

MALASSORBIMENTO INTESTINALE SELETTIVO DI COBALAMINA CON PROTEINURIA (SINDROME DI IMERSLUND-GRÄSBECK) NEI BEAGLE GIOVANI

J.C. Fyfe, S.L. Hemker, P.J. Venta, B. Stebbing, e U. Giger

J Vet Intern Med 2014;28:356–362

Contesto: Il malassorbimento intestinale selettivo di cobalamina con proteinuria lieve (Sindrome di Imerlund-Gräsbeck, I-GS), è un disturbo autosomico recessivo dei cani, causato da mutazioni di AMN o CUBN, che perturbano le funzioni del [cubam](#) e che può presentarsi come un'emergenza medica.

Obiettivi: Descrivere le basi cliniche, metaboliche e genetiche dell'I-GS nei Beagle.

Animali: Quattro Beagle cobalamina-deficienti, 43 Beagle clinicamente normali e 5 cani di altre razze.

Metodi: Descrizione clinica e studio genetico del gene candidato.

Le escrezioni di proteine e acidi organici urinari sono state determinate rispettivamente mediante SDS-PAGE e gas-cromatografia.

L'espressione della proteina cubilina renale è stata valutata con tecnica [immunoblot](#).

La scoperta della mutazione è stata effettuata mediante amplificazione di PCR e sequenziamento del DNA di esoni con siti di giunzione laterale e cDNA di CUBN e AMN.

La genotipizzazione è stata effettuata con digestione di enzimi di restrizione degli ampliconi della PCR.

Risultati: I giovani Beagle affetti hanno esibito un ritardo nella crescita, una disematopoiesi con neutropenia, una deficienza di cobalamina sierosa, un'aciduria metilmalonica, un'iperammoniemia e una proteinuria.

I reni dei cani colpiti erano privi di proteina cubilina rilevabile.

Tutti i cani colpiti erano omozigoti per una delezione a base singola nell'esone 8 di CUBN (CUBN c.786delC), prevedendo uno spostamento traslazionale, e i 2 genitori testati erano eterozigoti.

Conclusioni: La mutazione del CUBN, nei giovani Beagle I-GS, provoca un malassorbimento di cobalamina più grave che non nei Border Collie con un diverso difetto di CUBN, ma è simile alla I-GS causata da mutazioni di AMN negli Schnauzer giganti e nei Pastori Australiani.

La consapevolezza del disturbo e le predisposizioni di razza per la I-GS sono fondamentali per diagnosticare precisamente e per trattare prontamente il malassorbimento ereditario di cobalamina, nonché per prevenire le malattie nelle future generazioni dei cani a rischio.

Parole chiave: Cubam; Citopenia; Errore congenito del metabolismo; Aciduria metilmalonica; Vitamina B₁₂.

Abbreviazioni:

AMN	amnionless
bp	coppia di basi
CUBN	cubilina
Cubam	complesso di recettori funzionali composto da subunità AMN e CUBN

DNA	acido desossiribonucleico
I-GS	sindrome Imerslund-Gräsbeck
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
MMA	acido metilmalonico
PCR	reazione a catena della polimerasi
SDS-PAGE	elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di dodecil-solfato di sodio
VHUP	Veterinary Hospital della University of Pennsylvania
VSS	Servizi Specialistici Veterinari

Dal *Laboratory of Comparative Medical Genetics (Fyfe, Hemker)* e dal *Department of Microbiology & Molecular Genetics, (Fyfe, Venta) College of Veterinary Medicine, Michigan State University, East Lansing, MI*; da *Veterinary Specialist Services, Underwood, QLD 4119, Australia (Stebbing)*; e da *Section of Medical Genetics, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA (Giger)*.

Autore Corrispondente: J.C. Fyfe, *Laboratory of Comparative Medical Genetics, Biomedical & Physical Sciences, 567 Wilson Road, Rm 2209, East Lansing, MI 48824*; e-mail: fyfe@msu.edu

Inviato il 19 settembre 2013; Rivisto il 4 novembre 2013; Accettato il 19 novembre 2013.

Copyright © 2014 by the *American College of Veterinary Internal Medicine*

10.1111/jvim.12284

Il malassorbimento selettivo della cobalamina intestinale (vitamina B₁₂), accompagnato da proteinuria a medio o basso peso molecolare, è un tratto autosomico recessivo (OMIA #000565-9615) nello Schnauzer gigante ¹, negli Australian Shepherds ² e nei Border Collies ³⁻⁵.

La sindrome è chiamata Sindrome di Imerslund-Gräsbeck (I-GS; OMIM #261100), dopo che i 2 studiosi l'hanno contemporaneamente descritta in famiglie umane di Norvegia e Finlandia ^{6,7}.

Il malassorbimento intestinale del singolo nutriente, accoppiato col fallito riassorbimento tubulare renale di un sottoinsieme di proteine filtrate dai glomeruli, è causato da mutazioni che inficiano la funzione del cubam in quei tessuti. Il cubam ⁸ è un recettore eteromero, multi-ligando, endocitico, composto da 2 subunità proteiche distinte, la cubilina (CUBN) ⁹ e l'amnionless (AMN) ¹⁰.

Mentre diverse mutazioni di AMN e CUBN si verificano negli esseri umani con I-GS ¹¹, sono state trovate solo 2 mutazioni di AMN ² e, più recentemente, una singola mutazione di CUBN ¹², in 3 differenti razze canine colpite.

La subunità codificata dalla CUBN è una grande proteina glicosilata (~460 kDa), dell'orletto a spazzola ileale e di quello del tubulo renale prossimale, che fornisce siti di legame per vari ligandi specifici, tra cui il complesso fattore intrinseco cobalamina (Cbl-IF), l'albumina, la proteina legante la vitamina D, l'aptoglobina, l'apolipoproteina A1, e altre ¹³. Il gene codificante la CUBN comprende 67 esoni sul cromosoma canino 2, e l'mRNA è 11,3 kb.

La subunità codificata dall'AMN è una proteina di membrana glicosilata di tipo I di ~50 kDa, che interagisce con la CUBN per fornire ancoraggio alla membrana per i motivi dei segnali complessi ed endocitici che avviano la nucleazione della cavità rivestita di clatrina ¹⁴.

Il gene codificante AMN comprende 12 esoni sul cromosoma canino 8, e l'mRNA è di 1,54 kb. Studi di tessuti umani e canini, con mutazioni in uno dei due geni, dimostrano che ciascuna subunità dipende dalla struttura quasi-normale dell'altra, per l'espressione dell'orletto a spazzola epiteliale e per la funzione del complesso recettoriale *cubam* ^{2,15}.

Nei pazienti umani e canini con I-GS, il malassorbimento di cobalamina può essere pericoloso per la vita, a causa della conseguente deficienza di vitamine e dei catastrofici disordini metabolici, a meno che esso non sia rapidamente e specificamente trattato con cobalamina parenterale. La proteinuria che lo accompagna è benigna e persiste per tutta la vita, nonostante il trattamento ^{1-5,12,16,17}.

L'espressione del *cubam* è interrotta da distinte mutazioni dell'AMN ² negli Schnauzer Giganti e nei Pastori Australiani, nonché da una mutazione del CUBN nei Border Collie ¹².

Una precoce insorgenza di deficienza di cobalamina si verifica anche nei Beagle degli Stati Uniti e dell'Australia^{18,19}. Qui, forniamo la prova genetica clinica, biochimica e molecolare del fatto che questa grave I-GS è causata da una mutazione del CUBN, e che può essere efficacemente trattata, se diagnosticata prontamente.

Materiali e metodi.

Animali.

Sono stati studiati quattro Beagle cobalamina-deficienti.

I reperti clinici di due di essi erano stati segnalati in precedenza^{18,19}. Quelli degli altri due sono stati determinati dalle cartelle cliniche delle strutture di riferimento, l'Ospedale Veterinario dell'Università di Pennsylvania (VHUP) e il Veterinary Specialist Services (VSS).

Tutti i test clinici di routine, qui riportati, sono stati eseguiti su campioni freschi al momento della indagini cliniche originali, e con metodi disponibili per ogni clinica attraverso laboratori commerciali o in ospedale.

Inoltre, sono stati studiati i cani legati a un cane colpito, provenienti da una grande famiglia di Beagle, e raccolti dal *Veterinary Specialist Services* (VSS) a Brisbane, in Australia. L'isolamento del DNA di sangue intero o dei tessuti era disponibile per tutti i cani nello studio; l'urina era disponibile per 2 cani colpiti, così come per i normali Beagle di controllo. Il sangue è stato conservato a 4° C in acido etilendiamminotetraacetico, fino a 2 settimane prima dell'isolamento del DNA. Reni e fegato di 1 Beagle affetto sono stati congelati durante l'autopsia, e conservati a -80° C.

I campioni del DNA di Beagle estranei e clinicamente normali, nonché di altri cani di razza, provenivano dagli archivi di laboratorio. Gli acidi organici urinari e le proteine sono stati valutati e identificati, come precedentemente descritto¹². L'urina è stata conservata a -80°C per un massimo di 1 mese prima dello studio.

Gli studi sono stati approvati dall'*Institutional Animal Care and Use Committee*.

Immunotrasferimento.

L'espressione della proteina è stata valutata mediante immunotrasferimento della CUBN del detergente omogenato di proteine estratte della corteccia renale, separate su gel SDS-poliacrilammide con gradiente 4-20%.

La CUBN è stata rilevata su membrane di polivinile difluoride (PVDF), sequenzialmente incubate con una diluizione 1:30.000 del siero della CUBN anti-cane policlonale di coniglio²⁰, precedentemente caratterizzata, con 20 IgG di cavallo per capra e anti-coniglio coniugate con perossidasi di rafano^a (1:20.000) e con reagenti di chemiluminescenza^b.

Il caricamento del gel è stato valutato mediante individuazione di proteine DNA-PK, utilizzando un anticorpo precedentemente descritto²¹ (1:1.000; dono della Dr.ssa Katheryn Meek, *Michigan State University*).

La relativa quantificazione dei segnali del [Western Blot](#) è stata effettuata con l'Imager Molecolare del software Image Lab del Bio-Rad Chemi Doc XRS+^c.

Note

^a cat. # 141506, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc, Gaithersburg, MD

^b Western Lightning ECL Plus, PerkinElmer, Inc, Waltham, MA

^c Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA

Sequenziamento di CUBN ed AMN.

Il DNA genomico è stato preparato da sangue intero o da tessuti congelati, con metodi standard².

Gli esoni del CUBN e le sequenze dei siti di giunzione laterale erano amplificati mediante PCR dal DNA genomico (le sequenze dei primer PCR sono nella tabella S1 del riferimento 12).

Una porzione di cDNA del CUBN è stata amplificata mediante RT-PCR dal RNA totale del rene, come precedentemente descritto², utilizzando un innesco oligo-dT della reazione RT, e dei primer di PCR 5'-GCCCTCTGTGCTCAGTTGATG T-3' (CUBN c.482-503, esone 6) e 5'-GTGGCAGCCTCCATTATTGACT-3' (CUBN c. 1053-1074, esone 9).

Gli esoni e le sequenze dei siti di giunzione laterale dell'AMN sono stati similmente amplificati dal DNA genomico (le sequenze del primer di PCR sono nella Tabella S1).

