vindt afgifte van koper aan bloed plaats, waardoor extrahepatische opname van koper plaats vindt. Ceruloplasmine, een transporteiwit dat 6 koperatomen per molekuul kan bevatten, speelt een belangrijke rol in het kopermetabolisme. Daarnaast speelt ceruloplasmine een rol in het ijzermetabolisme, door ijzer te oxideren, voordat het gebonden kan worden aan transferrine in het plasma (5). Pasgeborenen hebben een lage concentratie van ceruloplasmine in het plasma en een hoge concentratie koper in de lever. Bij gezonde kinderen stijgt de ceruloplasminewaarde in het eerste levensjaar en daalt de koperconcentratie in de lever. Bij kinderen met de ziekte van Wilson blijft de lage concentratie van ceruloplasmine en de hoge concentratie van koper bestaan (6). Klinische manifestatie voor het zesde levensjaar is uitzonderlijk (1) De ziekte komt voor in populaties van elke etnische en geografische origine en de incidentie wordt mondiaal geschat tussen de 1:35.000 en 1:100.000 van de levend geboren. De frequentie van de heterozygote dragers is 1:90 en de allelfrequentie 0,56% (7). In Nederland wordt de prevalentie geschat op 1:75.000 (8).

### Klinische presentatie

Klinisch kunnen patiënten met de ziekte van Wilson zich op een van de volgende drie manieren presenteren. Een derde deel van de patiënten presenteert zich op de leeftijd van tien tot twintig jaar met symptomen van leverpathologie, zich uitend als een acute hepatitis, een parenchymateuze leverziekte, chronische cirrose of leverfalen. Een derde deel presenteert zich met neurologische verschijnselen, meestal optredend na de leeftijd van twaalf jaar. De overige patiënten presenteren zich met psychische problematiek (9). Deze neurologische en psychiatrische symptomen gaan vaak gepaard met de aanwezigheid van Kayser-

Fleischer ringen in de cornea, een goudgroene depositie van koper in de membraan van Descemet. In ongeveer 5% van de patiënten zijn de eerste symptomen primaire of secondaire amenorroe of herhaalde en onbegrepen spontane abortus. Een andere zeldzame presentatie is hemolyse (10). Een samenvatting van symptomen is weergegeven in tabel 1 (11).

### Diagnose

Volgens de criteria van Sternlieb wordt de ziekte van Wilson gediagnostiseerd als tenminste twee van de volgende symptomen aanwezig zijn: 1) Kayser-Fleischer ringen, 2) typische neurologische symptomen en 3) lage concentratie ceruloplasmine (12). Meestal is bij patiënten met de ziekte van Wilson de 24-uurs koperconcentratie in de urine verhoogd (normaal 0,1  $\mu\text{mol/l}$ ). Bij symptomatische patiënten bedraagt deze meer dan 1,5  $\mu\text{mol/l}$ . Voor het aantonen van Kayser-Fleischer ringen wordt bij patiënten met verdenking op de ziekte van Wilson onderzoek van de ogen met de spleetlamp uitgevoerd. Bij patiënten met zowel neurologische als leverafwijkingen zijn deze bijna altijd aanwezig. Slechts in 50% van de patiënten die zich presenteren met alleen leversymptomen zijn de ringen van Kayser-Fleischer afwezig (9). Eveneens kunnen azure lanulae aanwezig zijn in de vinger-nagels; waarschijnlijk ontstaan deze via hetzelfde mechanisme (13). De concentratie van het ceruloplasmine in serum is meestal laag bij patiënten met de ziekte van Wilson; minder dan 0,2 g/l (normaal 0,2- 0,6 g/l). Slechts in 10% van de patiënten is het ceruloplasmine normaal (vals negatief) en in ongeveer 10% van de heterozygoten is de waarde verlaagd (vals positief) (9). Bij pasgeborenen is een laag ceruloplasmine een normale bevinding (1). Cauza et al. bestudeerden de positief voorspellende waarde van een lage ceruloplasmineconcentratie in patiënten met een leverziekte en deze bedraagt 5,9%, dus niet bruikbaar als presymptomatische screeningsmethode voor de ziekte van Wilson (14). De koperconcentratie in het serum bij patiënten met de ziekte van Wilson kan verlaagd, normaal of verhoogd zijn en is afhankelijk van de concentratie van het ceruloplasmine in het plasma en de hoeveelheid koper gebonden aan het ceruloplasmine. Bij de meeste patiënten met de ziekte van Wilson is de concentratie van koper in het serum lager dan 11  $\mu\text{mol/l}$  (normaal 10-23  $\mu\text{mol/l}$ ), omdat 90% van het koper gebonden is aan ceruloplasmine en deze is meestal verlaagd in patiënten met de ziekte van Wilson. Bij deze patiënten is het niet-ceruloplasminegebonden koper in serum verhoogd (normaal ongeveer 1,5  $\mu\text{mol/l}$ ) (9). De diagnose wordt momenteel bevestigd door het bepalen van de koperconcentratie in een leverbiopsie. De normale waarde is 20-50  $\mu\text{g}$  koper per g droog weefselgewicht. Bij de ziekte van Wilson is deze hoger dan 250  $\mu\text{g}$  koper per g droog weefselgewicht (9). Faa et al. bestudeerden de koperverdeling in de cirrhotische lever van een Wilson patiënt. Zij constateerden dat de verdeling van koper in de cirrhotische lever niet homogeen is en concludeerden dat de koperconcentratie in een klein leverbiopsie niet representatief is voor de gemiddelde koperconcentratie (15). Lichtmicroscopisch zijn de eerste ver-

