

Diss. ETH No. 14500

**L-gulono-gamma-lactone oxidase (GULO) in normal and  
vitamin C-deficient pigs: cloning, chromosomal mapping of  
the gene and expression and activity studies**

A dissertation submitted to the  
Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich  
for the degree of Doctor of Natural Science

presented by

**Lara Sophia Hasan**

M. Sc. in Biochemistry

Montpellier Institute of Sciences and Technology

born 25<sup>th</sup> of June 1971

citizen of France

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Dr. h.c. G. Stranzinger, examiner

Prof. Dr. P. Vögeli, co-examiner

Prof. Dr. C. Wenk, co-examiner

Zürich, 2002

## SUMMARY

Most phylogenetically higher mammals, except primates (including humans) and guinea pigs, can synthesize vitamin C. Normally pigs produce sufficient amounts of vitamin C to maintain their vital functions. Some years ago however, a genetic mutant family of Danish Landrace pigs lacking the ability to produce ascorbic acid (AA) was discovered and clinical cases with scurvy were described in swine for the first time. This is the only farm animal model for vitamin C deficiency. Vitamin C deficient pigs, when fed a diet lacking AA, manifest unthriftiness, unwillingness to move, swelling around joints, signs of pain when touched, multiple fractures, and haemorrhagic tendencies. This trait was shown to be controlled by a single autosomal recessive allele designated as *od* (osteogenic disorder). The inability of AA biosynthesis in scurvy-prone animals that exhibit similar symptoms, when not supplemented with AA in the food, was traced to the lack of L-gulono-gamma-lactone oxidase (GULO). GULO catalyzes the terminal step in the biosynthesis of AA. The nonfunctional human *GULO* pseudogene (*GULOP*) was mapped to chromosome 8p21 that corresponds to an evolutionarily conserved segment on either porcine chromosome 4 (SSC4) or 14 (SSC14).

In the first part of this project we investigated linkage between *OD* and SSC4- and SSC14-specific microsatellite loci. The results showed that *OD* locus maps to the subcentromeric region of SSC14. We amplified a pig-specific *GULO* cDNA fragment and used it as a probe to isolate *GULO* clones from a porcine cosmid genomic library. *GULO* was then physically mapped to the same region as *OD* by hybridization of porcine metaphase chromosomes with labeled *GULO* cosmids. Thus, the porcine *GULO* gene is both a good physiological and positional candidate gene for vitamin C deficiency in pigs. No GULO activity was detected in vitamin C-deficient *od/od* pigs. However GULO was active in normal *OD/OD* and heterozygous *OD/od* pigs. Therefore, we analyzed the molecular structure of *GULO* gene. In addition, the comparative gene mapping approach was used. *GULO* cDNA clones were isolated from a porcine liver cDNA library. To identify mutations affecting GULO activity, we sequenced cDNAs (prepared from mRNAs) of *od/od* pigs. Sequence analysis of *od/od* *GULO* cDNA showed that exon VIII (numbering according to rat gene) was missing. This deletion modified the putative open reading frame leading to a premature stop codon. A

ribonuclease protection assay (RPA) with an antisense RNA probe spanning from exon VI to exon IX showed that *od/od* mRNA did not have exon VIII, that the length of *OD/OD* mRNA was normal, and that the *OD/od* mRNA contained both variants. Sequence analysis of the genomic DNA in *od/od* pigs demonstrated a large deletion (about 4.2 kbp) including part of intron 7, the complete exon VIII and part of intron 8. In order to differentiate between the three *OD*-genotypes in pigs, we developed a DNA-based test for the diagnosis of the abnormal allele. We hypothesized that the deletion of exon VIII and the premature termination of the mutated peptide were the cause of the enzyme inactivation and of the consequent AA deficiency. In addition, it was shown using Northern blot and RPA analyses that the amount of *GULO* mRNA transcripts was lower in deficient pigs than in phenotypically normal pigs.

