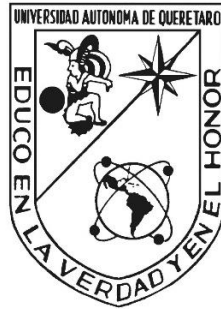


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA**



GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA LEVADURA *S. CEREVISIAE* KNOCKOUT PARA LA PROTEÍNA BTN1

TESIS INDIVIDUAL

**Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Maestría en Ciencias en Biomedicina**

Presenta:

I.Bt. ALEJANDRA HUANTE PARRA

Dirigido por:

DR. EN C. JUAN CARLOS SOLÍS SÁINZ

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2018

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Biomedicina



GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA LEVADURA *S. CEREVISIAE* KNOCKOUT PARA LA PROTEÍNA BTN1

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Maestra en Ciencias en Biomedicina

Presenta:

I.Bt. Alejandra Huante Parra

Dirigido por:

Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz

SINODALES

Dr. Juan Carlos Solís Sáinz
Presidente

Firma

Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea
Secretario

Firma

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreyra
Vocal

Firma

Dr. Pablo García Solís
Suplente

Firma

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga
Suplente

Firma

Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea
Directora de la Facultad de Medicina

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Biomedicina



**GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA LEVADURA S.
CEREVISIAE KNOCKOUT PARA LA PROTEÍNA BTN1**

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Maestra en Ciencias en Biomedicina

Presenta:

I.Bt. Alejandra Huante Parra

Dirigido por:

Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz

SINODALES

Dr. Juan Carlos Solís Sáinz
Presidente


Firma

Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea
Secretario


Firma

Dr. Francisco Sosa Ferreyra
Vocal

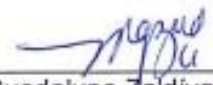

Firma

Dr. Pablo García Solís
Suplente


Firma

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga
Suplente


Firma


Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea
Directora de la Facultad de Medicina


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A cada uno de mis sinodales y mentores de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. Sin sus conocimientos y apoyo, este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea, por la confianza depositada en mí para trabajar en horarios extraordinarios en el laboratorio que tiene a cargo.

A Alejandro Lloret Sandoval, aunque esté lejos, gracias por enamorarme de las Neurociencias y la Genética. Por disciplinarme y enseñarme a trabajar bajo distintas atenciones. Por enseñarme a “caminar” para después poder “correr”. Un gusto haberlo conocido.

Al Dr. Juan Carlos Solís Sáinz, por arroparme cuando necesité de un asesor para continuar trabajando.

A cada uno del personal administrativo de la Facultad por hacerme más fácil y ameno el trabajo.

Al programa FOPER de la Universidad Autónoma de Querétaro, por facilitarme recursos para continuar con mi investigación científica.

A CONACYT, por el apoyo otorgado para manutención durante el tiempo reglamentario del posgrado.

A Mayela de Montserrat Padilla Alemán, hicimos un gran equipo de laboratorio.

A mi madre, motor y pieza fundamental de mi vida. Mi más grande ejemplo a seguir. Esto va por ti, mi Vero.

A mi familia, que es lo más valioso que tengo.

A mi querido Gerardo Daniel Sánchez Sánchez, por creer en mí, por alentarme a ser mejor y terminar este capítulo de tu mano. Te amo

A ti, princesa hermosa que vienes a alegrar la vida de papi y mami con mucha ternura y amor. Siempre seguiré superándome, para darte lo mejor de mi persona y me veas como un referente para superarte TÚ en cada aspecto de tu vida. Te amo Regina.

A aquellos amigos que estuvieron y están.

CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	6
2.	INTRODUCCIÓN.....	7
3.	MARCO TEÓRICO.....	8
3.1	Enfermedad de Batten.	8
3.2	Gen <i>hCLN3</i>	9
3.3	Proteína CLN3 (CLN3p).....	10
3.3.1	Localización de CLN3p.....	11
3.3.2	Funciones propuestas para CLN3p	11
3.4	El gen <i>hCLN3</i> y su homólogo <i>ScBTN1</i>	12
3.4.1	Caracterización de $\Delta Btn1$ en <i>S. cerevisiae</i>	13
4.	JUSTIFICACIÓN.....	14
5.	HIPÓTESIS.....	15
6.	OBJETIVO.....	15
8.	METODOLOGÍA.....	16
8.1	Selección de cepas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para la mutante <i>knockout</i> para la proteína BTN1.....	17
8.2	Generación de una mutante <i>knockout</i> $\Delta Btn1$	18
8.2.1	Extracción de DNA genómico.....	18
8.2.2	Generación de un cassette URA3 a partir de los “primers” Yhc3ura_FWD y Yhc3ura_REV.....	18
8.3	Transfección del <i>cassette URA3</i> en las levaduras BY4741 y BY4742 por el protocolo del Acetato de Litio (LiOAc).....	20
8.4	Confirmación de la disrupción del gen <i>BTN1</i> y reemplazo por <i>URA3</i>	21
8.5	Caracterización de las mutantes $\Delta Btn1$	22
8.5.1	Resistencia de las mutantes $\Delta Btn1$ al compuesto ANP.....	22
8.5.2	Acidificación del medio por las mutantes $\Delta Btn1$	23
9.	RESULTADOS.....	24
9.1	Marcadores de auxotrofía	24
9.2	Síntesis del <i>cassette URA3</i> amplificado con “primers” Yhc3ura_FWD y Yhc3ura_REV.....	27
9.3	Síntesis del <i>cassette URA3</i> y transfección en <i>S. cerevisiae</i>	28
9.4	Resistencia al compuesto ANP y acidificación del medio.....	29
10.	DISCUSIÓN.....	31
11.	CONCLUSIÓN.....	34
12.	REFERENCIAS.....	35