**Tabel 1.** Hepatische, neurologische en psychische symptomen bij de ziekte van Wilson

#### Hepatische

influenza-achtig syndroom met icterus  
verhoogde aminotransferases e.c.i.  
chronische actieve hepatitis of cirrose  
hemolyse, acuut leverfalen  
ascites  
hypoalbuminemie  
hyperammoniëmie en hepatische encefalopathie  
trombocytopenie en leukopenie vanwege hypersplenisme  
varicesbloedingen vanuit maag en oesophagus  
portale hypertensie

#### Neurologische

ringen van Kayser-Fleischer  
aandoeningen van het bewegingsapparaat of dystonie  
(tremor, chorea, trage spraak, trage bewegingen,  
rigiditeit, abnormale bewegingen van aangezicht)  
moeilijkheden met fijne bewegingen  
dysartrie en/of dysfagie

#### Psychische

acute depressie  
acute gedragsstoornissen en persoonlijkheidsveranderingen  
extreme woede of emotie  
verslechtering in intellectuele prestaties

schijnselen in de lever zichtbaar als infiltratie van vet in het leverparenchym en depositie van glycogeen in de kern. In een later stadium ontstaan necrose, ontsteking, fibrose, proliferatie van de galwegen en cirrose (1). Een andere methode om onderscheid te maken tussen enerzijds een leverziekte ten gevolge van de ziekte van Wilson of anderzijds veroorzaakt door een andere ziekte is de meting van de incorporatie van een koperisotoop in het ceruloplasmine. Bij patiënten met de ziekte van Wilson wordt er minder koper in ceruloplasmine ingebouwd (16). Deze methode is echter onbetrouwbaar bij een lage serum ceruloplasmineconcentratie (17). Bij patiënten met de ziekte van Wilson, die zich presenteren met uitsluitend leversymptomen, wordt de diagnose vaak laat of niet gesteld, dit omdat de huidige klinische en laboratoriumbevindingen ontoereikend zijn om de diagnose te bevestigen of uit te sluiten (18). Zie verder tabel 2. Bovenstaande geeft aan dat het stellen van een diagnose op een biochemische manier niet altijd betrouwbaar is. Presymptomatische diagnostiek is van groot belang gelet op het mogelijkerwijs voorkomen van irreversibele eindorgaanschade door het voortijdig starten van medicamenteuze therapie. Momenteel is het mogelijk m.b.v. moleculair biologische technieken de diagnose ziekte van Wilson te bevestigen dan wel uit te sluiten.

### Moleculair biologische diagnostiek

Door genetisch "linkage"-onderzoek is vastgesteld dat het Wilson-gen op chromosoom 13 ligt (19). Andere "linkage"-onderzoeken toonden aan dat het Wilson-gen op de lange arm van chromosoom 13 (13q14.3-21) ligt (20,21). In 1993 werd door Bull et al. in dit gebied een basevolgorde ontdekt, die veel homologie vertoonde met de basevolgorde van een

**Tabel 2.** Overzicht van diagnostische testen bij de ziekte van Wilson (9, 11). Vaak is een combinatie van testen noodzakelijk

Test	Waarden indicatief voor de ziekte van Wilson
Koper in 24 uren urine	0,1 µmol/l
Serum ceruloplasmine	0,2 g/l
Koper concentratie in leverbiopt	250 µg per g droog weefselgewicht
Ringen van Kayser-Fleischer	aanwezig
Incorporatie van isotoop koper in ceruloplasmine	per os 0,1-0,5%, IV 1% van de dosis

gen, dat codeert voor een koperbindende ATPase die geassocieerd is met de ziekte van Menke. Bij de ziekte van Menke, een X- chromosomaal gebonden erfelijke aandoening, is de cellulaire opname van koper in de cel verstoord. Dit leidde tot de ontdekking van het gen, dat verantwoordelijk is voor de ziekte van Wilson. De twee genen respectievelijk ATP7A (Menke) en ATP7B (Wilson) coderen voor een vergelijkbaar eiwit met een overeenkomst van 60% in aminozuur volgorde (22). Het Wilson gen, ATP7B, codeert voor een koper transporterend P-type ATPase en bestaat uit 21 exonen. Het ATPase-eiwit bestaat uit 1465 aminozuren en is een integraal membraaneiwit, voornamelijk voorkomend in de lever en nier. Thomas et al. bestudeerden de genomische organisatie van het ATP7B-gen en construeerden primers om ieder exon van het ATP7B-gen te amplificeren m.b.v. een PCR-reactie (polymerase chain reaction) om vervolgens met SSCP-analyse (single strand conformation polymorphism) en DNA-volgordebepaling mutaties op te sporen (23). Momenteel zijn van dit gen ongeveer 134 verschillende mutaties beschreven (4,8,22,24-38). De meeste patiënten die tot nu toe zijn beschreven zijn compound heterozygoot, d.w.z. in beide allelen van de homologe chromosomen is een mutatie aanwezig, echter de mutaties zijn verschillend. In Noord Europa zijn de His1069Gln-mutatie in exon 14 en de Gly1267Lys-mutatie in exon 18 het meest voorkomend met een frequentie van resp. 28% en 10% binnen een patiëntenpopulatie (4). Waldenström et al. vonden voor de His1069Gln-mutatie een frequentie van 36% (23). Afhankelijk van het type mutatie kan er een wisselende metabole expressie van de ziekte plaats vinden. De beschreven klinische heterogeniteit wordt mogelijk verklaard door de variëteit aan mutaties. Bij homozygote patiënten komen specifieke mutaties overeen met bepaalde fenotypes (4). In tabel 3 is een schematische voorstelling van het ATP7B-gen te zien. Hierin zijn de tot nu toe bekende mutaties in het Wilson-gen aangegeven en daarnaast de drie beschreven mutaties, die gevonden zijn bij de twee Wilson families, die verderop worden beschreven. Mutaties in het ATP7B-gen kunnen leiden tot een minder of niet functioneel eiwit, afhankelijk van de plaats van de mutatie en het desbetreffende functionele deel van het eiwitproduct. Ernstig functioneverlies van ATP7B leidt tot een eerder tot expressie komen van de ziekte (4). Eveneens is een aantal DNA polymorfismen beschreven, veranderingen in DNA