Gli ampliconi sono stati sequenziati usando i primer di amplificazione, e assemblati per il confronto con l'assemblea dei genomi di referenza canina CanFam 3.1 e con le sequenze cDNA di AMN e CUBN (numeri rispettivi di assunzione: GenBank AY368152.1 e AF137068.1).

Le nuove sequenze genomiche AMN ottenute da questo studio sono state depositate in GenBank (assunzione n. KF445236), perché gli esoni 1, 2 e 4-9 di AMN mancano dalla sequenza di riferimento canino, a causa di due grandi lacune del gruppo, nonché di aree di scarsa qualità della sequenza.

Le mappe AMN a CanFam 3.1 hanno coordinate Chr8:70,798,913 - 70.807.835.

Genotipizzazione della mutazione del CUBN.

Il sito della mutazione dell'esone 8 del CUBN era amplificato dal DNA genomico, utilizzando i primer 5'-AGGGTTTTCCAGTCACGACGC TTTCTTGCTCATTTTCGTGAT-3' e 5'-GCATGCTGGAG ATTGCACAC-3', creando un amplicone di 170 bp. Il nucleotide sottolineato in grassetto del secondo primer introduce una modifica della sequenza nell'amplicone, che crea un sito di riconoscimento dell'enzima di restrizione Msl I (CAYNNNNRTG) nel normale allele, che non è nella sequenza nativa, e che si perde nell'allele mutante.

Le prime 20 basi del *primer forward* non corrispondono alla sequenza del cane, ma sono incluse per aumentare la risoluzione delle bande diagnostiche. I prodotti di amplificazione sono stati digeriti con Msl I, e i frammenti sono stati separati su gel di agarosio al 4%.

Risultati.

Presentazioni cliniche.

Caso 1. Una femmina Beagle non sterilizzata di 4 mesi di età è stata presentata in una clinica di cure primarie, con una storia di inappetenza per 1 mese e letargia da alcuni giorni. La cucciola era magra (punteggio di condizione corporea = *body condition score* [BCS] 3/9) ed è stata trovata con ancilostomiasi, coccidiosi, demodicosi e dermatofitosi.

Nonostante i trattamenti antiparassitari di routine nel corso del mese successivo, la cucciola continuava ad avere poco appetito, una diarrea intermittente e un'alopecia focale, ed è diventata più magra (BCS 2,5/9).

I test diagnostici a 5 mesi di età hanno rivelato un'anemia normocitica-normocromica e rigenerativa (Hct 27% [range di riferimento normale 35-58]; MCV 63 fL [62-77], MCHC 35 g/dL [30-35]; reticolociti 85.600/ μ L [<60000]) con leucogramma normale (WBC 8100/ μ L [5,300-19,000]; neutrofili 5022/ μ L [3.100-14.400]).

C'era ipoproteinemia (albumina 2,6 g/dL [2,5-3,7], globulina 1,7 g/dL [2,4-4,0]).

Le concentrazioni degli elettroliti sierici e il test di stimolazione ACTH erano normali.

C'era una cobalamina non misurabile nel siero, delle concentrazioni di folato leggermente aumentate (11,5 μ g/L [4,8-8,6]), e una normale immunoreattività tripsina-simile (17 μ g/L [5-35]).

È stata fatta una diagnosi di malattia intestinale causata da proliferazione batterica, e la cucciola è stata trattata con tilosina orale quotidiana e 1 iniezione sottocutanea di 0,5 mg di cianocobalamina.

A 7 mesi di età, la cagna è stata presentata con vomito recente, diarrea intermittente continua, letargia e inappetenza. A causa della continua ipoproteinemia, era stata ipotizzata un'enteropatia da perdita di proteine con possibile malattia del fegato.

Ha ricevuto fluidi endovena e un trattamento antiemetico, ed è stata dimessa il giorno successivo dopo aver mangiato, quando sembrava avere un miglioramento clinico.

A 9 mesi di età, è stata esaminata due volte in 3 giorni dai veterinari di assistenza primaria per la recidiva di vomito e diarrea, per un peggioramento dei suoi segni clinici (letargia, inappetenza e debolezza) e per un calo continuo delle condizioni del corpo (4,5 kg).

Gli esami di routine hanno evidenziato anemia (Hct 33%), leucopenia (WBC 520/ μ L; neutrofili 310/ μ L), trombocitopenia (114.000/ μ L [177,000-398,000]), e ipoproteinemia (albumina 1,7 g/dL, globulina 1,9 g/dL).

Ha ricevuto una terapia di supporto, comprensiva di fluidi somministrati endovena, antiemetici, sucralfato e antibiotici, ed è stata trasferita al VHUP il giorno seguente.

Alla presentazione, la cagna era letargica, sensibile a malapena, disidratata, ipotermica (97.9°F), e magra.

Ha vomitato sangue e aveva ematochezia. La ripetizione del test ha confermato un'anemia normocromica-normocitica, una leucopenia e una trombocitopenia.

Le macchie di sangue periferico hanno rivelato un'ipersegmentazione nucleare dei neutrofili e alcuni metarubriciti. Inoltre, c'era iperglicemia (202 mg/dL [60-110]), ipokaliemia (2,4 mmol/L [2,5-5,5]), ipoproteinemia (albumina 1,6 g/dL, globulina 1,5 g/dL), ipocalcemia (4,4 mg/dL [9,8-11,7]), ipomagnesiemia (1,2 mg/dL [1,6-2,5]), ipocolesterolemia (88 mg/dL [128-317]) e iperammoniemia (175 μ mol/L [11-35]).

La concentrazione di acido metilmalonico (MMA) nelle urine era 5.830 mmol/mmol di creatinina (normale <4). Nonostante la terapia intensiva, comprensiva dell'integrazione di cobalamina, calcio e magnesio, la cagna ha sviluppato polmonite da aspirazione, ed è morta di arresto cardiorespiratorio in un giorno.

I campioni di tessuto sono stati immediatamente congelati per le successive analisi molecolari.

La necropsia ha dimostrato un midollo osseo ipocellulare con emosiderosi, una severa enteropatia necrotizzante e una moderata polmonite batterica interstiziale, regionalmente vasta e acuta.

Caso 2. Un giovane Beagle maschio, con segni di deficienza di cobalamina, è stato studiato al VHUP. Aveva una presentazione e un decorso clinico simili al caso 1, ma è stato trattato con successo. I dettagli clinici sono stati pubblicati in precedenza ¹⁸.

L'aggressiva somministrazione parenterale di cianocobalamina ha portato alla completa normalizzazione clinica e di laboratorio entro 5 giorni, e al rientro nel peso normale - per l'età - entro 3 mesi.

Con un trattamento che dura per tutta la vita (~50 μ g di cianocobalamina / kg di peso corporeo, SC, q3-4 settimane), il cane ha vissuto per 9 anni senza segni ricorrenti, ad eccezione di una proteinuria persistente (da 1+ a 2+ su un'asta di livello).

Sangue e urine sono stati ottenuti per analisi molecolare. Il rapporto proteina urinaria-creatinina era 0,3 [<0,4], ma la SDS-PAGE delle proteine urinarie concentrate ha dimostrato un'escrezione selettiva di proteine di un discreto peso molecolare "da-medio-a-basso", identificate come albumina, proteina legante-vitamina D, aptoglobina ed apolipoproteina A-I, ciascuna delle quali è un ligando della cubilina (Fig. 1, striscia 1).

Questo modello di escrezione proteica non è stato osservato nelle urine di un normale Beagle (striscia 2) o di cani sani di altre razze ¹².

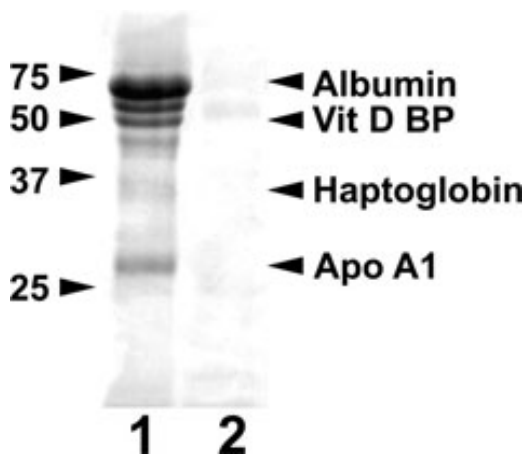


Fig 1. Proteinuria selettiva in un Beagle con I-GS.

Vengono mostrate le strisce di un gel SDS-PAGE al 15% colorato con argento, caricato con proteine dell'urina di un malato (**Caso 2**; striscia 1) e un Beagle clinicamente normale (striscia 2).

Le proteine in ciascuna striscia sono state concentrate da campioni di urina contenenti 50 μ g di creatinina.

Al momento della raccolta delle urine, il cane affetto era in remissione clinica e metabolica, a causa della precedente somministrazione parenterale di cianocobalamina.

La migrazione dei marcatori di peso molecolare (kDa) è indicata a sinistra.

Casi 3 e 4. Un beagle maschio è stato presentato a 4,5 mesi di età per scarso appetito e insuccesso nel guadagno di peso nei precedenti 2 mesi. I test diagnostici hanno rivelato un'anemia non rigenerativa e normocromica-normocitica (Hct 30%; MCV 67 fL; MCHC 34 g/dL; reticolociti 32.000/ μ L con leucogramma normale. C'era ipoproteinemia (albumina 2,5 g/dL, globulina 1,7 g/dL).

La T4 totale (22 nmol / L), la lipasi pancreatico (138 μ g/L) e gli acidi biliari nel siero, prima e dopo un pasto (rispettivamente 3 e 3 μ mol/L) erano normali. Non è stata istituita una terapia specifica. Un mese dopo, il cucciolo non aveva ancora guadagnato peso ed era rimasto anemico, ma dall'emocromo sono stati notati 5 eritrociti nucleati / 100 leucociti [<2 NRBC è normale] e neutropenia (2500/ μ L).

La precedente consapevolezza dei casi nei Beagle ¹⁹ nella zona locale ha fatto sì che la deficienza di cobalamina fosse il primario criterio diagnostico di esclusione.

Le iniezioni di cianocobalamina (50 μ g/kg di peso corporeo, sottocute, ogni 2 settimane) hanno corretto tutti i segni clinici e le anomalie ematologiche. L'appetito del cane è tornato normale in un giorno, e il suo peso si è normalizzato in un mese.

Il **Caso 3** condivide una stretta ascendenza con una Beagle femmina che non riusciva a crescere dai 7 mesi di età (**Caso 4**) e che era stata identificata come **Caso 1** nella serie di casi di deficienza congenita di cobalamina nei Beagle da Brisbane ¹⁹.

Il **Caso 4** ha risposto completamente alla somministrazione parenterale di cobalamina, e rimane in remissione con iniezioni (una o due volte al mese) di cianocobalamina (50 µg/kg di peso corporeo, sottocute) da una diagnosi di 7 anni prima. Il sangue è stato raccolto per l'analisi genetica dai cani affetti dei **Casi 3 e 4**, da 2 dei loro genitori e da altri 3 membri clinicamente normali del gruppo degli affini.

Espressione della proteina del CUBN.