1. RESUMEN

CLN3 es el gen implicado en la enfermedad de Batten, el cual tiene un homólogo denominado *BTN1*, gen constitutivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Debido a que hoy en día sigue sin conocerse el rol biológico de *CLN3* en células de mamíferos superiores, el utilizar modelos eucarióticos sencillos permite analizar detalladamente la función del gen y la proteína que codifica. Pearce y colaboradores desarrollaron una mutante $\Delta Btn1$ en 1998 que fue caracterizada fenotípicamente, siendo la pauta para encontrar las pérdidas/ganancias de función del gen. En esta tesis, discutimos la importancia de la reproducibilidad de dicho modelo utilizando una nueva metodología para la recombinación homóloga entre *BTN1* y un cassette *URA3*, así como nuestras perspectivas para que en investigaciones futuras, al hacer ensayos de complementación, se usen construcciones moleculares con las mutaciones que desencadenan en la enfermedad, y así, esclarecer que ocurre con *CLN3* en su estado silvestre y mutante.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Batten, *BTN1*, recombinación homóloga, vacuola, homeostasis, ANP.

2. INTRODUCCIÓN

La Lipofuscinosis Neuronal Ceroidea Clásica Juvenil, también llamada enfermedad de Batten (EB), es una afección neurodegenerativa fatal de herencia autosómica recesiva que afecta a 1 de cada 12,500 infantes entre los 5 y 10 años de edad en los Estados Unidos de Norteamérica (Cotman SL, *et al.* 2012). La EB se caracteriza por un acúmulo anormal de material autofluorescente, primordialmente lipofuscina, en las neuronas extrapiramidales del cerebelo (Padilla-López S, *et al.* 2012). El gen responsable de la EB es llamado *hCLN3* y puede presentar múltiples mutaciones que deriven en la enfermedad, pero en el 85% de los casos, se relaciona con una delección de 1.02 kb, específicamente en los exones 7 y 8 (*cln3*^{Δex7/8}) (Haines RL, *et al.* 2009). Esta mutación afecta el marco de lectura abierto y se traduce en una proteína trunca no funcional. El gen *hCLN3* silvestre codifica una proteína de membrana lisosomal (CLN3p), de la cual su función biológica permanece desconocida (Padilla-López S, *et al.* 2012).

La alta conservación del gen *CLN3* en las especies eucariotas, que va desde organismos unicelulares a mamíferos superiores, sugiere que su función celular básica es importante (Taschner PE, *et al.* 1997). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el homólogo a *hCLN3* es el gen *BTN1*. La función de *ScBTN1* está asociada a la homeostasis vacuolar, organelo homólogo a los lisosomas y donde se cree que *hCLN3* efectúa su función biológica (Narayan SB, *et al.* 2006). El Dr. David A. Pearce y colaboradores (1998), adoptaron el modelo de *S. cerevisiae* y demostraron dicha homología al poder revertir completamente con *hCLN3* el fenotipo característico de una cepa *knockout ScBTN1* (Δ -*btn1*).

En el presente estudio, se generó y caracterizó fenotípicamente a la cepa Δ -*btn1*, con la finalidad de obtener un modelo que, a niveles génicos, represente rasgos propios de la enfermedad de Batten.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Enfermedad de Batten.

La Enfermedad de Batten (EB) es la forma más común de un grupo genéticamente heterogéneo de raros desórdenes neurodegenerativos, los cuales colectivamente son llamados Lipofuscinosis Neuronal Ceroidea (Cárcel-Trullols J, *et al.* 2015). La EB se caracteriza por una disfunción lisosomal que conlleva al acúmulo de material autofluorescente, primordialmente lipofuscina, en diversos tipos de células epiteliales y en las neuronas extrapiramidales del cerebelo (Gachet Y, *et al.* 2005).

La incidencia de la EB es de 1 por cada 12,500 nacimientos y se estima que 440,000 personas la padecen en los Estados Unidos de Norteamérica (Cárcel-Trullols J, *et al.* 2015). Desafortunadamente en México no se cuenta con datos estadísticos de la enfermedad, ya que los signos característicos de la EB pueden ser relacionados con otros padecimientos.

El cuadro clínico de los pacientes con EB se presenta en infantes de entre 5 y 10 años; y sus características son pérdida de la capacidad visual progresiva, convulsiones, retraso motor y déficit cognitivo, que culmina con una demencia severa y la degeneración total del cerebro. Debido a las complicaciones derivadas de la enfermedad, las personas con EB mueren antes de comenzar la segunda década de vida (Rakheja D, *et al.* 2008).

La EB es heredada de una forma autosómica recesiva y se ha identificado que el gen *hCLN3* es el responsable de esta enfermedad (Narayan SB, *et al.* 2006).

3.2 Gen *hCLN3*

En 1995, el Consorcio Internacional de la Enfermedad de Batten, identificó el gen mutado responsable de la EB. El locus del gen *hCLN3* está ubicado en la región cromosómica 16p12.1 al cual lo conforman 15 exones con un total de 15kb, con un marco de lectura abierto de 1,314 pb (Rakheja D, *et al*, 2008).