**Tabel 3.** Tot nu toe beschreven mutaties ingedeeld in categorieën. Overzicht van mutaties per exon van het ATP7B gen. De functionele regionen van het eiwit zijn zes koperbindingsplaatsen in exon 1-5, vijf transmembraangedeelten in exon 6-8, 12, 13 en 20, een transductiegedeelte in exon 10, een fosforyleringsplaats in exon 14 en ATP loop en ATP hinge, twee delen van de ATP-bindingsplaats in exon 15-19. Daarnaast zijn de mutaties weergegeven die zijn aangetoond in de twee Wilson patiënten en hun familieleden. A: Leu549Pro; B:His1069Pro, C:3742CA insertie.

Exon	missense nonsense	insertie deletie	totaal	
1		3	3	
2	5	5	10	
3	2	3	5	
4	1	2	3	A
5		4	4	
6	3	1	4	
7	2	3	5	
8	12	4	16	
9	1		1	
10	2	3	5	
11	3	1	4	
12	8		8	
13	6	1	7	
14	6	4	10	B
15	6	1	7	
16	6	1	7	
17	6	3	9	
18	6	1	7	C
19	3	3	6	
20	3	3	6	
21		1	1	
		9	9	
Tot.	81	31	134	

volgorde, die niet tot de ziekte van Wilson leiden (24). Lutsenko et al. toonden aan, dat het eiwitproduct van het ATP7B-gen in twee vormen voorkomt in de cel, namelijk een 160 kDa-product gelokaliseerd in het trans-Golgi netwerk en een 140 kDa-product, dat is gelokaliseerd in de mitochondria (39). De relatie tussen een laag ceruloplasmine en gemuteerd ATPase is nog niet geheel opgehelderd. Mogelijk speelt het ATPase een rol in de uitscheiding van koper vanuit de hepatocyt in de gal en het laden van koper aan apo-ceruloplasmine voor de vorming van ceruloplasmine (29).