La proteinuria selettiva nel **Caso 2**, comprendente ligandi di cubilina, come dimostrato in questo studio, ha suggerito una fallita espressione di cubilina nelle cellule tubulari prossimali. Pertanto, partendo dal presupposto che ciascuno dei Beagle ha esposto lo stesso difetto molecolare, abbiamo generato *immunoblot* di proteine della corteccia del rene dal **Caso 1** e da 2 cani di controllo normali (Fig 2).

L'espressione di cubilina non era rilevabile nel tessuto del cane malato (striscia 1), anche se la quantità di proteine totali caricate in quella striscia era 2,5 volte maggiore di quella nelle strisce di controllo, in cui la cubilina era evidente (strisce 2 e 3).

L'espressione della proteina di controllo DNA-PK era evidente nei reni dei cani affetti e nei cani di controllo, in quantità che si correlavano con le differenti quantità di proteine caricate.

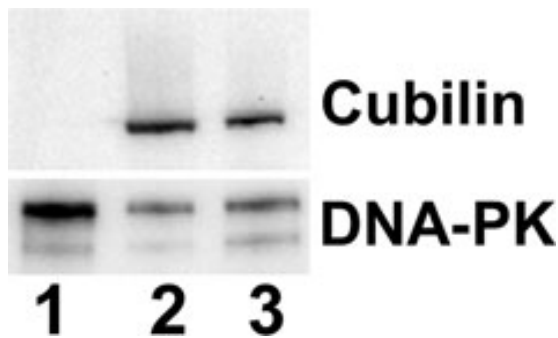


Fig 2. Mancanza di proteina cubilina nel rene di un Beagle con IGS.

La proteina solubilizzata con detergente degli omogenati della corteccia renale di un malato (**Caso 1**; striscia 1, 50 µg di proteina) e di 2 cani di controllo clinicamente normali (strisce 2 e 3, 20 µg di proteine ciascuno) sono state separate con SDS-PAGE con gradiente non riducente del 4-20% e asciugati.

Nel pannello superiore, la macchia è stata sviluppata mediante incubazione con siero di cubilina anticane di coniglio.

Nel pannello inferiore, la macchia è stata sviluppata mediante incubazione con un anticorpo monoclonale di topo anti-DNA-PK umano, quale controllo per il caricamento e l'integrità delle proteine.

Scoperta delle sequenze e della mutazione di AMN e CUBN.

Abbiamo amplificato i 12 esoni AMN con siti di giunzione laterale e 2,32 kb di sequenza di introni dal DNA genomico del **Caso 2**. Non c'erano varianti di sequenza esonica o di giunzione, ma abbiamo notato eterozigotità in diversi siti intronici, in tutto il locus (Tabella S1). I 67 esoni CUBN con siti di giunzione laterale, e 20.488 bp di sequenza intronica, erano amplificati dal DNA genomico del **Caso 1**.

Non c'erano variazioni di sequenza nei siti di giunzione, e neppure nei siti eterozigoti.

L'unica variazione di sequenza, che potrebbe incidere sull'effetto di codifica di una proteina, era una delezione omozigote di una singola citosina nell'esone 8 (CUBN c.786delC; Fig 3A).

La stessa mutazione è stata trovata nel cDNA del **Caso 1**, coi prodotti del sequenziamento RT-PCR, e nel DNA genomico del **Caso 2**. La delezione a singola base prevede uno spostamento della cornice di lettura della traduzione e un prematuro codone di stop, 45 codoni dopo la cancellazione (p. C264Sfs*45).

Genotipizzazione della mutazione del CUBN.

La cancellazione dell'esone 8 non è stata osservata nel DNA di 5 Beagle normali, col sequenziamento del sito di mutazione. Per studi più grandi, abbiamo progettato un comodo saggio di genotipizzazione allele-specifica per la cancellazione, basato sulla amplificazione PCR del DNA genomico seguita dalla digestione degli enzimi di restrizione dell'amplicone 170 bp.

Il primer inverso ha introdotto un cambiamento nella sequenza di ampliconi, che ha creato uno sfaldamento del sito di Msl I, quando amplificato dal normale allele, ma non da quello mutante.

Pertanto, l'allele normale è determinato dai prodotti della digestione di 111 e 23 bp, mentre l'allele di delezione si determinava in un prodotto di 134 bp. Il DNA digerito, amplificato da entrambi gli alleli, ha dimostrato un ulteriore prodotto del bp 36, a causa di un "taglio di controllo" progettato per indicare un'adeguata funzione dell'enzima di restrizione con ogni campione.

Per convalidare il test, abbiamo provato i campioni precedentemente sequenziati da 2 cani normali e da 5 cani affetti, e non abbiamo trovato alcun contrasto. Il dosaggio sul compendio di restrizione è stato applicato ai campioni dei **Casi 3 e 4**, e ai cani con loro imparentati, di origine Australiana (Fig 3B), nonché a cani normali non imparentati. Mentre i due cani affetti, del gruppo di affini disponibili, erano omozigoti per l'allele mutante, 2 genitori dei cani affetti e altri 3 cani clinicamente normali del gruppo di affini erano eterozigoti.

Altri tre, nel gruppo degli affini, erano omozigoti per l'allele normale. L'allele eliminato non è stato osservato in nessuno dei 40 Beagle clinicamente normali provenienti dal Nord America, né è stata osservata la mutazione dei Beagle nei cani affetti da I-GS di altre 4 razze, e in un cane bastardo.

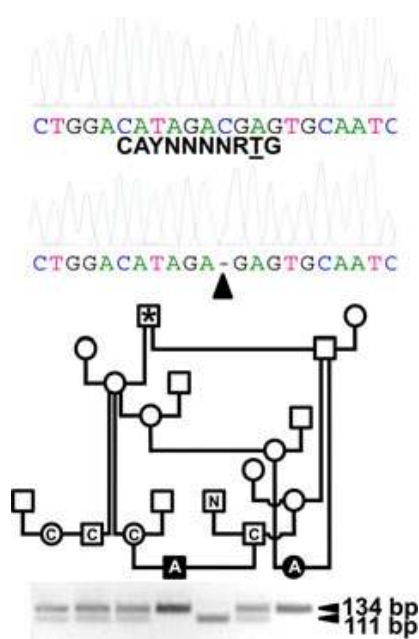


Fig 3. Delezione della citosina dell'esone 8 del CUBN e test di genotipizzazione nei Beagle.

Il pannello A mostra elettroforetogrammi di sequenza dal sito di mutazione del Beagle I-GS di un cane normale (in alto) e di un cane affetto (**Caso 1**; in basso). La singola delezione della citosina (CUBN c.786delC) è indicata da una punta di freccia.

Il pannello B mostra i risultati di un *digest* di restrizione Msl I allele-specifico di prodotti PCR amplificati dal DNA genomico.

La sequenza del sito di riconoscimento Msl I è indicata in nero sotto la sequenza normale nel pannello A.

La T sottolineata del sito di riconoscimento è introdotta nella sequenza dell'amplicone dal primer PCR inverso.

Il prodotto PCR da 170 bp amplificato dal DNA genomico del cane normale ha due siti di restrizione Msl I, ma la delezione I-GS del Beagle cancella un sito. Pertanto, la lunghezza del frammento diagnostico dall'allele normale è 111 bp, mentre quella dell'allele deleto è 134 bp. Il frammento di taglio del controllo di 36 bp non è mostrato. Le strisce di un gel di genotipizzazione (4% di agarosio) sono allineate sotto i simboli dei Beagle della stirpe del Pastore Australiano che sono stati testati. I cani affetti sono indicati da simboli aperti; i quadrati sono maschi e i cerchi sono femmine.

La femmina colpita in basso a destra era il **Caso 4** (**Caso 1** nel riferimento 19) e il maschio colpito era il **Caso 3** di questo rapporto.

L'asterisco indica un antenato comune a ciascuno dei genitori della prole affetta disponibile per il test. La lettera in ogni simbolo indica il genotipo determinato dal test: affetto (A), portatore (C) e normale (N).

Discussione.

Descriviamo qui le caratteristiche clinico-patologiche, le anomalie biochimiche e la base genetica molecolare del malassorbimento selettivo di cobalamina con proteinuria (I-GS) in 4 Beagle giovani.

La stessa mutazione del CUBN ha provocato l'I-GS in ciascuno di questi casi, in un periodo di 15 anni e in 2 continenti. I segni clinici di deficienza di cobalamina nei Beagle, con l'ereditato malassorbimento di cobalamina, si manifestano nel periodo giovanile come depositi fetali di diminuzione di vitamina^{18,19}.

Ciò è in qualche modo differente dall'I-GS dei Border Collie, causata da una differente mutazione del CUBN, in cui l'insorgenza dei segni è spesso ritardata nella prima età adulta, e i segni clinici, in alcuni casi, sono più miti^{1-5,12}.

Segni coerenti nei Beagle, ma anche negli Schnauzer Giganti e nei Pastori Australiani, con I-GS causate da mutazioni di AMN (Fig 4), includono l'inappetenza e il difetto di crescita, spesso osservati dalle 8 alle 12 settimane di età; la disematopoiesi caratterizzata da anemia, la neutropenia con ipersegmentazione nucleare, la metarubricitosi e i cambiamenti megaloblastici nel midollo osseo; i cambiamenti megaloblastici dell'epitelio intestinale; e le interruzioni metaboliche caratterizzate da acidemia/uria metilmalonica, e l'iperomocisteinemia causata dall'inibizione degli enzimi cobalamina-dipendenti.

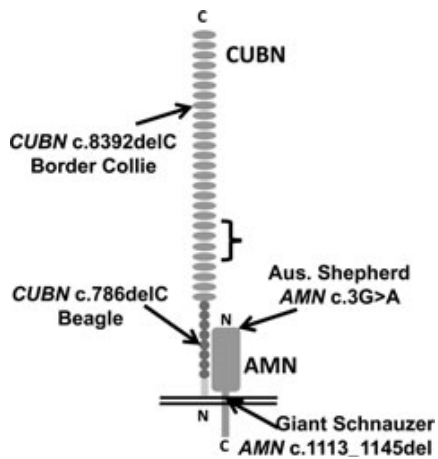


Fig 4. Struttura di *cubam* che mostra i siti di I-GS che causano mutazioni nei cani. Il fumetto illustra la struttura del dominio proteico del *cubam*, composta da subunità di CUBN e AMN. Sono indicati i terminali N e C di ciascuna proteina. La parentesi attorno ai domini CUB 5–8 indica il sito di legame del fattore intrinseco-cobalamina. La membrana plasmatica apicale delle cellule epiteliali è indicata da doppie linee orizzontali e il lato extracellulare è in alto. Ciascun sito di mutazione specifica della razza che causa l'I-GS canina è indicato da una freccia.

Segni variabili di interruzioni metaboliche secondarie comprendono l'iperammoniemia, l'ipoglicemia, la chetoacidosi e l'ipoproteinemia.

Se la diagnosi e il trattamento sono ritardati, i cani affetti mostrano un decorso cronico di inappetenza, letargia, mancato guadagno di peso e di massa muscolare, vomito e diarrea intermittenti, convulsioni e/o una crisi metabolica letale.