The second part of the study illustrated the importance of the pig animal model for vitamin C deficiency with regard to the *in vivo* effects of AA supplementation. The effect of exogenous AA on its own biosynthesis regulation was studied at the level of *GULO* enzyme activity and *GULO* mRNA transcription efficiency or mRNA stability by RPA. Dietary AA intake (1500 mg/kg feed) in normal pigs for 28 days decreased *GULO* activity by about 50% without any influence on its transcriptional level. Furthermore, the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) in normal and deficient pigs was not changed by supplemental AA intake. Therefore SOD probably exerts no protective effect on the oxidative status in AA-depleted and *GULO*-deficient pigs.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die meisten phylogenetisch höheren Säuger, ausser Primaten (einschliesslich Mensch) und Meerschweinchen synthetisieren Vitamin C. Normalerweise produzieren Schweine genügend Vitamin C, um ihre Lebensfunktionen aufrechtzuerhalten. Vor einigen Jahren jedoch wurde eine genetisch mutierte Familie der dänischen Landrasse entdeckt, welche keine Ascorbinsäure (AA) produzieren konnte, und klinische Fälle mit Skorbut wurden zum ersten Mal beim Schwein beschrieben. Dies ist das einzige Nutztiermodell für Vitamin C-Mangel. Vitamin C-Defizienz bei Schweinen, die keine AA-Zulage im Futter erhalten, äussert sich in geringem Wachstum, Einschränkung der Bewegung, Schwellungen im Bereich der Gelenke, Anzeichen von Schmerz bei Berührung, multiplen Frakturen und hämorrhagischen Tendenzen. Die Störung wird durch ein einzelnes autosomal rezessives Allel kontrolliert und wird mit *od* (*osteogenic disorder*) bezeichnet. Ursache des Versagens der AA-Biosynthese in Skorbut-anfälligen Tieren mit ähnlichen Symptomen ist das Fehlen des Enzyms L-Gulon-Gamma-Lakton Oxidase (GULO). GULO katalysiert den letzten Schritt der AA-Biosynthese. Das nicht funktionelle *GULO* Pseudogen (*GULOP*) beim Menschen wurde Chromosomenregion 8p21 zugewiesen, die einem evolutionär konservierten Segment entweder auf Schweinechromosom 4 (SSC4) oder 14 (SSC14) entspricht.

Im ersten Teil der Dissertation untersuchten wir die Kopplung zwischen *OD* und SSC4- und SSC14-spezifischen Mikrosatellitenloci. Wir konnten so den *OD*-Locus in die subcentromere Region von SSC14 kartieren. Wir amplifizierten ein Schweine-spezifisches *GULO* cDNA-Fragment, das benützt wurde, um *GULO*-Klone von einer porcinen genomischen Cosmid-Bibliothek zu isolieren. *GULO* wurde dann physisch in die gleiche Region wie *OD* durch Hybridisierung des markierten *GULO*-Cosmids an porcine Metaphase-Chromosomen kartiert. Daher ist das porcine *GULO*-Gen ein gutes physiologisches und positionelles Kandidatengen für Vitamin C-Defizienz beim Schwein. Keine *GULO*-Aktivität wurde in Vitamin C-defizienten *od/od*-Schweinen festgestellt. Jedoch ist *GULO* aktiv in normalen *OD/OD*- und heterozygoten *OD/od*-Schweinen. Daher untersuchten wir die molekulare Struktur des *GULO*-Gens. Dazu benützten wir den Ansatz der vergleichenden Genkartierung. *GULO* cDNA-Klone wurden von einer porcinen Leber-cDNA-Bibliothek isoliert. Um die Mutation zu

identifizieren, die die GULO-Aktivität entscheidend beeinflusst, sequenzierten wir cDNA (hergestellt aus mRNA) von *od/od*-Schweinen. Die Sequenzanalyse von *od/od GULO* cDNA zeigte, dass Exon VIII (nach der Nummerierung bei der Ratte) fehlte. Diese Deletion führte zu einem geschrumpften offenen Leseraster und zu einem vorzeitigen Stoppcodon. Der *ribonuclease protection assay* (RPA) mit einer RNA-Probe, die den Abschnitt Exon VI bis Exon IX umfasste, zeigte, dass *od/od*-mRNA kein Exon VIII hatte, *OD/OD* mRNA normale Länge erreichte, und *OD/od* mRNA beide Varianten enthielt. Die Sequenzanalyse der genomischen DNA von *od/od*-Schweinen zeigte eine grosse Deletion (etwa 4.2 kbp), die aus einem Teil von Intron 7, dem ganzen Exon VIII und einem Teil von Intron 8 zusammengesetzt war. Um zu unterscheiden die drei *OD*-Genotypen beim Schwein, entwickelten wir einen DNA-gestützten Test für die Diagnose des abnormalen Allels. Aus diesen Ergebnissen schliessen wir, dass die Deletion von Exon VIII und damit die Verkürzung des GULO-Peptids der Grund für die Enzyminaktivierung und daher auch für die AA-Defizienz ist. Des weiteren zeigte die Bestimmung der Genexpressionsniveaus von *GULO* (Northern Analyse und RPA), dass die Menge der Transkripte in defizienten Schweinen tiefer war als in phänotypisch normalen.

Der zweite Teil der Studie veranschaulicht die Bedeutung des porcinen Tiermodells für Vitamin C-Defizienz bezüglich *in vivo* Effekten der AA-Supplementierung. Der Effekt von exogener AA auf die Biosyntheseregulation wurde auf Stufe GULO-Aktivität und *GULO*-mRNA-Transkriptionseffizienz oder mRNA-Stabilität durch RPA untersucht. AA-Supplementierung (1500 mg/kg Futter) im Futter bei normalen Schweinen während 28 Tagen verminderte die GULO-Aktivität (etwa 50%) ohne das Transkriptionsniveau zu beeinflussen. Zudem wurde die Aktivität des antioxidantischen Enzyms Superoxid Dismutase (SOD) in normalen und defizienten Schweinen durch AA-Zusätze nicht beeinflusst. Daher übt SOD vermutlich keine schützende Wirkung auf den oxidativen Status von AA-Mangeltieren aus.