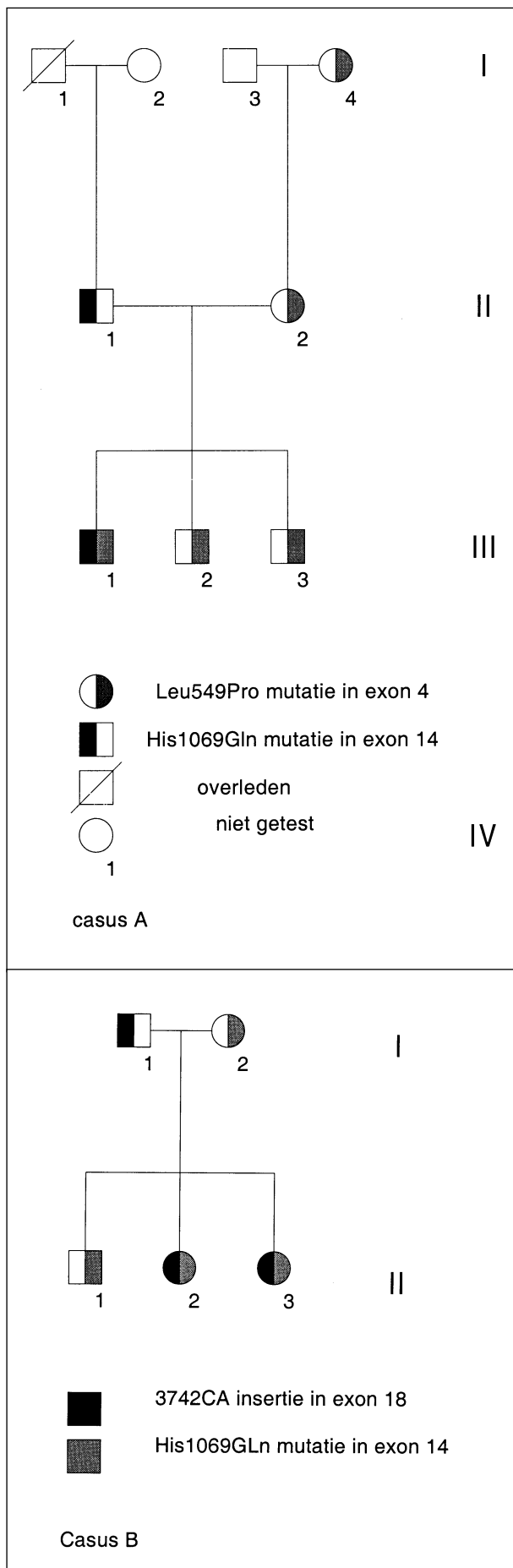
### Behandeling

In 1953 werd penicillamine voor het eerst geïsoleerd uit de urine van patiënten met leverziekten die met penicilline werden behandeld. Nadat de chelaatvormende eigenschappen werden ontdekt, werd het toegepast als behandeling voor de ziekte van Wilson en intoxicaties door zware metalen. Penicillamine is de laatste 40 jaar het middel van eerste keuze geweest. Echter penicillamine vertoont ernstige bijwerkingen (40). Trientine, ook een chelaatvormend middel, kan worden gebruikt bij patiënten die overgevoelig zijn voor penicillamine en lijkt minder toxisch. Deze beide middelen zorgen voor uitscheiding van koper in de urine (9). Als onderhoudstherapie, nadat behandeling met een chelaatvormend middel heeft plaatsge-

vonden, wordt zink gebruikt. Zink induceert tezamen met koper de vorming van een metaalbindend eiwit in de mucosa van het maag-darmkanaal, dat een hogere affiniteit voor koper heeft dan voor zink. Het koper-eiwitcomplex wordt uitgescheiden in de ontlasting als de mucosacel afsterft (41). Daarnaast wordt ook de reabsorptie van endogeen geproduceerd koper geblokkeerd (9). Recent is gebleken, dat zink effectief is als monotherapie bij patiënten met neurologische of leversymptomen en daarnaast bruikbaar is voor zwangere patiënten en presymptomatische patiënten. Zink vertoont minder bijwerkingen (41, 42). Bij patiënten met het beeld van acuut fulminant leverfalen is de enige therapie levertransplantatie. Echter terughoudendheid is geboden bij patiënten met psychische symptomen, daar er weinig verbetering van deze symptomen te verwachten is in de periode na de transplantatie (9,43). Patiënten in de hepatitis/cirrhotische fase van de ziekte van Wilson hebben baat bij een combinatie van zink en trientine (9). Therapie voor patiënten met neurologische symptomen leidt niet altijd tot het gewenste resultaat. Penicillamine geeft een aanvankelijke verslechtering van de symptomen; waarschijnlijk vindt er mobilisatie plaats van koper uit de lever, waardoor de concentratie van koper in de hersenen toeneemt (44). Hoogenraad et al. gebruikten zink als therapie van eerste keuze bij deze patiënten en behaalden goede resultaten (42). Brewer et al. onderzochten het gebruik van tetrathiomolybdate voor patiënten met neurologische symptomen. Tetrathiomolybdate toegediend met de maaltijd vormt een complex met koper en voedselwitte en voorkomt absorptie van koper en tetrathiomolybdate toegediend tussen maaltijden wordt opgenomen en vormt een complex met albumine en het niet aan ceruloplasmine gebonden koper. Dit complex kan niet worden opgenomen door de cel (9). Kiss et al. onderzochten de mogelijkheid van plasmaferese bij patiënten met het beeld van fulminant leverfalen, waarbij koperionen in de circulatie vrijkomen wat resulteert in hemolytische anemie en nierinsufficiëntie. Zij zagen dat plasmaferese leidt tot een snelle reductie van de koperconcentratie in serum (45). Succesvolle zwangerschappen zijn zeldzaam bij patiënten met de ziekte van Wilson vanwege amenorroe, afname van fertiliteit en recidiverende abortus. Na herstel van de koper homeostase treedt herstel op van de fertiliteit. Ondanks de uit dierproeven gebleken teratogene werking van penicillamine worden ongecompliceerde zwangerschappen met de geboorte van een gezond kind beschreven na het gebruik van penicillamine. Devesa et al. beschrijven een ongecompliceerde zwangerschap en partus met de geboorte van een gezonde baby bij een patiënt met de ziekte van Wilson, die werd behandeld met trientine vanwege het ontstaan van nierfunctiestoornissen tijdens het gebruik van penicillamine (46). Hartard en Kunze beschrijven een ongecompliceerde zwangerschap met de geboorte van een gezond kind in een patiënt die drie jaar voor en tijdens de zwangerschap werd behandeld met penicillamine en zinksulfaat (47). Messner et al. beschreven twee ongecompliceerde zwangerschappen bij een 22-jarige Wilson patiënte (48).