È tragico quando l'insuccesso nel diagnosticare il disturbo provoca morbidità o morte, poiché la somministrazione parenterale di cianocobalamina (~1 mg/cane/mese), precocemente avviata, fornisce una rapida e sostenuta remissione ematopoietica e metabolica, che porta a una durata della vita sana e normale.

Nel **Caso 1**, una diagnosi presuntiva iniziale di "proliferazione batterica" ha oscurato il significato della deficienza di cobalamina.

Nel tempo del trasferimento verso una struttura terziaria di assistenza veterinaria a 9 mesi di età, il cane presentava segni e reperti di laboratorio indicativi di un grave scompenso metabolico, ed è morto nonostante l'intervento sull'emergenza sintomatica.

Il **Caso 2** ha avuto un decorso e segni clinici¹⁸ tanto gravi quanto quelli del **Caso 1**, ma l'importante differenza - che ha causato un esito positivo - è stata quella del sospetto clinico di un errore congenito del metabolismo, che ha portato alla diagnosi tempestiva e a uno specifico trattamento, mantenuto per tutta la vita.

Il **Caso 3** della presente relazione, e i sette Beagle di relazione sconosciuta visti nella zona di Brisbane dal 2006 al 2008¹⁹, sono stati presentati con simili segni e decorsi della malattia, ma hanno beneficiato di una precedente esperienza del medico, che ha accresciuto la probabilità diagnostica di una deficienza di cobalamina.

Ciascun cane ha avuto una robusta risposta clinica e di laboratorio alla somministrazione parenterale di cianocobalamina. La proteinuria non era documentata in quei casi, ma la proteinuria selettiva di I-GS nei cani non è quantitativamente differente da ciò che si osserva in molti cani malati e - in alcuni cani - sani (proteina da 1+ a 2+ su un'asta di livello).

La proteinuria specifica dell'I-GS canina o umana è indicativa del fallimento della funzione del *cubam* nei tubuli renali, e quindi persiste nonostante il rifornimento di cobalamina^{1,12,15}.

Il presuntivo malassorbimento di cobalamina, accoppiato a una dimostrata perdita urinaria di ligandi della cubilina, indica un difetto funzionale del *cubam* nell'intestino e nei reni. I casi di una precoce insorgenza di deficienza di cobalamina nei Beagle geograficamente distribuiti (Australia e Stati Uniti) indicano una predisposizione di razza che è altamente suggestiva di una malattia ereditaria.

L'omozigosi, per discendenza di una mutazione che causa la malattia, è un prerequisito di ereditarietà recessiva, come è stato documentato per la I-GS nelle altre razze canine^{1,2,12}.

Inoltre, poiché la malattia non diagnosticata e non trattata è così dannosa nei Beagle, è improbabile che i cani affetti siano stati utilizzati per quegli accoppiamenti che hanno prodotto la prole affetta.

I risultati di questo studio, in cui i cani affetti sono omozigoti per l'allele eliminato e i genitori dei cani affetti sono eterozigoti, sono coerenti con l'ipotesi di una trasmissione autosomica recessiva dell'I-GS del Beagle.

Il **Caso 2** era eterozigote nei siti attraverso il locus genomico di AMN (Tabella S1b), i reperti erano incompatibili con la semplice ereditarietà recessiva dell'I-GS, e non mostrava alcuna mutazione putativa di AMN. Inoltre, studi precedenti ^{1,2,20,22} hanno dimostrato che i tessuti provenienti dai cani I-GS, con mutazioni di AMN, continuano ad esprimere la proteina cubilina come facilmente rilevabile sugli *immunoblot*, nonostante il fatto che essa non raggiunga il confine dell'orletto epiteliale e che provveda alla funzione del *cubam*.

Questa comprensione, accoppiata con una cubilina non rilevabile sui *western blot* della corteccia renale dal **Caso 1**, ha reso il CUBN quale il più probabile gene candidato.

Di conseguenza, abbiamo trovato una sola delezione di base nell'esone 8 del CUBN che era omozigote nei Beagle affetti.

Questa mutazione nello spostamento prevede un codone di risoluzione anticipata della traduzione nel mRNA del CUBN, che attiva quasi certamente i meccanismi intracellulari di degrado del mRNA nonsense-mediato ²³, piuttosto che permettere la produzione di una proteina troncata e/o non funzionale.

I Border Collie con I-GS hanno anche una singola delezione di citosina, ma essa è nell'esone 53 del CUBN e, molto di più, nel 3' del mRNA. Un mRNA ridotto da 10 a 20 volte allo stato stazionario, e una piccola quantità di espressione residua di proteina cubilina nella sua lunghezza, che mantiene l'attività di legame IF-Cbl, sono stati riscontrati nell'ileo e nei reni dei Border Collie affetti ¹².

Una residua espressione di cubilina, che non vediamo nel Beagle affetto, potrebbe spiegare perché la diagnosi in alcuni Border Collie è molto in ritardo, rispetto ai Beagle e alle altre razze, in cui l'espressione del *cubam* è annullata del tutto ².

Anche se la cancellazione dell'allele non è stata osservata in 40 Beagle normali non imparentati, provenienti dagli Stati Uniti, questo numero non è sufficiente per stimare in modo attendibile una frequenza di alleli nella razza. Ciò contrasta con la mutazione I-GS (c.8392delC), che ha una frequenza stimata dell'allele di 0.06 nei Border Collie del Canada e degli Stati Uniti ¹², e quasi la stessa frequenza di alleli nei Border Collie dell'UE continentale ²⁴.

L'aumento nella frequenza della mutazione del CUBN nei Border Collie potrebbe essere causato dall'età apparentemente tarda della diagnosi della I-GS in questa razza (8-48 mesi), dai segni più vari e meno gravi, e dalla possibilità che i cani mediamente affetti potrebbero essere stati utilizzati per la riproduzione.

Per esempio, abbiamo recentemente diagnosticato la I-GS in un Border Collie di quasi 4 anni, con segni di febbre intermittente e neutropenia cronica.

La bassa età media (4 mesi) della presentazione di una malattia grave nei Beagle è più simile a quella degli Schnauzer Giganti e dei Pastori Australiani con mutazioni di AMN ^{1,2}. Le forme 5'-adenosyl- e metil- di cobalamina sono cofattori essenziali per 2 enzimi essenziali del metabolismo intermedio, rispettivamente la L-metilmalonil-CoA mutasi e la metiltransferasi 5-metiltetraidrofolato-omocisteina (meglio nota come metionina sintasi).

La soppressione del flusso del substrato attraverso vie cataboliche, mediata da questi enzimi, dovuta alla deficienza del cofattore di cobalamina, causa direttamente un aumento dell'acido metilmalonico (MMA) e delle concentrazioni di omocisteina nel plasma e dell'acido metilmalonico nelle urine.

L'inibizione dell'attività della metionina sintasi intrappola anche il tetraidrofolato nella forma "5-metil", creando una deficienza cellulare del 5-, 10-tetraidrofolato di metilene richiesto per una reazione di trasferimento di un carbonio per la sintasi di timidilato, per supportare la sintesi del DNA ²⁵.

Così, la deficienza di cobalamina rallenta la maturazione nucleare delle cellule epiteliali ematopoietiche e intestinali in rapida proliferazione, creando i cambiamenti megaloblastici riconosciuti in questi tessuti.

Inoltre, l'aumento delle concentrazioni delle fonti mitocondriali di esteri acil-CoA inibisce secondariamente ulteriori vie metaboliche, tra cui il ciclo dell'urea, la gluconeogenesi e la scissione di glicina, portando a iperammoniemia, ipoglicemia e iperglicemia ²⁶.

Pertanto, i segni della deficienza cronica di cobalamina sono globali, a causa della rottura di diverse vie metaboliche, e potrebbero essere confusi con l'epatoencefalopatia, forse per gli shunt porto-cavali, o con altri disturbi.

Nel giovane Beagle con deficienza di cobalamina, i disturbi prevalenti sono l'inappetenza, la mancanza di un adeguato aumento di peso e il difetto di crescita.

Nessuno di questi segni è specifico, quindi è necessario un alto indice di sospetto, basato sulla predisposizione di razza e sull'età di esordio, per una diagnosi efficiente del malassorbimento ereditario di cobalamina.

La neutropenia con ipersegmentazione e la metarubricitosi sono segni periferici della megaloblastosi, e sono classiche caratteristiche ematologiche della deficienza di cobalamina, che si osservano in questi casi. Tuttavia, i cani con deficit di cobalamina non presentano una macrocitosi eritrocitaria, che è comune nel deficit di cobalamina degli umani, e tale osservazione rimane inspiegabile¹.

Ciò è confermato dalle determinazioni di basse concentrazioni di cobalamina sierosa o di elevate concentrazioni di MMA urinaria. Il malassorbimento acquisito di cobalamina può essere presente nei cani giovani, in presenza di disbiosi gastrointestinale, di resezione chirurgica dell'intestino tenue distale o di insufficienza pancreatica esocrina. La deficienza cronica di cobalamina, per qualunque causa, può creare un generalizzato malassorbimento gastrointestinale secondario, a causa dei cambiamenti megaloblastici dell'epitelio intestinale²⁷.

Di conseguenza, alcuni casi di diarrea cronica non sono efficacemente trattati fino a quando non siano stati reintegrati i depositi corporei di cobalamina. La I-GS è uno dei pochi difetti congeniti del metabolismo, che possono essere trattati prontamente ed economicamente.

La somministrazione parenterale di cianocobalamina, anche in megadosi di diversi mg, ha un ampio margine di sicurezza, perché una vitamina B₁₂, solubile in acqua, che non si lega immediatamente col vettore del plasma - la transcobalamina (TC) -, viene rapidamente escreta per filtrazione glomerulare.

Pertanto, a séguito della raccolta dei campioni per la diagnosi definitiva, un precoce intervento terapeutico, basato sul sospetto clinico, può salvare la vita del paziente.

Tuttavia, la determinazione delle concentrazioni di cobalamina sierica post-trattamento può essere fuorviante, perché la cobalamina lascia lo spazio plasmatico per endocitosi mediata dai recettori del complesso TC-cobalamina, e successivamente si lega come cofattore agli enzimi della metasi e della sintasi della metionina, che hanno entrambi una lunga emi-vita.

Quando il malassorbimento di cobalamina è una condizione permanente, come nella I-GS o nella resezione ileale, e dopo che i deficit di cobalamina sono stati reintegrati, un semplice regime di 1 mg di cianocobalamina, somministrata sottocute ogni 3-4 settimane, è sufficiente per avere normale salute, crescita, riproduzione e attività, anche in un cane di dimensioni medie o grandi. Questo rapporto dovrebbe accrescere la consapevolezza dei medici relativa alla I-GS e alla presentazione clinica.

Mentre la bassa concentrazione sierica di cobalamina, l'aciduria metilmalonica e la risposta al trattamento sono indicative, e il test razza-specifici di mutazione dell'AMN e del CUBN consentono precise diagnosi di I-GS. I test genetici consentono anche la diagnosi prima dello sviluppo dei segni clinici, nonché l'individuazione di portatori asintomatici, per guidare le decisioni sulla riproduzione.

Ringraziamenti

Gli autori riconoscono la valutazione diagnostica e la gestione da parte dello staff dell'Ospedale Veterinario dell'Università della Pennsylvania, e dei medici di Brisbane, Australia, dell'area riferita ai Veterinary Specialist Services.