Se han identificado 41 diferentes mutaciones y 5 polimorfismos en *hCLN3*, incluyendo 4 deleciones largas, 5 pequeñas, 10 mutaciones sin sentido, 6 mutaciones en el sitio de edición del mensajero y un cambio de intrón resultando en una edición aberrante (Rakheja D, *et. al*, 2008). La mutación más prevalente (74% de los casos) en *hCLN3* causante de la EB es una deleción de 1.02 kb entre los exones 7 y 8 (*hCLN3*^{Δex7/8}) (**Figura 1**) provocando un desplazamiento del marco de lectura en la secuencia codificante del exon 9. Dicho desplazamiento provoca la inserción de un codón de paro prematuro y la traducción de una proteína trunca no funcional (Cotman SL, *et al.* 2012).

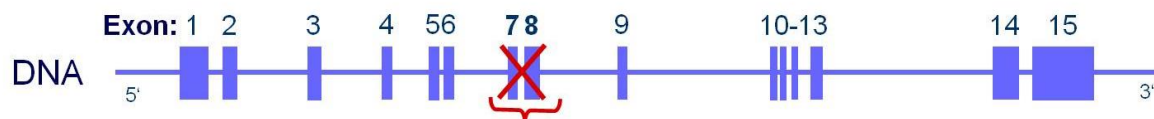


Figura 1. Mutación *hCLN3*^{Δex7/8}. El gen *CLN3* de los pacientes con EB presenta una deleción de los exones 7 y 8 provocando un codón de paro prematuro y una proteína trunca no funcional. Tomado de Pearce DA *et al.*, 1998.

3.3 Proteína CLN3 (CLN3p)

El gen *hCLN3* codifica una proteína de membrana (CLN3p) de 438 aminoácidos con un peso de 48 kDa, con 6 dominios transmembranales y sus extremos amino y carboxilo dentro del citosol (**Figura 2**) (Cárcel-Trullols J, *et al.* 2015). CLN3p presenta múltiples modificaciones postraduccionales, tales como glucosilación, fosforilación y ubiquitinación (Pearce DA, *et al.* 1999). La función de CLN3p permanece desconocida, pero se ha asociado a varios procesos celulares como el transporte, la degradación mediada por la vía endosoma-lisosomal y la muerte celular por apoptosis (Vidal-Donet JM, *et al.* 2013).

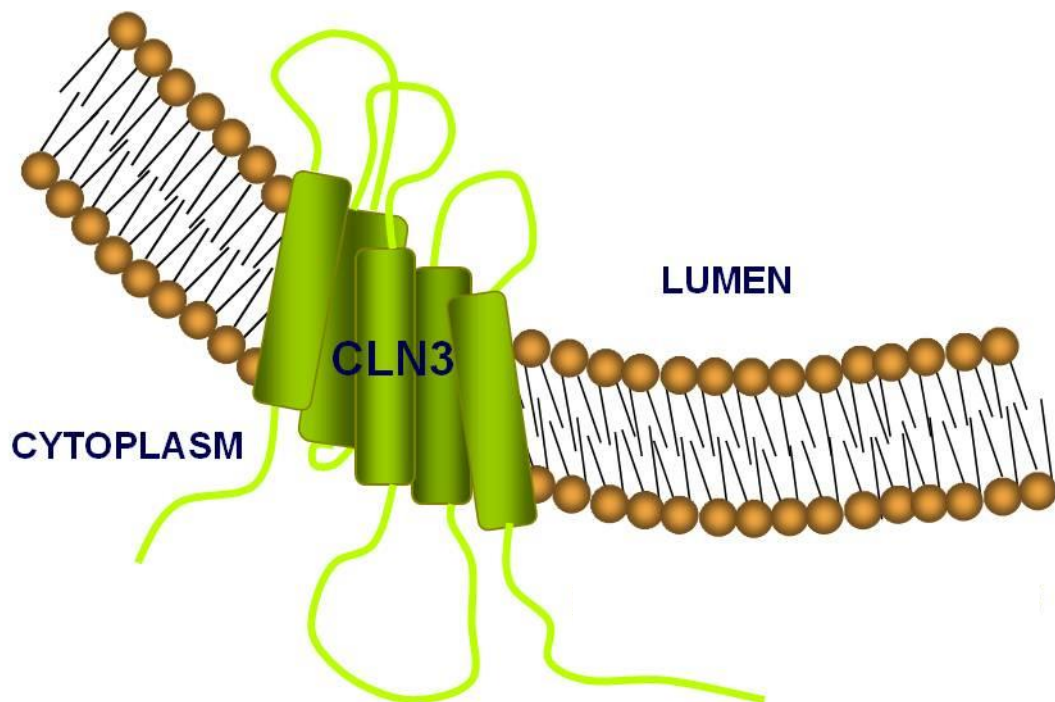


Figura 2. Proteína CLN3. En su modo silvestre, CLN3p presenta 6 dominios transmembranales, y sus extremos amino y carboxilo dentro del citosol. En su forma mutada, se ha descrito un cambio de posición de ambos extremos. Tomado de Gatchet et al. 2005.

3.3.1 Localización de CLN3p.

La localización de CLN3p permanece en debate, ya que se le asocia a diferentes orgánulos dentro de la célula. Ensayos inmunohistoquímicos mostraron que la proteína está expresada en la mitocondria, el aparato de Golgi, los endosomas tardíos, vesículas sinápticas y los lisosomas. A nivel tisular, su expresión es más abundante en cerebro, específicamente en astrocitos, endotelio capilar y neuronas (Rakheja D, *et al.* 2008). Un estudio reciente en un modelo murino, describe un patrón de expresión máximo de CLN3p en el tálamo y la corteza cerebral (Oetjen S, *et al.* 2016). En neuronas primarias diferenciadas, la CLN3p muestra principalmente una localización somatodendrítica, mientras que en un cultivo de neuronas primarias murinas su ubicación predominantemente fue en los compartimentos endosoma-lisosómicos tardíos (Oetjen S, *et al.* 2016).