## Casus A

Patiënt, een jongeman, presenteerde zich recent op 22-jarige leeftijd met een neuropsychiatrisch beeld met leverfunctiestoornissen. De concentratie van ceruloplasmine in het serum was 0,2 g/l (normaalwaarden 0,2-0,6 g/l) en de koperconcentratie in het serum was 12,1  $\mu\text{mol/l}$  (normaalwaarden 10-23  $\mu\text{mol/l}$ ). Het leverbiopt liet een beeld zien van cirrose, maar geen koperstapeling. Aanvullend onderzoek toonde Kayser-Fleischer ringen aan. Beide broers en ouders van patiënt hadden geen symptomen. De ceruloplasminewaarden van beide broers waren resp. 0,4 g/l en 0,3 g/l, en de ceruloplasminewaarden van vader en moeder waren resp. 0,5 g/l en 0,3 g/l. De PET scan van de hersenen van bovengenoemde patiënt liet een verminderde opname zien in het striatum, links meer dan rechts en verder een laag normale opname in het cerebellum. De MRI van de hersenen liet een verhoogd signaal zien in pons en basale kernen. Er werd gestart met penicillamine 250 mg 4dd. De koperconcentratie in de 24 uren urine voor het starten van therapie was 184,8  $\mu\text{mol/l}$  en nam tijdens therapie af (normaalwaarde 0,1  $\mu\text{mol/l}$ ). De evaluatie van de medicamenteuze therapie vindt plaats op geleide van de koperconcentratie in de 24 uren urine. In de beginperiode van het gebruik van penicillamine trad geen verslechtering op van het neuropsychiatrisch beeld. Na een half jaar werd zinksulfaat 400 mg 2dd. toegevoegd. Er trad verbetering op van het neuropsychiatrisch beeld, maar de leverfunctiestoornissen bleven ongewijzigd. Met behulp van moleculair biologische screeningstechnieken voor het opsporen van mutaties in de exonen van genen, heteroduplexanalyse en SSCP-analyse, werd in twee exonen (exon 4 en exon 14) een mogelijke mutatie aangetoond op basis van een afwijkend patroon. Daarna werd de DNA-volgorde bepaald van deze exonen, waarbij in exon 4 op plaats 1647 thymine is vervangen door cytosine, waardoor in het eiwit op positie 549 het aminozuur leucine (CTG) is vervangen door proline (CCG afkomstig van de moeder) en in exon 14 op plaats 3207 cytosine is vervangen door thymine, waardoor in het eiwit op positie 1069 histidine (CAC) is vervangen door glutamine (CAA afkomstig van de vader). Proline heeft in tegenstelling tot leucine een cyclische structuur, doordat de zijketen zowel aan het N-atoom als het C-atoom is gebonden. Door vervanging van leucine door proline geeft deze cyclische structuur een verandering in de configuratie van het eiwit. Histidine bezit een imidazole ring en is een basisch aminozuur en ongeladen glutamine heeft een terminale amidegroep. De mutatie in exon 4 resulteert in een gemodificeerde bindingsplaats voor koper in het ATPase en de mutatie in exon 14 resulteert in een verstoorde ATP bindingsplaats in het ATPase. Beide mutaties zorgen voor een niet-functioneel ATPase. Bevestiging van de mutatie in exon 4 vond plaats middels restrictie-enzymanalyse; ten gevolge van de mutatie ontstaat een nieuwe, selectieve knipplaats in exon 4 voor het restrictie-enzym *Ava*I. De mutatie in exon 14 werd bevestigd middels ASA (Allele Specific Amplification). De symptomatische jongeman is compound heterozyoot voor een Leu549Pro-mutatie



**Figuur 1.** Stamboom van familie casus A en stamboom familie casus B.

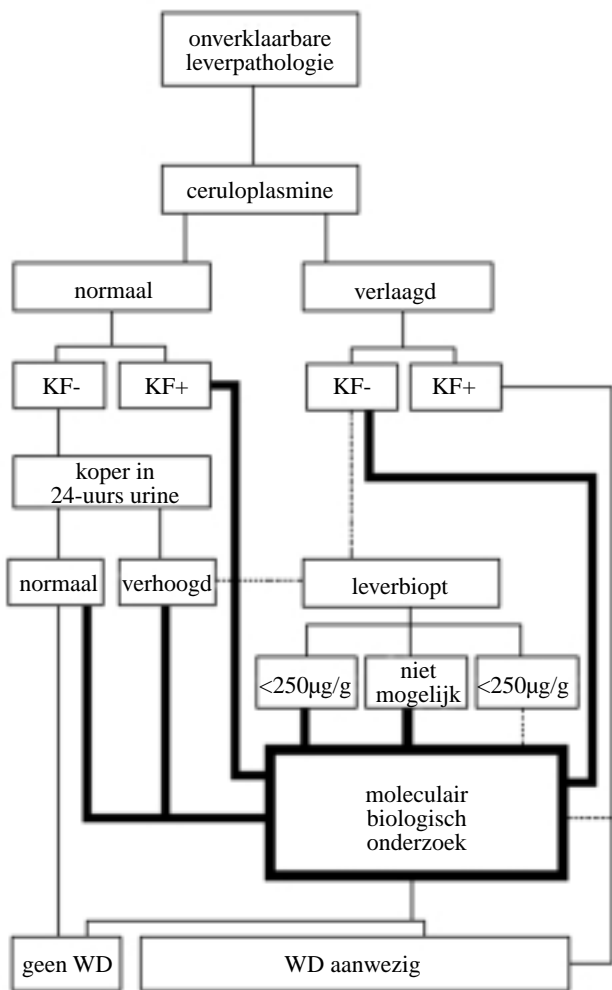
in exon 4 en een His1069Gln-mutatie in exon 14. De beide broers zijn heterozygoot voor een Leu549Pro-mutatie in exon 4 en vader is heterozygoot voor een His1069Gln-mutatie in exon14 en moeder is heterozygoot voor een Leu549Pro-mutatie in exon 4 (zie figuur 1). De mutatie in exon 4 is een nog niet eerder beschreven mutatie, is niet als polymorfisme beschreven en blijkt niet aantoonbaar in 50 normale personen.