Supporto concesso: Questo lavoro è stato sostenuto in parte dal NIH Grant OD010939 e dai ricavi del Laboratorio MSU of Comparative Medical Genetics.

Dichiarazione di conflitto di interessi: Gli autori non rivelano alcuna conflitto di interessi.

Riferimenti

1. Fyfe JC, Giger U, Hall CA, et al. Inherited selective intestinal cobalamin malabsorption and cobalamin deficiency in dogs. *Pediatr Res* 1991;29:24–31.
2. He Q, Madsen M, Kilkenney A, et al. Amnionless function is required for CUBN brush-border expression and intrinsic factor-cobalamin (vitamin B12) absorption in vivo. *Blood* 2005;106:1447–1453.
3. Morgan LW, McConnell J. Cobalamin deficiency associated with erythroblastic anemia and methylmalonic aciduria in a Border Collie. *J Am Anim Hosp Assoc* 1999;35:392–395.
4. Battersby IA, Giger U, Hall EJ. Hyperammonaemic encephalopathy secondary to selective cobalamin deficiency in a juvenile Border Collie. *J Small Anim Pract* 2005;46:339–344.
5. Lutz S, Sewell AC, Reusch CE, Kook PH. Clinical and laboratory findings in Border Collies with presumed hereditary juvenile cobalamin deficiency. *J Am Anim Hosp Assoc* 2013;49:197–203.
6. Imerslund O. Idiopathic chronic megaloblastic anemia in children. *Acta Paediatr Scand* 1960;49(Suppl. 119):1–115.
7. Grasbeck R, Gordin R, Kantero I, Kuhlback B. Selective vitamin B12 malabsorption and proteinuria in young people. *Acta Med*

Scand 1960;167:289–296.

8. Fyfe JC, Madsen M, Højrup P, et al. The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of CUBN and amnionless. *Blood* 2004;103:1573–1579.

9. Aminoff M, Carter JE, Chadwick RB, et al. Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, CUBN, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. *Nat Genet* 1999;21:309–313.

10. Tanner SM, Aminoff M, Wright FA, et al. Amnionless, essential for mouse gastrulation, is mutated in recessive hereditary megaloblastic anemia. *Nat Genet* 2003;33:426–429.

11. Tanner SM, Sturm AC, Baack EC, et al. Inherited cobalamin malabsorption. Mutations in three genes reveal functional and ethnic patterns. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:56.

12. Fyfe JC, Hemker SL, Venta PJ, et al. An exon 53 frameshift mutation in CUBN abrogates cubam function and causes Imerslund-Grasbeck syndrome in dogs. *Mol Genet Metab* 2013;109:390–396.

13. Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CBF, et al. Vitamin B12 transport from food to the body's cells - a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:345–354.

14. Pedersen GA, Chakraborty S, Steinhauser AL, et al. AMN directs endocytosis of the intrinsic factor-vitamin B12 receptor cubam by engaging ARH or Dab2. *Traffic* 2010;11:706–720.

15. Storm T, Emma F, Verroust PJ, et al. A patient with CUBN deficiency. *N Engl J Med* 2011;364:89–91.

16. Wahlstedt-Froberg V, Pettersson T, Aminoff M, et al. Proteinuria in CUBN-deficient patients with selective vitamin B12 malabsorption. *Pediatr Nephrol* 2003;18:417–421.

17. Broch H, Imerslund O, Monn E, et al. ImerslundGrasbeck anemia: A long-term follow-up study. *Acta Paediatr Scand* 1984;73:248–253.

18. Fordyce HH, Callan MB, Giger U. Persistent cobalamin deficiency causing failure to thrive in a juvenile Beagle. *J Small Anim Pract* 2000;41:407–410.

19. Barron PM, Wouda RM. Congenital cobalamin deficiency in seven Beagle puppies. *Aust Vet Practit* 2008;38:126–132.

20. Xu D, Fyfe JC. Cubilin expression and posttranslational modification in the canine gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G748–G756.

21. Meek K, Kienker L, Dallas C, et al. SCID in Jack Russell Terriers: A new animal model of DNA-PKcs deficiency. *J Immunol* 2001;167:2142–2150.

22. Fyfe JC, Ramanujam KS, Ramaswamy K, et al. Defective brush-border expression of intrinsic factor-cobalamin receptor in canine inherited intestinal cobalamin malabsorption. *J Biol Chem* 1991;266:4489–4494.

23. Kervestin S, Jacobson A. NMD: A multifaceted response to premature translational termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:700–712.

24. Owczarek-Lipska M, Jagannathan V, Drogemuller C, et al. A frameshift mutation in the cubilin gene (CUBN) in border collies with Imerslund-Grasbeck syndrome (selective cobalamin malabsorption). *PLoS ONE* 2013;8:e61144.

25. Scott J, Weir D. Folate/vitamin B12 inter-relationships. *Essays Biochem* 1994;28:63–72.

26. Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001:2165–2193.

27. Arvanitakis C. Functional and morphological abnormalities of the small intestinal mucosa in pernicious anemia—a prospective study. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 1978;25:313–318.

Informazioni di supporto

Ulteriori informazioni di supporto sono disponibili nella versione online di questo articolo:

Tabella S1.

(a) PCR primers utilizzati per amplificare i frammenti del DNA genomico dell'AMN. (b) variazioni di sequenza eterozigote nell'AMN del Caso 2 .

Selective Intestinal Cobalamin Malabsorption with Proteinuria (Imerslund-Gräsbeck Syndrome) in Juvenile Beagles

J.C. Fyfe, S.L. Hemker, P.J. Venta, B. Stebbing, and U. Giger

Background: Selective intestinal cobalamin malabsorption with mild proteinuria (Imerslund-Gräsbeck syndrome; I-GS), is an autosomal recessive disorder of dogs caused by mutations in *AMN* or *CUBN* that disrupt cubam function and which can present as a medical emergency.

Objectives: To describe the clinical, metabolic, and genetic bases of I-GS in Beagles.

Animals: Four cobalamin-deficient and 43 clinically normal Beagles and 5 dogs of other breeds.

Methods: Clinical description and candidate gene genetic study. Urinary organic acid and protein excretion were determined by gas-chromatography and SDS-PAGE, respectively. Renal cubilin protein expression was assessed on immunoblots. Mutation discovery was carried out by PCR amplification and DNA sequencing of exons with flanking splice sites and cDNA of *CUBN* and *AMN*. Genotyping was performed by restriction enzyme digestion of PCR amplicons.

Results: Juvenile-affected Beagles exhibited failure to thrive, dyshematopoiesis with neutropenia, serum cobalamin deficiency, methylmalonic aciduria, hyperammonemia, and proteinuria. Affected dogs' kidneys lacked detectable cubilin protein. All affected dogs were homozygous for a single-base deletion in *CUBN* exon 8 (*CUBN* c.786delC), predicting a translational frameshift, and the 2 parents tested were heterozygous.

Conclusions: The *CUBN* mutation in juvenile I-GS Beagles causes a more severe cobalamin malabsorption than in Border Collies with a different *CUBN* defect, but is similar to I-GS caused by *AMN* mutations in Giant Schnauzers and Australian Shepherds. Awareness of the disorder and breed predispositions to I-GS is crucial to precisely diagnose and promptly treat hereditary cobalamin malabsorption and to prevent disease in those dogs at risk in future generations.

Key words: Cubam; Cytopenia; Inborn error of metabolism; Methylmalonic aciduria; Vitamin B₁₂.

Selective intestinal cobalamin (vitamin B₁₂) malabsorption accompanied by mid- to low-molecular weight proteinuria is an autosomal recessive trait (OMIA #000565-9615) in Giant Schnauzers,¹ Australian Shepherds,² and Border Collies.^{3–5} The syndrome is called Imerslund-Gräsbeck syndrome (I-GS; OMIM #261100), after the 2 investigators who simultaneously described it in human families of Norway and Finland.^{6,7} Intestinal malabsorption of the single nutrient coupled with failed renal tubular reabsorption of a subset of proteins filtered by the glomerulus is because of mutations that disrupt cubam function in those tissues. Cubam⁸ is a heteromeric, multi ligand, endocytic receptor composed of 2 distinct protein subunits, cubilin (*CUBN*)⁹ and amnionless (*AMN*).¹⁰ While several *AMN* and *CUBN* mutations occur in humans with I-GS,¹¹ only 2 *AMN* mutations,² and most recently, a single *CUBN* mutation,¹² have been found in 3 different affected dog breeds.

The subunit encoded by *CUBN* is a large (~460 kDa), glycosylated protein of the ileal and

Abbreviations:

AMN	amnionless
bp	base pair(s)
CUBN	cubilin
Cubam	functional receptor complex composed of AMN and CUBN subunits
DNA	deoxyribonucleic acid
I-GS	Imerslund-Gräsbeck syndrome
kb	kilobase(s)
kDa	kiloDalton(s)
MMA	methylmalonic acid
PCR	polymerase chain reaction
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
VHUP	Veterinary Hospital of the University of Pennsylvania
VSS	Veterinary Specialist Services

proximal renal tubule brush border that provides binding sites for various specific ligands, including the intrinsic factor-cobalamin complex (IF-Cbl), albumin, vitamin D-binding protein, haptoglobin, apolipoprotein A1, and others.¹³ The *CUBN* coding gene comprises 67 exons on canine chromosome 2, and the mRNA is 11.3 kb. The subunit encoded by *AMN* is an ~50 kDa glycosylated type I transmembrane protein that interacts with *CUBN* to provide membrane anchorage for the complex and endocytic signal motifs that initiate clathrin-coated pit nucleation.¹⁴ The *AMN* coding gene comprises 12 exons on canine chromosome 8, and the mRNA is 1.54 kb. Studies of human and canine tissues harboring mutations in either gene demonstrate that each subunit depends on the near-normal structure of the other for epithelial

From the Laboratory of Comparative Medical Genetics (Fyfe, Hemker) and the Department of Microbiology & Molecular Genetics, (Fyfe, Venta) College of Veterinary Medicine, Michigan State University, East Lansing, MI; the Veterinary Specialist Services, Underwood, QLD 4119, Australia (Stebbing); and the Section of Medical Genetics, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA (Giger).

Corresponding author: J.C. Fyfe, Laboratory of Comparative Medical Genetics, Biomedical & Physical Sciences, 567 Wilson Road, Rm 2209, East Lansing, MI 48824; e-mail: fyfe@msu.edu

Submitted September 19, 2013; Revised November 4, 2013; Accepted November 19, 2013.

Copyright © 2014 by the American College of Veterinary Internal Medicine

10.1111/jvim.12284

brush border expression and function of the cubam receptor complex.^{2,15}

In canine and human I-GS patients, cobalamin malabsorption can be life-threatening due to the resulting vitamin deficiency and catastrophic metabolic derangements, unless rapidly and specifically treated with parenteral cobalamin. The accompanying proteinuria is benign and persists lifelong despite treatment.^{1–5,12,16,17} Cubam expression is disrupted by distinct *AMN* mutations² in Giant Schnauzers and Australian Shepherds and by a *CUBN* mutation in Border Collies.¹² Early onset cobalamin deficiency also occurs in Beagles in the United States and Australia.^{18,19} Here, we provide clinical, biochemical, and molecular genetic evidence that this severe I-GS is caused by a *CUBN* mutation and can be effectively treated if promptly diagnosed.