3.3.2 Funciones propuestas para CLN3p

Como se ha dicho anteriormente, la función biológica de CLN3p permanece desconocida hasta el momento, pero la mayor parte del entendimiento de los procesos fisiológicos y patológicos donde CLN3p participa, proviene de estudios en modelos animales. Igualmente existen homólogos de CLN3p en sistemas eucarióticos sencillos. Estas proteínas homólogas se han estudiado en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. (Phillips SN, *et al.* 2006).

En las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*, se ha identificado a partir de ensayos de mutagénesis dirigida al gen *BTN1* como homólogo del gen *hCLN3* (Phillips SN, *et al.* 2006). La proteína BTN1 (BTN1p) ha sido ligada a la regulación del pH celular, homeostasis de aminoácidos y la producción de óxido nítrico (Guo WX, *et al.* 1999). En *D. melanogaster*, el homólogo a *hCLN3* llamado *ppt1*, codifica una proteína de

membrana lisosomal de un acarreador de azúcar propio de la especie, que cuando se encuentra mutada, produce defectos en el tráfico endo-lisosomal, una disfunción en el reciclaje de vesículas sinápticas y disfunción sináptica dependiente de la edad (Dermaut B, *et al.* 2005).

3.4 El gen *hCLN3* y su homólogo *ScBTN1*

Desde su aislamiento en 1995, la determinación de la función del gen *hCLN3* ha sido controversial, pero su alta conservación en las especies eucariotas demuestra que su función celular básica es muy relevante (Taschner PE, *et al.* 1997).

El homólogo funcional de *hCLN3* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es *ScBTN1*, siendo 39% idéntico y 59% similar en la cadena aminoacídica (Pearce DA, *et al.* 1999). Ambas proteínas son encontradas en organelos especializados en la degradación de material de desecho celular. En células de mamífero superior, estos organelos reciben el nombre de lisosomas. En organismos eucariotas más simples, como lo son las levaduras y plantas, éste organelo es llamado vacuola (Alberts, 2008). Los lisosomas son vesículas membranosas localizadas en el citosol que contienen enzimas hidrolíticas que permiten la digestión celular. Las vacuolas de la levadura cumplen la misma función (Alberts, 2008)

El experimento de mayor relevancia que demuestra la homología entre ambas proteínas es que la expresión de *hCLN3* es capaz de complementar una delección del gen *ScBTN1* ($\Delta Btn1$), revirtiendo de manera completa el fenotipo de la mutante *knockout* (Pearce DA, *et al.* 1999).

3.4.1 Caracterización de $\Delta Btn1$ en *S. cerevisiae*.

Las cepas carentes del gen *BTN1* presentan resistencia al compuesto D (-)-treo-2-amino-1-[p-nitrofenil]-1,3-propanodiol (ANP), que es un derivado del cloramfenicol, fármaco al que *S. cerevisiae* es sensible (Pearce DA. *et al.* 1999). Esta resistencia es causada por una aparente disminución en el pH del medio de crecimiento. Las cepas $\Delta Btn1$ muestran alta habilidad de acidificar el medio a través de una elevación de la actividad del complejo V^+ -ATPasa (H^+ -ATPasa) en la membrana plasmática. Esto genera así un gradiente electroquímico de protones para diferentes vías de transporte a la célula (Cárcel-Trullols J, *et al.* 2015).

Ensayos en donde se implica el homólogo de *hCLN3* en *Schizosaccharomyces pombe*, llamado *SpBTN1*, muestran que las cepas carentes del gen presentan un cambio de tamaño y pH en sus vacuolas (Phillips SN, *et al.* 2006). En contraparte, en aquellas que sobreexpresan *SpBTN1* se reducen ambas características, sugiriendo que éste gen regula la homeostasis vacuolar (Phillips SN, *et al.* 2006). Tomando en cuenta el efecto de *SpBTN1* sobre la vacuola con su homólogo en mamíferos superiores los lisosomas, se ha sugerido que el proceso de la enfermedad de Batten está dado por un pH elevado dentro de dichos orgánulos (Gachet Y, *et al.* 2005).

El gen *ScBTN1* también está involucrado en la muerte celular por apoptosis. Esto se relaciona directamente con la homeostasis de aminoácidos, específicamente en la síntesis de L-Arginina. La L-arginina es un aminoácido que participa en la síntesis de óxido nítrico (NO), el cual a altas concentraciones actúa como señal apoptótica. Este fenotipo también es revertido por *hCLN3* (Osorio NS, *et al.* 2007).

Además, se ha demostrado que *ScBTN1* está involucrado en el transporte proteico entre la vacuola y el canal *trans*-Golgi, donde la delección completa del gen trae consigo una disfunción en el transporte retrógrado en la red del Golgi. Específicamente en la regulación de la fosforilación del receptor Sed5 modulada por

Yck3 para el anclaje de las proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) (Kama R, *et al.* 2011),

4. JUSTIFICACIÓN

La EB es un desorden neurodegenerativo de herencia autosomal recesiva, progresivo y fatal en infantes de entre 5 y 10 años de edad. Este desorden presenta una sintomatología de pérdida progresiva de la visión, convulsiones, pérdida de funciones cognitivas, disfunción en movimientos, entre otros. Estos efectos son producidos por una acumulación de material fluorescente en el citoplasma de las neuronas extrapiramidales y otras células, conduciendo a una muerte temprana antes de la segunda década de vida (Pearce DA, *et al.* 1999).