### Casus B

Patiënt presenteerde zich 20 jaar geleden als 10-jarig meisje met een acuut beeld van hemolytische anemie, leverfunctiestoornissen en stollingsstoornissen. De concentratie van het ceruloplasmine in het serum was 0,1 g/l, de concentratie van koper in de 24-uurs urine was 3,1  $\mu\text{mol/l}$  en de concentratie koper in het serum was 13  $\mu\text{mol/l}$ . Er waren Kayser-Fleischer ringen aanwezig in de cornea. Een leverbiopt werd niet verricht. Er werd gestart met penicillamine therapie, waarna herstel optrad en de leverenzymen zich normaliseerden. De concentratie van koper in de 24 uurs urine nam aanvankelijk toe tot 83  $\mu\text{mol/l}$  en nam later af. Haar 8-jarige zuster had nooit symptomen van de ziekte van Wilson gehad. Er werd bij haar echter wel een verlaagde concentratie ceruloplasmine in het serum gevonden. Er waren geen ringen van Kayser-Fleischer aanwezig. Presymptomatisch werd gestart met penicillamine, later is men overgegaan op zink therapie. De beide zusters hebben een asymptomatische broer met een normale ceruloplasmineconcentratie in het serum. Moleculair biologisch onderzoek toonde aan, dat in exon 14 op plaats 3207 cytosine is vervangen door thymine, waardoor op positie 1069 histidine is vervangen door glutamine (afkomstig van de moeder) en dat in exon 18 een 3742CA-insertie heeft plaatsgevonden, welke een frameshift veroorzaakt, die uiteindelijk resulteert in een stopcodon in exon 19. Deze laatste mutatie is nog niet eerder beschreven en resulteert in een verkort eiwit. Ook is deze mutatie niet beschreven als polymorfisme en was niet aantoonbaar in 50 normale controles. De beide zusters zijn compoundheterozygoot voor een His1069Gln-mutatie in exon 14 en een 3742CA-insertie in exon 18. De broer is heterozygoot voor de His1069Gln-mutatie in exon 14, de vader is heterozygoot voor de 3742CA-insertie in exon 18 en de moeder is heterozygoot voor de His1069Gln-mutatie in exon 14 (zie 2). De beide zusters zijn inmiddels 29 en 31 jaar en goed gezond.

### Theoretische beschouwing

De ziekte van Wilson kan zich op verschillende wijzen presenteren. Met name voor patiënten, die zich presenteren met leversymptomen kan de diagnose van de ziekte van Wilson gemist of pas in een laat stadium gediagnosticeerd worden. Differentiaal diagnostisch moet bij het beeld van een erfelijke leveraandoening gedacht worden aan de ziekte van Wilson, hemochromatose, alpha 1-antitrypsine deficiëntie of cystische fibrose (49). In figuur 2 is een beslisboom opgesteld, die laat zien dat naast de biochemische diagnostiek, moleculair biologisch onderzoek een belangrijke bij-



**Figuur 2.** Beslisschema voor de mogelijkheden in het diagnostisch proces van de ziekte van Wilson. De dik gedrukte lijn geeft die gevallen weer, waarbij moleculair biologische diagnostiek de voorkeur heeft boven de conventionele diagnostische methoden.

drage kan leveren om de diagnose ziekte van Wilson zowel in het symptomatische alsmede in het pre-symptomatisch stadium te bevestigen of uit te sluiten. In afwezigheid van Kayser-Fleischer ringen en een normale concentratie van ceruloplasmine en koper in de 24-uurs urine kan bij gereede twijfel moleculair biologisch onderzoek uitsluitend geven. Ook in het geval, dat leverbiopsie niet mogelijk is, vanwege coagulopathieën of andere redenen, kan moleculair biologisch onderzoek uitsluitend geven. Daarnaast bestaan er nog een aantal indicaties waarbij moleculair biologische diagnostiek toegepast kan worden. Enerzijds kan levenslange therapie worden voorkomen bij een heterozygote drager, die een afwijkende ceruloplasminewaarde of een afwijkende koperconcentratie in de 24 uurs urine heeft. Anderzijds is van belang, dat familieleden van een bekende patiënt onderzocht worden op de aanwezigheid van de ziekte. Vroege diagnostiek is essentieel om te voorkomen dat de lever schade zich verder kan ontwikkelen en er neurologische complicaties optreden (18). Op jonge leeftijd is de uitkomst van het leverbiopsie niet betrouwbaar en met name in de cirrotische lever kan de concentratie

koper sterk variëren en kan moleculair biologische diagnostiek uitsluitend geven (1). Moleculair biologische diagnostiek kan de invasieve diagnostiek van het leverbiopsie vervangen. De His1069Gln-mutatie heeft een frequentie van 28% in Oosteuropese, Duitse, Franse en Engelse populaties en de Gly1267Lys-mutatie heeft een frequentie van 10% in Franse en Engelse populaties. De overige mutaties in het ATP7B-gen liggen verspreid over de exonen en bovendien zijn de meeste Wilson-patiënten compoundheterozygoot. Het is dus mogelijk om een screeningspakket samen te stellen voor bepaalde meest voorkomende mutaties in een bepaalde populatie. Bij geen resultaat volgt screening van de exonen op mutaties. Dit gaat op de wijze zoals eerder beschreven.