Materials and Methods

Animals

Four cobalamin-deficient Beagles were studied. Clinical findings of two were previously reported.^{18,19} Those of the other two were determined from medical records of the referring clinics, the Veterinary Hospital of the University of Pennsylvania (VHUP), and Veterinary Specialist Services (VSS). All routine clinical tests reported here were performed on fresh samples at the time of original clinical investigations and by methods available to each clinic via commercial or in-hospital laboratories. In addition, dogs related to an affected dog from a large family of Beagles, gathered by Veterinary Specialist Services (VSS) in Brisbane, Australia were studied. Whole blood or tissue for DNA isolation was available from all dogs in the study, urine was available from 2 affected dogs as well as normal control Beagles. Blood was stored at 4°C in ethylenediaminetetraacetic acid for up to 2 weeks before DNA isolation. Kidney and liver of 1 affected Beagle were snap frozen during necropsy and stored at –80°C. DNA samples of unrelated clinically normal Beagles and other breed dogs were from the laboratory archives. Urinary organic acids and proteins were assessed and identified as previously described.¹² Urine was stored at –80°C for up to 1 month before study. The studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

Immunoblotting

Protein expression was assessed by CUBN immunoblotting of detergent extracted kidney cortex homogenate proteins separated on 4–20% gradient SDS-polyacrylamide gels. CUBN was detected on polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes incubated sequentially with 1:30,000 dilution of previously characterized rabbit polyclonal anti-dog CUBN serum,²⁰ goat anti-rabbit IgG-horse radish peroxidase conjugate^a (1:20,000), and chemiluminescence reagents.^b Gel loading was assessed by detection of DNA-PK protein using a previously described²¹ antibody (1:1,000; generous gift from Dr Katheryn Meek, Michigan State University). Relative quantification of western blot signals was performed with the Image Lab software of the Bio-Rad Chemi Doc XRS⁺ Molecular Imager.^c

CUBN and AMN Sequencing

Genomic DNA was prepared from whole blood or frozen tissue by standard methods.² *CUBN* exons and flanking splice-site

sequences were amplified by PCR from genomic DNA (PCR primer sequences are in Table S1 of reference 12). A portion of *CUBN* cDNA was amplified by RT-PCR from kidney total RNA as previously described² using oligo-dT priming of the RT reaction and PCR primers 5'-GCCCTCTGTGCTCAGTTGATG T-3' (*CUBN* c.482–503, exon 6) and 5'-GTGGCAGCCTCCATT ATTGACT-3' (*CUBN* c.1053–1074, exon 9). Exons and flanking splice-site sequences of *AMN* were amplified similarly from genomic DNA (PCR primer sequences in Table S1). Amplicons were sequenced using the amplifying primers and assembled for comparison to the CanFam 3.1 canine reference genome assembly and *AMN* and *CUBN* cDNA sequences (GenBank accession nos. AY368152.1 and AF137068.1, respectively). New *AMN* genomic sequences generated in this study have been deposited in GenBank (accession no. KF445236) because *AMN* exons 1, 2, and 4–9 are missing from the canine reference sequence due to two large gaps in the assembly and areas of poor sequence quality. *AMN* maps to CanFam 3.1 coordinates Chr8:70,798,913–70,807,835.

CUBN Mutation Genotyping

The *CUBN* exon 8 mutation site was amplified from genomic DNA using the primers 5'-AGGGTTTTCCAGTCACGACGC TTTCTTGCTCATTTCGTGAT-3' and 5'-GCATGCTGGAG ATTGCACAC-3', creating a 170 bp amplicon. The underlined nucleotide in bold font of the second primer introduces a sequence change in the amplicon that creates an *Msl I* restriction enzyme recognition site (CAYNNNNRTG) in the normal allele that is not in the native sequence and which is lost in the mutant allele. The first 20 bases of the forward primer do not match the dog sequence but are included to increase the resolution of the diagnostic bands. Amplification products were digested with *Msl I*, and fragments were separated on 4% agarose gels.

Results

Clinical Presentations

Case 1. An intact female Beagle was presented to a primary care clinic at 4 months of age with a history of inappetence for 1 month and lethargy for a few days. The puppy was thin (body condition score [BCS] 3/9) and was found to have ancylostomiasis, coccidiosis, demodexosis, and dermatophytosis. Despite routine antiparasite treatments over the next month, the puppy continued to have a poor appetite, developed intermittent diarrhea and focal alopecia, and became thinner (BCS 2.5/9). Diagnostic tests at 5 months of age revealed a normocytic-normochromic and regenerative anemia (Hct 27% [normal reference range 35–58]; MCV 63 fL [62–77], MCHC 35 g/dL [30–35]; reticulocytes 85,600/μL [<60,000]) with normal leukogram (WBC 8,100/μL [5,300–19,000]; neutrophils 5,022/μL [3,100–14,400]). There was hypoproteinemia (albumin 2.6 g/dL [2.5–3.7], globulin 1.7 g/dL [2.4–4.0]). Serum electrolyte concentrations and an ACTH-stimulation test were normal. There was nonmeasurable cobalamin in serum, slightly increased folate concentrations (11.5 μg/L [4.8–8.6]), and normal trypsin-like immunoreactivity (17 μg/L [5–35]). A diagnosis of intestinal disease caused by bacterial overgrowth was made, and the puppy was treated with daily oral tylosin and 1 subcutaneous injection of 0.5 mg cyanocobalamin.

At 7 months of age, the dog presented with recent vomiting, continued intermittent diarrhea, lethargy, and inappetence. Because of the continued hypoproteinemia, a protein-losing enteropathy with possible liver disease was considered. She received fluids IV and antiemetic treatment and was discharged the next day after eating and seeming to be clinically improving.

At 9 months of age, she was examined twice within 3 days by the primary care veterinarians for recurrence of vomiting and diarrhea, worsening of her clinical signs (lethargy, inappetence, weakness), and continued poor body condition (4.5 kg). Routine laboratory tests showed anemia (Hct 33%), leukopenia (WBC 520/ μ L; neutrophils 310/ μ L), thrombocytopenia (114,000/ μ L [177,000–398,000]), and hypoproteinemia (albumin 1.7 g/dL, globulin 1.9 g/dL). She received supportive care including fluids administered IV, antiemetics, sucralfate, and antibiotics, and was transferred to VHUP the following day.

On presentation, the dog was lethargic, hardly responsive, dehydrated, hypothermic (97.9°F), and thin. She vomited blood and had hematochezia. Repeat testing confirmed normochromic-normocytic anemia, leukopenia, and thrombocytopenia. Peripheral blood smears revealed nuclear hypersegmentation of neutrophils and some metarubricytes. Additionally, there was hyperglycemia (202 mg/dL [60–110]), hypokalemia (2.4 mmol/L [2.5–5.5]); hypoproteinemia (albumin 1.6 g/dL, globulin 1.5 g/dL), hypocalcemia (4.4 mg/dL [9.8–11.7]), hypomagnesemia (1.2 mg/dL [1.6–2.5]) hypocholesterolemia (88 mg/dL [128–317]), and hyperammonemia (175 μ mol/L [11–35]). Urine methylmalonic acid (MMA) concentration was 5,830 mmol/mmol creatinine (normal <4). Despite intensive care including supplementation of cobalamin, calcium, and magnesium, the dog developed aspiration pneumonia and died of cardiopulmonary arrest within a day. Tissue samples were immediately frozen for subsequent molecular analysis. Necropsy demonstrated hypocellular bone marrow with hemosiderosis, severe necrotizing enteropathy, and moderate regionally extensive acute interstitial bacterial pneumonia.

Case 2. A juvenile male Beagle with signs of cobalamin deficiency was investigated at VHUP. It had similar presentation and clinical course to case 1 but was successfully treated. Clinical details were published previously.¹⁸ Aggressive parenteral cyanocobalamin administration led to complete clinical and laboratory normalization within 5 days and return to normal weight for age within 3 months. With lifelong treatment (~50 μ g cyanocobalamin/kg body weight, SC, q3–4 weeks), the dog lived for 9 years without recurring signs except for persistent proteinuria (1+ to 2+ on a dipstick). Blood and urine were obtained for molecular analysis. Urine protein-creatinine ratio was 0.3 [<0.4], but SDS-PAGE of concentrated urine proteins demonstrated selective excretion of discrete medium- to low-molecular weight proteins identified as albumin, vitamin D-binding protein, haptoglobin, and apolipoprotein A-I, each of which is a cubilin ligand (Fig 1, lane 1). This pattern of protein excretion was

not observed in urine of a normal Beagle (lane 2) or healthy dogs of other breeds.¹²

Cases 3 and 4. A male Beagle was presented at 4.5 months of age for poor appetite and failure to gain weight in the prior 2 months. Diagnostic tests revealed nonregenerative, normochromic-normocytic anemia (Hct 30%; MCV 67 fL; MCHC 34 g/dL; reticulocytes 32,000/ μ L with normal leukogram). There was hypoproteinemia (albumin 2.5 g/dL, globulin 1.7 g/dL). Total T4 (22 nmol/L), pancreatic lipase (138 μ g/L), and serum bile acids before and after a meal (3 and 3 μ mol/L, respectively) were normal. No specific therapy was instituted. One month later, the puppy still had no weight gain and remained anemic, but 5 nucleated RBCs/100 WBC [<2 NRBC is normal] and neutropenia (2,500/ μ L) were noted in the CBC. Prior awareness of cases in Beagles¹⁹ in the local area made cobalamin deficiency the primary diagnostic rule-out. Cyanocobalamin injections (50 μ g/kg body weight, SC, every 2 weeks) corrected all clinical signs and hematologic abnormalities. The dog's appetite returned to normal in a day, and its weight normalized in a month. Case 3 shared close ancestry with a female Beagle that was failing to thrive from 7 months of age (Case 4) and which was identified as case 1 in the case series of congenital cobalamin deficiency in Beagles from Brisbane.¹⁹ Case 4 responded completely to parenteral cobalamin administration and remains in remission with once to twice monthly cyanocobalamin injections (50 μ g/kg body weight, SC) since diagnosis 7 years previously. Blood was collected for genetic analysis from both case 3 and 4 affected dogs, 2 of their parents, and 3 other clinically normal members of the kindred.