La prevalencia de EB en Europa varía de 0.2 a 7 por cada 100,000 nacimientos, con mayor frecuencia en países escandinavos, mientras que en los Estados Unidos de Norteamérica, afecta 1 de cada 12,500 nacimientos. Alrededor del mundo se han reportado casos en India, Japón, Brasil, Argentina, Canadá y los Estados Unidos de América (Rakheja D, *et al.* 2008).

Es bien sabido que la mutación en el gen *hCLN3* es la causante de la enfermedad de Batten, donde la forma más común es la delección de los exones 7 y 8 (*hCLN3* ^{Δ ex7/8}), que causa un codón de paro prematuro y por lo tanto una proteína trunca disfuncional. La función biológica de esta proteína, tanto en estado silvestre como en la mutante, no está claramente descrita (Gachet Y, *et al.* 2005). El gen *hCLN3* cuenta con un gen homólogo en *Saccharomyces cerevisiae* llamado *ScBTN*. El gen *hCLN3*, cuando es expresado heterológamente en la levadura, es capaz de revertir el fenotipo dado por una construcción knockout para *ScBTN1* (Haines RL, *et al.* 2009). De esta forma, el contar con un modelo celular carente de esta proteína (Δ BTN1p) permitirá una mayor comprensión de esta patología para la cual actualmente no se cuenta con tratamiento específico alguno.

5. HIPÓTESIS

La cepa de levadura *S. cerevisiae knockout* para la proteína BTN1, mostrará un fenotipo característico compatible con la Enfermedad de Batten.

6. OBJETIVO

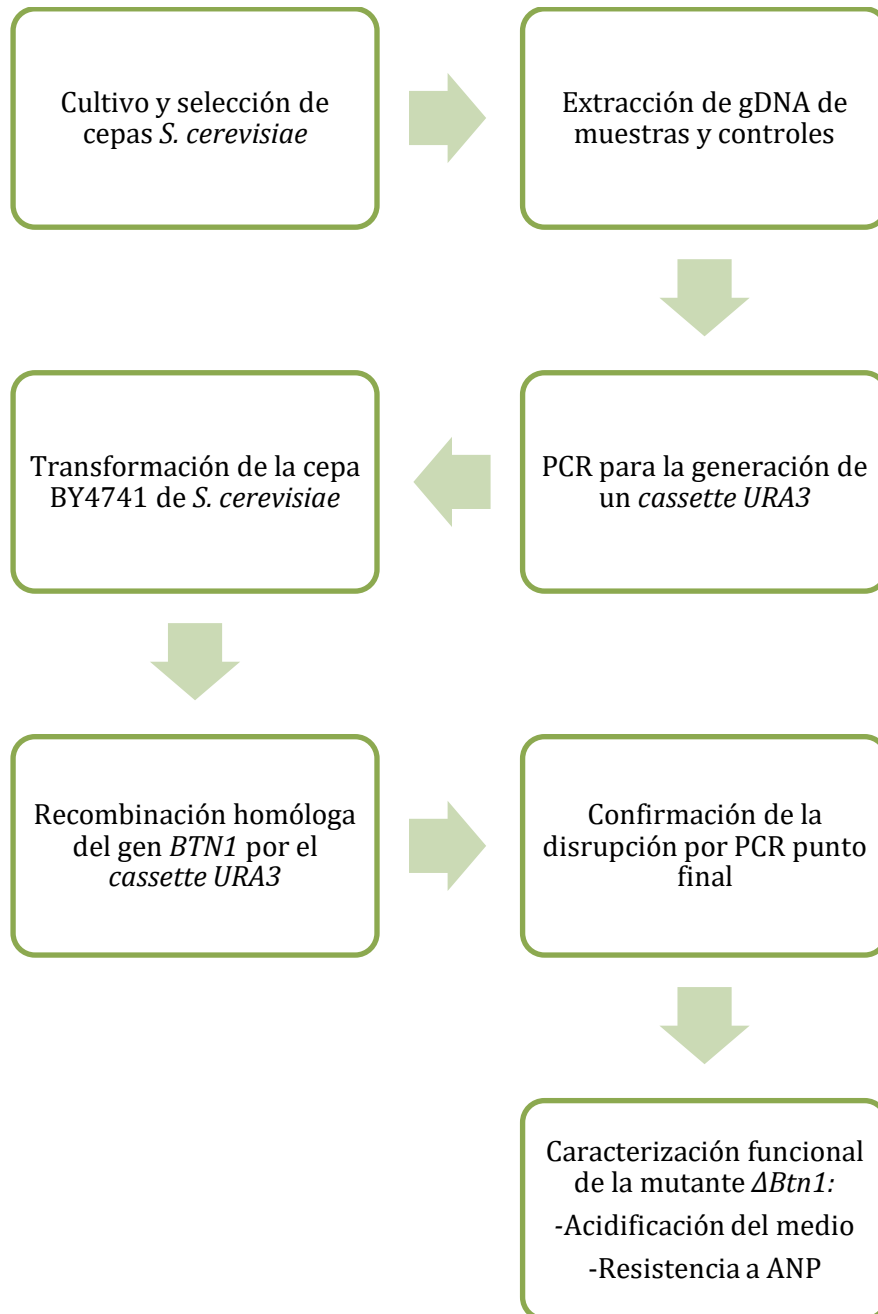
Generar y caracterizar una construcción *knockout* para la proteína BTN1 en *Saccharomyces cerevisiae*.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar la cepa *knockout* para la proteína BTN1 en *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Caracterizar funcionalmente esta cepa *knockout* para la proteína BTN1 mediante la determinación del pH y su resistencia a ANP.