#### Literatuur

- Steinberg IH. Wilson's disease. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, et al., editors. Harrison's principles of internal medicine. New York: McGraw-Hill; 1998: 2166-69.
- Gibbs K, Walsche JM. Biliary excretion of copper in Wilson disease. Lancet 1980; ii: 538-9.
- Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: A familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. Brain 1912; 34: 295-509.
- Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. Nature genet 1995; 9: 210-17.
- Simmer K, Thompson RPH. Trace elements. In: Cohen RD, Lewis B, Alberti KGMM, Denman AH, editors. The metabolic and molecular basis of acquired disease. London: Biallière-Tindall; 1990: 670-5.
- Shokeir MHK, Shreffler DC. Investigations on the nature of ceruloplasmin deficiency in the newborn. Clin Genet 1971; 2: 223-7.
- Scheinberg IH, Sternlieb I. Wilson's disease. In: Smith LH, editor. Major problems in internal medicine. Philadelphia: WB Saunders 1984; 10-12.
- Houwen RHJ. The prevalence at birth, morbidity and mortality of Wilson's disease in the Netherlands. Thesis Rijks-universiteit Groningen; 1991.
- Brewer JB. Wilson disease and canine copper toxicosis. Am J Clin Nutr 1998; 67(suppl): 1087S-90S.
- Kong HL, Yap IL, Keuh YK. Wilson's disease presenting as haemolytic anaemia and its successful treatment with penicillamine and zinc. Singapore Med J 1996; 37: 670-2.
- Anderson LA, Haojaravi SI, Boudreaux SK. Zinc acetate treatment in Wilson's disease. Ann Pharmacother 1998; 32: 78-87.
- Sternlieb I. Perspectives on Wilson's disease. Hepatology 1990; 12: 1234-39.
- Whelton MJ, Pope Fm. Azure lanulae in agyria: corneal changes resembling Kayser-Fleischer rings. Arch Intern Med 1968; 121: 267-9.
- Cauza E, Maier-Dobersberger T, Polli C, Kaserer K, Kramer L, Ferenci P. Screening for Wilson's disease in patients with liver disease by ceruloplasmin. J Hepatol 1997; 27: 358-62.
- Faa G, Nurchi V, Demelia L, Ambu R, Parado G, Congiu T et al. Uneven hepatic copper distribution in Wilson's disease. J Hepat 1995; 22: 303-8.
- Lyon TD, Fell GS, Gaffney D, McGaw BA, Russell RI, Park RH, Beattie AD et al. Use of stable copper isotope (<sup>65</sup>Cu) in the differential diagnosis of Wilson's disease. Clin Sci (Colch) 1995; 88: 727-32.
- Sternlieb I, Scheinberg IH. The role of radiocopper on the diagnosis of Wilson disease. Gastroenterology 1979; 77: 138-42.

18. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, Grimm G, Pabinger I, Madl C, Maier- Dobersberger T, et al. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology* 1997; 113: 212-8.
19. Frydman M, Bonne- Tamir B, Farrer LA, Conneally PM, Magazik A, Ashbel S, et al. Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to esterase D locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1819-21.
20. Farrer LA, Bowcock AM, Hebert JM, Bonne-Tamir B, Sternlieb I, Giagnheddu M, et al. Predictive testing for Wilson's disease using tightly linked and flanking DNA markers. *Neurology* 1991; 4: 992-9.
21. Stewart EA, White A, Tomfohrde J, Osborn- Lawrence S, Prestridge L, Bonne-Tamir B, et al. Polymorphic microsatellites and Wilson disease (WD). *Am J Hum Genet* 1993; 53: 864-873.
22. Bull, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporing P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genetics* 1993; 5: 327-337.
23. Thomas GR, Bull PC, Roberts EA, Walsche JM, Cox DW. Haplotype studies in Wilson disease. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 71-78.
24. Waldenström E, Lagerkvist A, Dahlman T, Westermark K, Landegren U. Efficient detection of mutations in Wilson's disease by manifold sequencing. *Genomics* 1996; 37: 303-9.
25. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Nurchi A, Sturniolo GC, et al. Further delineation of the molecular pathology of Wilson's disease in the mediterranean population. *Hum Mutat* 1998; 12: 89-94.
26. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Loi A, Deiana A, et al. Wilson disease mutations associated with uncommon haplotype in the mediterranean patients. *Hum Genet* 1996; 98: 640-2.
27. Tsai CH, Tsai FJ, Wu JY, Chang JG, Lee CC, Lin SP, et al. Mutation analysis of Wilson disease in Taiwan and description of six new mutations. *Hum Mutat* 1998; 12: 370-6
28. Kempainen R, Palatsi R, Kallionen M, Oikarinen A. A homozygous nonsense mutation and a combination of two mutations of the Wilson disease gene in patients with different lysyl oxidase activities in cultured fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 35-9.
29. 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 analysis. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 317-328.
30. Chuang LM, Wu HP, Jang MH, Wnag TR, Sue WC, Lin BJ, et al. High frequency of two mutations in codon 778 in exon 8 of the ATP7B gene in Taiwanese families with Wilson disease. *J Med Genet* 1996; 33: 521-3.
31. Yamaguchi A, Matsuura A, Arashima S, Kikuchi Y, Kikuchi K. Mutations of the ATP7B gene in Wilson disease in Japan: identification of nine mutations and lack of clear founder effect in a japanese population. *Hum mutat* 1998; suppl (6): s320-2.
32. Nanji MS, Nguyen VTT, Kawasoe JH, Kawasoe JH, Inui K, Endo F, et al. Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson's disease. *Am J Human Genet* 1997; 60: 1423-9.
33. Tanzi RE, Petrukhin K, chernov JL, 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: 344-350.
34. Kim EK, Yoo OJ, Choi SY, Cho SW, Hahn SH. Identification of three novel mutations and a high frequency of the Arg778Leu mutation in Korean patients with Wilson disease. *Hum Mutat* 1998; 11: 275-8.
35. Kalinsky H, Funes A, Zeldin A, Pel-Or Y, Korotishevsky M, Gershoni- baruch, et al. novel ATP7B mutations causing Wilson's disease in several ethnic groups. *Hum Mutat* 1998; 11: 145-151.
36. Orrù S, Thomas G, Loizedda A, Cox DW, Contu L. 24 bp deletion and Ala1278 to Val mutation of the ATP7B gene in a Sardinian family with Wilson disease. *Hum Mutat* 1997; 10: 84-85.
37. Shimuzu N, Kawase C, Nakazano H, Hemmi H, Shimatake H, Aoki T. A novel RNA splicing mutation in japanese patients with Wilson disease. *Bioch Biophys Res Commun* 1995; 217: 16-20.
38. Figus A, Angius A, Loudianos G, Bertini C, Dessi V, Loi A, et al. Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson disease in mediterranean. *Genet* 1995; 57: 1318-1324.
39. Lutsenko S, Cooper MJ. Localisation of the Wilson's disease protein product to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6004-9.
40. Walsche JM. Penicillamine Anew oral therapy for Wilson's disease. *Am J Med* 1956; 21: 21: 487-95.
41. Anderson LA, Haojaravi SI, Boudreaux SK. Zinc acetate treatment in Wilson's disease. *Ann Pharmacother* 1998; 32: 78-87.
42. Hoogenraad TU, Van Hattum J, Van den Hamer CJA. Management of Wilson's disease with zinc sulfate. Experience in a series of 27 patients. *J Neurol Sci* 1987; 77: 137-46.
43. Kassam N, Witt N, Kneteman N, Bain VG. Liver transplantation for neuropsychiatric Wilson disease. *Can J of Gastroenterol* 1998; 12: 65-8.
44. Brewer GJ, Terry CA, Aisen AM, Hill GM. Worsening of neurologic syndrome in patients with Wilson's disease with initial penicillamine therapy. *Arch Neurol* 1987; 44: 490-3.
45. Kiss JE, Berman D, Van Thiel D. Effective removal of copper by plasma exchange in fulminant Wilson's disease. *Transfusion* 1998; 38: 327-31.
46. Devesa R, Alvarez A, de las Heras G, de Miguel JR. Wilson's disease treated with trientine during pregnancy. *J Pediat Gastroent Nutr* 1995; 20: 102-103.
47. Hartard C, Kunze K. Pregnancy in a patient with Wilson's disease treated with D-penicillamine and zinc sulfate: a case report and review of the literature. *Europ Neurol* 1994; 34: 337-340.
48. Messner U, Gunter HH, Niesert. Wilson disease and pregnancy. Review of the literature and case report. *Z Geburtshilfe Neonatol* 1998; 202: 77-9.
49. Kumar A, Riely CA. Inherited liver disease in adults. *West J Med* 1995; 163: 382-6.

---

## Summary

*Two families with Wilson's disease: a clinical and diagnostic overview. Meulen SB van der, Pouwels JGJ, Abbes AP, Brugge-man BEJM and Engel H. Ned Tijdschr Klin Chem 2001; 26: 28-34.*

Wilson's disease is an autosomal recessive disorder of copper metabolism, resulting in the accumulation of copper in the liver, skin, brain and kidneys. By linkage studies the gene for Wilson's disease was assigned to chromosome 13 (13q14.3-21). Until now about 134 different mutations are described. The worldwide incidence of Wilson's disease has been estimated between 1:35,000 and 1:100,000. The carrier frequency is 1:90 and a gene frequency 0.56%. In the Netherlands the prevalence has been estimated 1:75,000. In this report we describe a clinical and diagnostic overview of Wilson's disease and we describe two families and family members with Wilson's disease, in both pedigrees, a heterozygous, previously described His1069Gln mutation was identified as well as in both pedigrees a second novel mutation, a heterozygous Leu549Pro and heterozygous 3742CA insertion, respectively.

*Key-words: Wilson's disease; autosomal recessive; accumulation of copper; mutations in ATP7B gen; ceruloplasmine*