CUBN Protein Expression

Selective proteinuria in case 2 comprising cubilin ligands as demonstrated in this study suggested failed

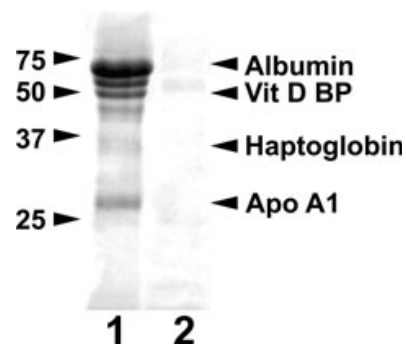


Fig 1. Selective proteinuria in a Beagle with I-GS. Shown are lanes from a silver-stained 15% SDS-PAGE gel loaded with urine proteins of an affected (case 2; lane 1) and a clinically normal Beagle (lane 2). Proteins in each lane were concentrated from urine samples containing 50 μ g of creatinine. The affected dog was in clinical and metabolic remission at the time of urine collection because of previous parenteral cyanocobalamin administration. Migration of molecular weight (kDa) markers is indicated to the left.

cubilin expression in proximal tubular cells. Therefore, on the assumption that the Beagles in each case exhibited the same molecular defect, we generated immunoblots of kidney cortex proteins from case 1 and from 2 normal control dogs (Fig 2). Cubilin expression was undetectable in tissue of the affected dog (lane 1) even though the amount of total protein loaded in that lane was 2.5-fold more than in the control lanes, where cubilin was readily apparent (lanes 2 and 3). Expression of the control protein, DNA-PK was evident in affected and control dog's kidneys in amounts that correlated with the different amounts of protein loaded.

AMN and CUBN Sequences and Mutation Discovery

We amplified the 12 *AMN* exons with flanking splice sites and 2.32 kb of intron sequence from case 2 genomic DNA. There were no exonic or splice sequence variants, but we noted heterozygosity at several intronic sites across the locus (Table S1). The 67 *CUBN* exons with flanking splice sites and 20,488 bp of intronic sequence were amplified from case 1 genomic DNA. There were no sequence variations in splice sites and no heterozygous sites. The only sequence variation likely to affect protein coding was a homozygous deletion of a single cytosine in exon 8 (*CUBN* c.786delC; Fig 3A). The same mutation was found in cDNA of case 1 by sequencing RT-PCR products and in genomic DNA of case 2. The single-base deletion predicts a shift in the translation reading frame and a premature stop codon 45 codons after the deletion (p.C264Sfs*45).

CUBN Mutation Genotyping

The exon 8 deletion was not observed in DNA of 5 normal Beagles by sequencing the mutation site. For larger studies, we designed a convenient allele-specific genotyping assay for the deletion based on PCR amplification of genomic DNA followed by restriction enzyme digestion of the 170 bp amplicon. The reverse primer introduced a change in the amplicon sequence

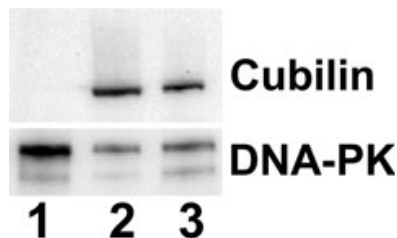


Fig 2. Lack of cubilin protein in kidney of a Beagle with I-GS. Detergent-solubilized protein of kidney cortex homogenates of an affected (case 1; lane 1, 50 μ g protein) and 2 clinically normal control dogs (lanes 2 and 3, 20 μ g protein each) were separated by nonreducing, 4–20% gradient SDS-PAGE and blotted. In the upper panel, the blot was developed by incubation with rabbit antidog cubilin serum. In the lower panel, the blot was developed by incubation with a mouse monoclonal anti-human DNA-PK antibody as a control for loading and protein integrity.

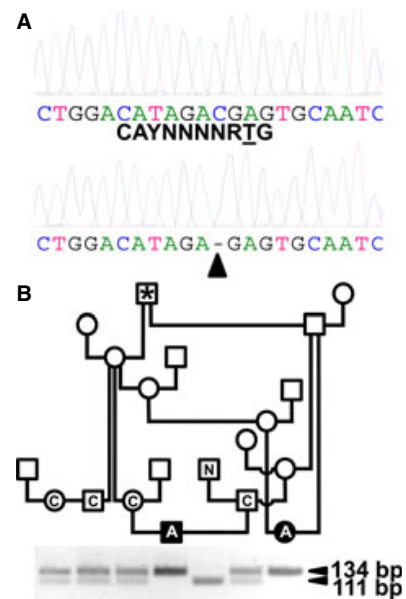


Fig 3. *CUBN* exon 8 cytosine deletion and genotyping assay in Beagles. Panel A shows electrophoretograms of sequence from the Beagle I-GS mutation site of a normal (top) and an affected dog (case 1; bottom). The single cytosine deletion (*CUBN* c.786delC) is indicated by an arrowhead. Panel B shows results of an allele-specific, *Msl I* restriction digest of PCR products amplified from genomic DNA. The sequence of the *Msl I* recognition site is indicated in black below the normal sequence in panel A. The underlined T of the recognition site is introduced to the amplicon sequence by the reverse PCR primer. The 170 bp PCR product amplified from normal dog genomic DNA has two *Msl I* restriction sites, but the Beagle I-GS deletion obliterates one site. Thus, the diagnostic fragment length from the normal allele is 111 bp, while that of the deleted allele is 134 bp. The control cut fragment of 36 bp is not shown. Lanes of a genotyping gel (4% agarose) are aligned beneath symbols for Beagles of the Australian kindred that were tested. Affected dogs are indicated by filled symbols and clinically normal dogs by open symbols; squares are males and circles are females. The affected female at the lower right was case 4 (case 1 in reference 19), and the affected male was case 3 of this report. The asterisk indicates an ancestor that was common to each of the parents of affected offspring available for testing. The letter in each symbol indicates the genotype determined by testing: affected (A), carrier (C), and normal (N).

that created an *Msl I* cleavage site when amplified from the normal but not from the mutant allele. Therefore, the normal allele resulted in digestion products of 111 and 23 bp, whereas the deletion allele resulted in a product of 134 bp. Digested DNA amplified from either allele both demonstrated an additional 36 bp product because of a designed “control cut” to indicate adequate function of the restriction enzyme with each sample. To validate the assay, we tested the previously sequenced samples from 2 affected and 5 normal dogs and found no discordance.

The restriction digest assay was applied to samples from cases 3 and 4 and related dogs that originated in Australia (Fig 3B) as well as to unrelated normal dogs. While the two affected dogs of the available kindred

were homozygous for the mutant allele, 2 parents of affected dogs and 3 other clinically normal dogs of the kindred were heterozygous. Three others in the kindred were homozygous for the normal allele. The deleted allele was not observed in any of 40 clinically normal Beagles from North America, nor was the Beagle mutation observed in I-GS affected dogs of 4 other breeds and a mongrel.

Discussion

We describe here the clinicopathologic features, biochemical abnormalities, and the molecular genetic basis of selective cobalamin malabsorption with proteinuria (I-GS) in 4 juvenile Beagles. The identical *CUBN* mutation caused I-GS in each of these cases appearing over a period of 15 years on 2 continents. Clinical signs of cobalamin deficiency in Beagles with inherited cobalamin malabsorption manifest in the juvenile period as fetal stores of the vitamin wane.^{18,19} This is somewhat different from I-GS in Border Collies caused by a different *CUBN* mutation, wherein onset of signs is often delayed into early adulthood and clinical signs in some cases are milder.^{1–5,12} Consistent signs in Beagles, but also in Giant Schnauzers and Australian Shepherds with I-GS caused by *AMN* mutations (Fig 4), include inappetence and failure to thrive often observed from 8 to 12 weeks of age; dyshematopoiesis characterized by anemia, neutropenia with nuclear hypersegmentation, metarubricytosis, and megaloblastic changes in bone marrow; megaloblastic changes of the intestinal epithelium; and metabolic disruptions characterized by methylmalonic acidemia/uria and hyperhomocysteinemia caused by inhibition of cobalamin-dependent enzymes. Variable signs of secondary metabolic disruptions include hyperammonemia, hypoglycemia, ketoacidosis,

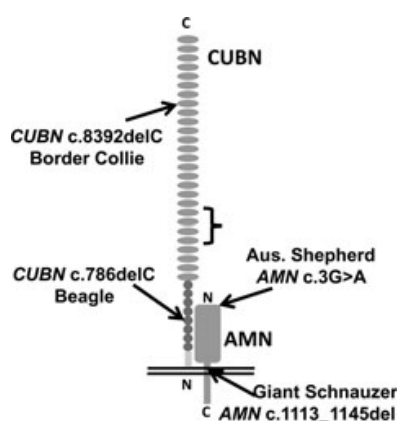


Fig 4. Cubam structure showing sites of I-GS causing mutations in dogs. The cartoon illustrates the protein domain structure of cubam composed of CUBN and AMN subunits. The N and C termini of each protein are indicated. The bracket around CUBN domains 5–8 indicates the intrinsic factor–cobalamin binding site. The epithelial cell apical plasma membrane is indicated by double horizontal lines, and the extracellular side is to the top. Each site of breed-specific mutation causing canine I-GS is indicated by an arrow.

and hypoproteinemia. If diagnosis and treatment are delayed, affected dogs exhibit a chronic course of inappetence, lethargy, failure to gain weight and muscle mass, intermittent vomiting and diarrhea, seizures, and/or a lethal metabolic crisis. It is tragic when failure to diagnose the disorder results in morbidity or death because parenteral cyanocobalamin administration (~1 mg/dog/month) initiated early provides rapid and sustained hematopoietic and metabolic remission leading to a normal healthy lifespan.

In case 1, an initial presumptive diagnosis of “bacterial overgrowth” obscured the significance of cobalamin deficiency. By the time of transfer to a tertiary veterinary care facility at 9 months of age, the dog had signs and laboratory findings indicative of severe metabolic decompensation and died despite symptomatic emergency intervention. Case 2 had a clinical course and signs¹⁸ as severe as case 1, but the important difference affecting a positive outcome was the clinical suspicion of an inborn error of metabolism leading to timely diagnosis and specific treatment maintained for life. Case 3 of this report and the seven Beagles of unknown relationship seen in the Brisbane area from 2006 to 2008¹⁹ presented with similar signs and course of disease, but benefited from the clinician’s prior experience that heightened the diagnostic likelihood of cobalamin deficiency. Each dog had a robust clinical and laboratory response to parenteral cyanocobalamin administration. Proteinuria was not documented in those cases, but the selective proteinuria of I-GS in dogs is not quantitatively different from what is observed in many ill and some healthy dogs (1+ to 2+ protein on a dipstick). The specific proteinuria of canine or human I-GS is indicative of failed cubam function in renal tubules, and therefore persists despite cobalamin replenishment.^{1,12,15}

Presumptive cobalamin malabsorption coupled with demonstrated urinary loss of cubilin ligands indicates a functional defect of cubam in intestine and kidney. Cases of early onset cobalamin deficiency in geographically dispersed Beagles (Australia and United States) constitute a breed predisposition that is highly suggestive of an inherited disorder. Homozygosity by descent of a disease-causing mutation is a prerequisite of recessive inheritance, as has been documented for I-GS in the other canine breeds.^{1,2,12} Moreover, because the undiagnosed and untreated disease is so devastating in Beagles, it is unlikely that affected dogs were used in matings that produced the affected offspring. Findings in this study wherein affected dogs are homozygous for the deleted allele and parents of affected dogs are heterozygous are consistent with the hypothesis of autosomal recessive inheritance of Beagle I-GS.