8. METODOLOGÍA

A continuación se muestra un diagrama de flujo que esquematiza el proceso metodológico que se siguió para la realización del modelo $\Delta Btn1$, mismo que es descrito a detalle posteriormente.



8.1 Selección de cepas *Saccharomyces cerevisiae* para la mutante *knockout* para la proteína BTN1.

Se probó la viabilidad de 2 cepas de *S. cerevisiae*, BY4741 y BY4742, genotípicamente tipificadas auxótrofas para uracilo, que fueron amablemente donadas por el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se recibió un cultivo estriado en medio Agar Yeast Extract-Peptide-Dextrose (YPD) sólido que fue inmediatamente resembrado en 5 ml de medio YPD líquido y crecido a una temperatura de 30°C por 18 horas con una agitación de 180 rpm.

Para comprobar el genotipo y la auxótrofia a uracilo, se prepararon cajas de Petri de 50 ml con 25 ml de medio mínimo (MM) sólido selectivo (Sigma-Aldrich®) (carente de aminoácidos y bases nitrogenadas) esterilizados a 121°C a 1 atmósfera de presión; así como soluciones stock 1 M de los aminoácidos arginina, triptófano, leucina, y las bases nitrogenadas adenina y uracilo, esterilizadas por filtración a vacío.

Por cada 100 ml de medio, en recipientes separados, se adicionaron 0.5 M de aminoácidos y bases nitrogenadas, excluyendo uno de estos componentes por ronda. De esta forma 4 cajas con MM no fueron adicionadas con uracilo.

Se hicieron diluciones seriadas 1×10^1 - 1×10^5 de los cultivos de las cepas en YPD líquido, en tubos eppendorf® de 1.5 ml.

Las diluciones fueron sembradas por goteo en cajas Petri previamente rotuladas con una cuadrícula numerada por columnas, para ayudar a depositar la gota de cada muestra siguiendo el orden de la fila y evitar el contacto con alguna otra muestra con diferente factor de dilución. Las cajas sembradas se incubaron a 30°C por 24 horas.

8.2 Generación de una mutante *knockout* $\Delta Btn1$.

8.2.1 Extracción de DNA genómico

Una UFC de BY4741 y otra de BY4742 fueron tomadas de un cultivo sólido e inoculadas en 5 ml de medio YPD, a 30°C por 18 horas con una agitación de 180 rpm. Se siguió el protocolo sugerido por el manual Quantum Prep® Plasmid Kits por BIO-RAD™ para la extracción de DNA genómico (gDNA).

El mismo protocolo fue utilizado para la extracción de gDNA de levadura de pan comercial, que será utilizado como control en el diseño experimental.

8.2.2 Generación de un cassette URA3 a partir de los “*primers*” Yhc3ura_FWD y Yhc3ura_REV

El marcador de auxotrofia a uracilo nos servirá para la comprobación de la disrupción del gen *BTN1* en BY4741 y BY4742 por el gen *URA3*, que codifica para la enzima ODCasa que desempeña una función central en la síntesis de *nov*o de uridina-5'-O-monofosfato (UMP), precursor del uracilo. Para llevar a cabo la amplificación del gen *URA3* a partir del gDNA de levadura de pan comercial, se sintetizaron un par de primers modificados de 70 nucleótidos, los primeros 52 pertenecen a la secuencia inicial del gen *BTN1*, los cuales permiten la recombinación homóloga de un gen por otro, y los 18 restantes, al gen *URA3*, los cuales son la base para su amplificación por PCR punto final (**Figura 3**). Los primers fueron sintetizados a partir de la plataforma Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) con la secuencia del gen completo proporcionada por el GeneBank del NCBI Gene ID: 853387 y elaborados por la marca IDT®.

Yhc3ura_FWD:

>>>> 5' GCA AGT AAA TAT AAA TGA CAA ATC TCA TGA GAT ATA TTG CTA
CTT TTG GCT CTT TGA TGT CGA AAG CTA CAT ATA AGG 3' <<<<

TM: 59.90°C

Yhc3ura_REV:

<<<< 5' CAC AAC AAA ACT TTA TTC CAT CCT ACA CCA AGG TCT GTC ATC
GGC ATT TGA TGC CTA CTT AGT TTT GCT GGC CGC ATC TTC TC 3' <<<<

TM: 59.99°C

Para encontrar la TM adecuada para ambos primers y asegurar la especificidad de la amplificación, se realizó una PCR punto final con un gradiente de temperatura: 50°C, 54°C, 58°C, 62°C, 66°C y 70°C. Para el PCR fue utilizada la Taq®Pol por Invitrogen™ y se corrió un total de 20 µl de reacción por 35 ciclos. Los resultados del PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE a 100V por 40 minutos cargado con el ladder λHind III / DNA Marker® y el loading buffer 6X.

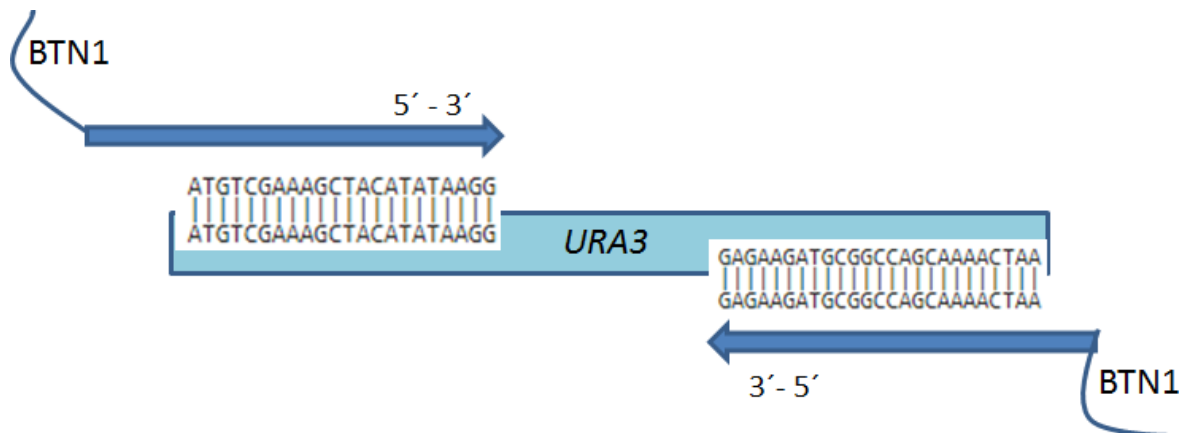


Figura 3. Amplificación de cassette URA3 por PCR punto final. Los primers modificados contienen una cola con 52 nucleótidos que pertenecen a la secuencia inicial del gen BTN1, los cuales permiten la recombinación homóloga de un gen por otro dentro de la célula por acción de exonucleasas al momento de hacer la transfección del cassette. Los 26 restantes corresponden a la secuencia inicial y final del gen URA3, los cuales se hibridan para elongar el amplicón por PCR punto final.

8.3 Transfección del *cassette URA3* en las levaduras BY4741 y BY4742 por el protocolo del Acetato de Litio (LiOAc).

Este método es usado principalmente para transformar hongos con pared celular, en este caso, las levaduras. Se basa en incubar las células con acetato de litio, PEG y someterlas a un choque térmico. Estas condiciones desestabilizan la pared celular y permiten la entrada de DNA, sin la necesidad de preparar esferoplastos. Para la transfección, se tomó una asada de un cultivo sólido recién sembrado de las cepas BY4741 y BY4742, las cuales fueron inoculadas en 20 ml de medio YPD y se pusieron a crecer toda la noche a 30°C con agitación de 180 rpm.

Posteriormente, se centrifugó 10 ml de un cultivo de levaduras crecido de forma vigorosa en medio YPD (107 células /ml aproximadamente) 3 min a 3,500 rpm a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 5 ml de agua destilada estéril. Este lavado se llevó a cabo por duplicado, con la finalidad de eliminar por completo los rastros de medio de cultivo. Posteriormente se resuspendió el pellet en 200 µl de solución tamponada estéril de acetato de litio recién preparada mezclando:

0.5 ml de Tampón TE 10X (Tris-HCl 0,1M EDTA 10 mM pH 7.5)

0.5 ml de Acetato de litio 1M pH 7,5

4 ml de Agua destilada

Se realizaron 3 transfecciones en tubos de 1.5 ml, cambiando la concentración del *cassette*, para estandarizar el método. Cada tubo quedó mezclado con lo siguiente:

10 µl de DNA de esperma de salmón desnaturalizado (10 mg/ml)

50,100 y 200 µl del *cassette URA3* a transformar por cada tubo

50 µl de la suspensión de células

Se agitó en el vortex por 2 minutos y seguido a esto, se añadieron 300 µl de solución de Polietilenglicol (PEG) estéril recién preparada mezclando:

1.5 ml de Tampón TE 10X (Tris-HCl 0,1M EDTA 10 mM pH 7.5)

1.5 ml de Acetato de litio 1M pH 7.5

12 ml de Polietilenglicol 4000 al 50%

Nuevamente, se mezcló por vórtex y se incubó 30 min a 30°C en agitación. Para aplicar el choque térmico, los tubos fueron incubados 15 min en baño maría a 42°C. Seguido a esto, se añadió 1 ml de agua destilada estéril y se mezcló con la pipeta

repetidas veces. Después, se centrifugaron 1 min a 3500 rpm a temperatura ambiente.

Por último, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 200 µl de agua destilada estéril, mismos que se sembraron en una caja de SC-Ura. Aquellas colonias capaces de crecer en el medio, fueron las transfectadas exitosamente con el *cassette URA3*.

8.4 Confirmación de la disrupción del gen *BTN1* y reemplazo por *URA3*

Para confirmar la adecuada inserción del cassette *URA3* mediante recombinación homóloga (**Figura 4**), el reemplazo del gen *BTN1* por *URA3*, se realizó un PCR de punto final, utilizando como templado gDNA de levadura de pan como control, gDNA de BY4741 y BY4742 y gDNA de las colonias transfectadas, que fueron tratadas para extraer el gDNA total con el protocolo previamente mencionado.

Para el PCR fue utilizada la Taq®Pol MIX por Invitrogen™ y se corrió un total de 20 µl de reacción por 35 ciclos (2 µl de templado, 1 µl por cada primer Yhc3_uraFWD/REV, 10 µL de Taq®Pol MIX y 6 ul de ddH₂O). Los resultados del PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE a 100V por 40 minutos cargado con el ladder λHind III / DNA Marker® y el loading buffer 6X. Aquellas muestras que presentaran una amplificación, darían negativo a la transfección del *cassette URA3*.