Case 2 was heterozygous at sites across the *AMN* genomic locus (Table S1b), findings incompatible with simple recessive inheritance of I-GS, and exhibited no putative *AMN* mutation. Moreover, prior studies^{1,2,20,22} demonstrated that tissues from I-GS dogs harboring *AMN* mutations continue to express readily detectable cubilin protein on immunoblots despite the fact that it does not reach the epithelial brush border

and provide cubam function. This understanding coupled with undetectable cubilin on western blots of kidney cortex from case 1, made *CUBN* the most likely candidate gene. Accordingly, we found a single base deletion in exon 8 of *CUBN* that was homozygous in affected Beagles. This frameshift mutation predicts an early translation termination codon in the *CUBN* mRNA that almost assuredly activates the intracellular mechanisms of nonsense-mediated mRNA decay,²³ rather than allowing production of a truncated and/or nonfunctional protein. Border Collies with I-GS also have a single cytosine deletion, but it is in exon 53 of *CUBN* and much further 3' in the mRNA. Ten- to 20-fold reduced steady-state mRNA and a small amount of residual expression of full-length cubilin protein that retains IF-Cbl binding activity were demonstrated in the ileum and kidney of affected Border Collies.¹² Residual cubilin expression, which we do not see in the affected Beagle, might explain why diagnosis in some Border Collies is much delayed compared to Beagles and the other breeds where cubam expression is abrogated entirely.²

Though the deletion allele was not observed in 40 unrelated normal Beagles from the United States, this number is not sufficient to reliably estimate an allele frequency in the breed. This contrasts with the I-GS mutation (c.8392delC) that has an estimated 0.06 allele frequency in Canadian and US Border Collies¹² and nearly the same allele frequency in border collies of the continental EU.²⁴ The increased *CUBN* mutation frequency in Border Collies could be because of the seemingly later age of diagnosis of I-GS in that breed (8–48 months), the more varied and less severe signs, and the possibility that mildly affected dogs might have been used for breeding. For instance, we recently diagnosed I-GS in a nearly 4-year-old Border Collie whose signs were intermittent pyrexia and chronic neutropenia. The earlier median age (4 months) of presentation of severe disease in Beagles is more similar to that of Giant Schnauzers and Australian Shepherds with *AMN* mutations.^{1,2}

5'-adenosyl- and methyl- forms of cobalamin are essential cofactors for 2 essential enzymes of intermediate metabolism, L-methylmalonyl-CoA mutase and 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (aka methionine synthase), respectively. Suppression of substrate flux through catabolic pathways mediated by these enzymes due to cobalamin cofactor deficiency directly causes increased methylmalonic acid (MMA) and homocysteine concentrations in plasma and methylmalonic acid in urine. Inhibition of methionine synthase activity also traps tetrahydrofolate in the 5-methyl form, creating cellular deficiency of 5, 10- methylene tetrahydrofolate required for a one-carbon transfer reaction by thymidylate synthase to support DNA synthesis.²⁵ Thus, cobalamin deficiency slows nuclear maturation in rapidly proliferating hematopoietic and intestinal epithelial cells creating the recognized megaloblastic changes in these tissues. Moreover, increased concentrations of mitochondrial pools of acyl-CoA esters secondarily

inhibit additional metabolic pathways including the urea cycle, gluconeogenesis, and glycine cleavage leading to hyperammonemia, hypoglycemia, and hyperglycinemia.²⁶ Therefore, the signs of chronic cobalamin deficiency are global, because of disruption of several metabolic pathways, and could be confused with hepatoencephalopathy, perhaps due to portocaval shunt, or other disorders.

In the young Beagle with cobalamin deficiency, inappetence, lack of appropriate weight gain, and failure to thrive are predominating client complaints. None of these signs is specific, so a high index of suspicion based on breed predisposition and age-of-onset is needed for efficient diagnosis of hereditary cobalamin malabsorption. Neutropenia with hypersegmentation and metarubricytosis are peripheral signs of megaloblastosis and classic hematologic features of cobalamin deficiency that are observed in these cases. However, cobalamin-deficient dogs do not exhibit the erythrocyte macrocytosis that is common in human cobalamin deficiency, an observation that remains unexplained.¹ Determinations of low serum cobalamin or high urinary MMA concentrations are confirmatory. Acquired cobalamin malabsorption can be present in young dogs accompanying such conditions as gastrointestinal dysbiosis, surgical resection of distal small intestine or exocrine pancreatic insufficiency. Chronic cobalamin deficiency of whatever cause can create secondary generalized gastrointestinal malabsorption because of megaloblastic changes of the intestinal epithelium.²⁷ Therefore, some cases of chronic diarrhea are not effectively treated until body cobalamin stores have been replenished.

I-GS is one of few inborn errors of metabolism that can be treated readily and inexpensively. Parenteral administration of cyanocobalamin has a wide margin of safety, even in megadoses of several mg because any of the water-soluble vitamin B₁₂ that does not bind immediately to the plasma carrier, transcobalamin (TC), is rapidly excreted by glomerular filtration. Therefore, following sample collection for definitive diagnosis, early therapeutic intervention based upon clinical suspicion may save a patient's life. Determination of post-treatment serum cobalamin concentrations can be misleading, however, because cobalamin leaves the plasma space by receptor-mediated endocytosis of the TC-cobalamin complex and subsequently binds as cofactor to the mutase and methionine synthase enzymes, both of which have long half-lives. When cobalamin malabsorption is a lifelong condition, as in I-GS or ileal resection, and after cobalamin deficits have been replenished, a simple regimen of 1 mg cyanocobalamin administered SC every 3–4 weeks is sufficient for normal health, growth, reproduction, and activity, even in a mid- to large-sized dog. This report should raise the clinicians' awareness of I-GS and the clinical presentation. While low serum cobalamin concentration, methylmalonic aciduria, and response to treatment are suggestive, breed-specific *AMN* and *CUBN* mutation tests allow for precise I-GS diagnosis. Genetic tests also allow diagnosis before the develop-

ment of clinical signs and detection of asymptomatic carriers to guide breeding decisions.

Footnotes

^a cat. # 141506, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc, Gaithersburg, MD

^b Western Lightning ECL Plus, PerkinElmer, Inc, Waltham, MA

^c Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA

Acknowledgments

The authors acknowledge the diagnostic evaluation and management by the staff at the Veterinary Hospital of the University of Pennsylvania and at clinics in the Brisbane, Australia, area referring to Veterinary Specialist Services.

Grant Support: This work was supported in part by NIH grant OD010939 and revenues of the MSU Laboratory of Comparative Medical Genetics.

Conflict of Interest Declaration: The authors disclose no conflict of interest.

References

1. Fyfe JC, Giger U, Hall CA, et al. Inherited selective intestinal cobalamin malabsorption and cobalamin deficiency in dogs. *Pediatr Res* 1991;29:24–31.
2. He Q, Madsen M, Kilkenney A, et al. Amnionless function is required for CUBN brush-border expression and intrinsic factor-cobalamin (vitamin B₁₂) absorption in vivo. *Blood* 2005;106:1447–1453.
3. Morgan LW, McConnell J. Cobalamin deficiency associated with erythroblastic anemia and methylmalonic aciduria in a Border Collie. *J Am Anim Hosp Assoc* 1999;35:392–395.
4. Battersby IA, Giger U, Hall EJ. Hyperammonaemic encephalopathy secondary to selective cobalamin deficiency in a juvenile Border Collie. *J Small Anim Pract* 2005;46:339–344.
5. Lutz S, Sewell AC, Reusch CE, Kook PH. Clinical and laboratory findings in Border Collies with presumed hereditary juvenile cobalamin deficiency. *J Am Anim Hosp Assoc* 2013;49:197–203.
6. Imerslund O. Idiopathic chronic megaloblastic anemia in children. *Acta Paediatr Scand* 1960;49(Suppl. 119):1–115.
7. Gräsbeck R, Gordin R, Kantero I, Kuhlback B. Selective vitamin B₁₂ malabsorption and proteinuria in young people. *Acta Med Scand* 1960;167:289–296.
8. Fyfe JC, Madsen M, Højrup P, et al. The functional cobalamin (vitamin B₁₂)-intrinsic factor receptor is a novel complex of CUBN and amnionless. *Blood* 2004;103:1573–1579.
9. Aminoff M, Carter JE, Chadwick RB, et al. Mutations in *CUBN*, encoding the intrinsic factor-vitamin B₁₂ receptor, CUBN, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. *Nat Genet* 1999;21:309–313.
10. Tanner SM, Aminoff M, Wright FA, et al. Amnionless, essential for mouse gastrulation, is mutated in recessive hereditary megaloblastic anemia. *Nat Genet* 2003;33:426–429.
11. Tanner SM, Sturm AC, Baack EC, et al. Inherited cobalamin malabsorption. Mutations in three genes reveal functional and ethnic patterns. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:56.
12. Fyfe JC, Hemker SL, Venta PJ, et al. An exon 53 frameshift mutation in *CUBN* abrogates cubam function and causes Imerslund-Gräsbeck syndrome in dogs. *Mol Genet Metab* 2013;109:390–396.
13. Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CBF, et al. Vitamin B₁₂ transport from food to the body's cells - a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:345–354.
14. Pedersen GA, Chakraborty S, Steinhäuser AL, et al. AMN directs endocytosis of the intrinsic factor-vitamin B₁₂ receptor cubam by engaging ARH or Dab2. *Traffic* 2010;11:706–720.
15. Storm T, Emma F, Verroust PJ, et al. A patient with CUBN deficiency. *N Engl J Med* 2011;364:89–91.
16. Wahlstedt-Fröberg V, Pettersson T, Aminoff M, et al. Proteinuria in CUBN-deficient patients with selective vitamin B₁₂ malabsorption. *Pediatr Nephrol* 2003;18:417–421.
17. Broch H, Imerslund O, Monn E, et al. Imerslund-Gräsbeck anemia: A long-term follow-up study. *Acta Paediatr Scand* 1984;73:248–253.
18. Fordyce HH, Callan MB, Giger U. Persistent cobalamin deficiency causing failure to thrive in a juvenile Beagle. *J Small Anim Pract* 2000;41:407–410.
19. Barron PM, Wouda RM. Congenital cobalamin deficiency in seven Beagle puppies. *Aust Vet Pract* 2008;38:126–132.
20. Xu D, Fyfe JC. Cubilin expression and posttranslational modification in the canine gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G748–G756.
21. Meek K, Kienker L, Dallas C, et al. SCID in Jack Russell Terriers: A new animal model of DNA-PKcs deficiency. *J Immunol* 2001;167:2142–2150.
22. Fyfe JC, Ramanujam KS, Ramaswamy K, et al. Defective brush-border expression of intrinsic factor-cobalamin receptor in canine inherited intestinal cobalamin malabsorption. *J Biol Chem* 1991;266:4489–4494.
23. Kervestin S, Jacobson A. NMD: A multifaceted response to premature translational termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:700–712.
24. Owczarek-Lipska M, Jagannathan V, Drögemüller C, et al. A frameshift mutation in the cubilin gene (*CUBN*) in border collies with Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective cobalamin malabsorption). *PLoS ONE* 2013;8:e61144.
25. Scott J, Weir D. Folate/vitamin B₁₂ inter-relationships. *Essays Biochem* 1994;28:63–72.
26. Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001:2165–2193.
27. Arvanitakis C. Functional and morphological abnormalities of the small intestinal mucosa in pernicious anemia—a prospective study. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 1978;25:313–318.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. (a) PCR primers used to amplify fragments of AMN genomic DNA. (b) Heterozygous sequence variations in case 2 *AMN*.