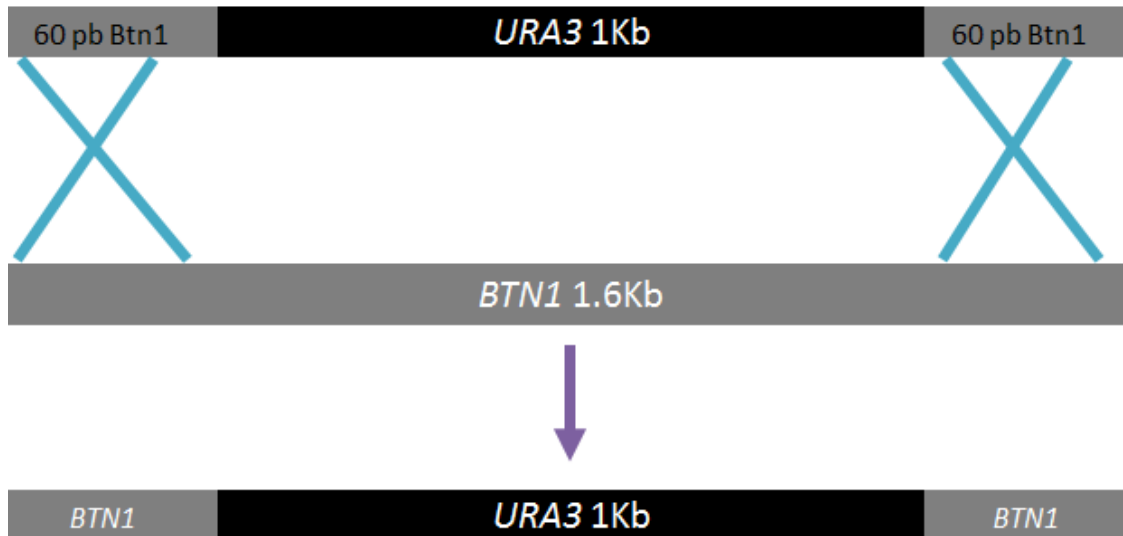


Figura 4. Mecanismo de recombinación homóloga del cassette URA3. Las ~60 pb incluidas en el *cassete URA3* del gen *BTN1* son el blanco de exonucleasas propias de *S.cerevisiae* contenidas en el citosol, que permitirá su reconocimiento e inserción en el material genético de la levadura.

8.5 Caracterización de las mutantes $\Delta Btn1$

Pearce y colaboradores en 1998 describen varios fenotipos para las mutantes $\Delta Btn1$, en este trabajo solo se revisó la resistencia al compuesto ANP y la capacidad de acidificación del medio.

8.5.1 Resistencia de las mutantes $\Delta Btn1$ al compuesto ANP

Para determinar la resistencia al compuesto ANP, se preparó medio SD al cual se le adicionó el compuesto ANP en concentración de 0.5, 1, 2 y 4 mg/ml. El ANP fue disuelto en agua y se preparó un stock de 20 mg/ml, el cual fue esterilizado por filtración en una membrana de 0.22 μ m al vacío. Se añadió al medio SD hasta que bajó su temperatura, tras estar en el autoclave (aprox. 55°C) ya que el compuesto ANP es termolábil.

Una UFC de levadura de pan, las cepas BY4741, BY4742 y las mutantes $\Delta Btn1-1$ y $\Delta Btn1-2$ fueron sembradas en medio SD toda la noche a 30°C. Al día siguiente,

se hicieron diluciones seriadas de 1×10^1 hasta 1×10^5 que fueron sembradas por goteo como se encuentra explicado anteriormente.

Las placas sembradas se pusieron a incubar a 30°C y fueron evaluadas a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas

8.5.2 Acidificación del medio por las mutantes $\Delta Btn1$

Para determinar la capacidad de acidificación del medio por parte de las mutantes a comparación de la cepa parental, se preparó medio SD-/Uracilo, añadiendo el indicador de pH púrpura de bromocresol en una concentración de $1 \text{ mg}/\mu\text{l}$. Los medios fueron esterilizados por autoclave a 121°C por 15 minutos a 1 atmósfera de presión, para posteriormente ser plaqueados en cajas Petri de 25 ml.

Una UFC de levadura de pan, las cepas BY4741, BY4742 y las mutantes $\Delta Btn1-1$ y $\Delta Btn1-2$ fueron sembradas en medio SD toda la noche a 30°C . Al día siguiente, se hicieron diluciones seriadas de 1×10^1 hasta 1×10^3 que fueron sembradas por goteo como se explicó anteriormente. Las placas sembradas se incubaron a 30°C y fueron evaluadas a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas.

9. RESULTADOS

9.1 Marcadores de auxotrofia

A las cepas BY4741 y BY4742, se les realizó una verificación de genotipo, ya que traen deleciones específicas de genes codificantes para aminoácidos y/o bases nitrogenadas, con el fin de usarse como marcadores auxotróficos.

Los genotipos son para cada cepa son los siguientes:

BY4741: MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0

BY4742: MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys Δ 0 ura3 Δ 0

Como se muestra en la **Figura 5**, los marcadores para A) Triptofano (Trp), B) Lisina (Lys), C) Adenina (Ade) y D) Arginina (Arg) concuerdan correctamente con el genotipo de las cepas B4741 y BY4742 descrito previamente. Las filas b3 y b4 correspondientes a una misma muestra de la cepa BY4742 sembrada por duplicado en un medio mínimo –Lys, no presentan crecimiento. Si bien se observa un botón que pudiera confundirse con crecimiento óptimo en la columna de la dilución 10⁻¹, lo atribuimos a que aquellas células muertas que pudieran resultar de la manipulación de la muestra hasta su siembra, fueron aprovechadas por las células vivas, obteniendo el aminoácido de cualquier estructura del vestigio celular y permitiendo su crecimiento. Para evitar estos falsos positivos, se realizaron las diluciones seriadas hasta el factor 1:100000, evitando así que la alta concentración celular influya en los resultados.

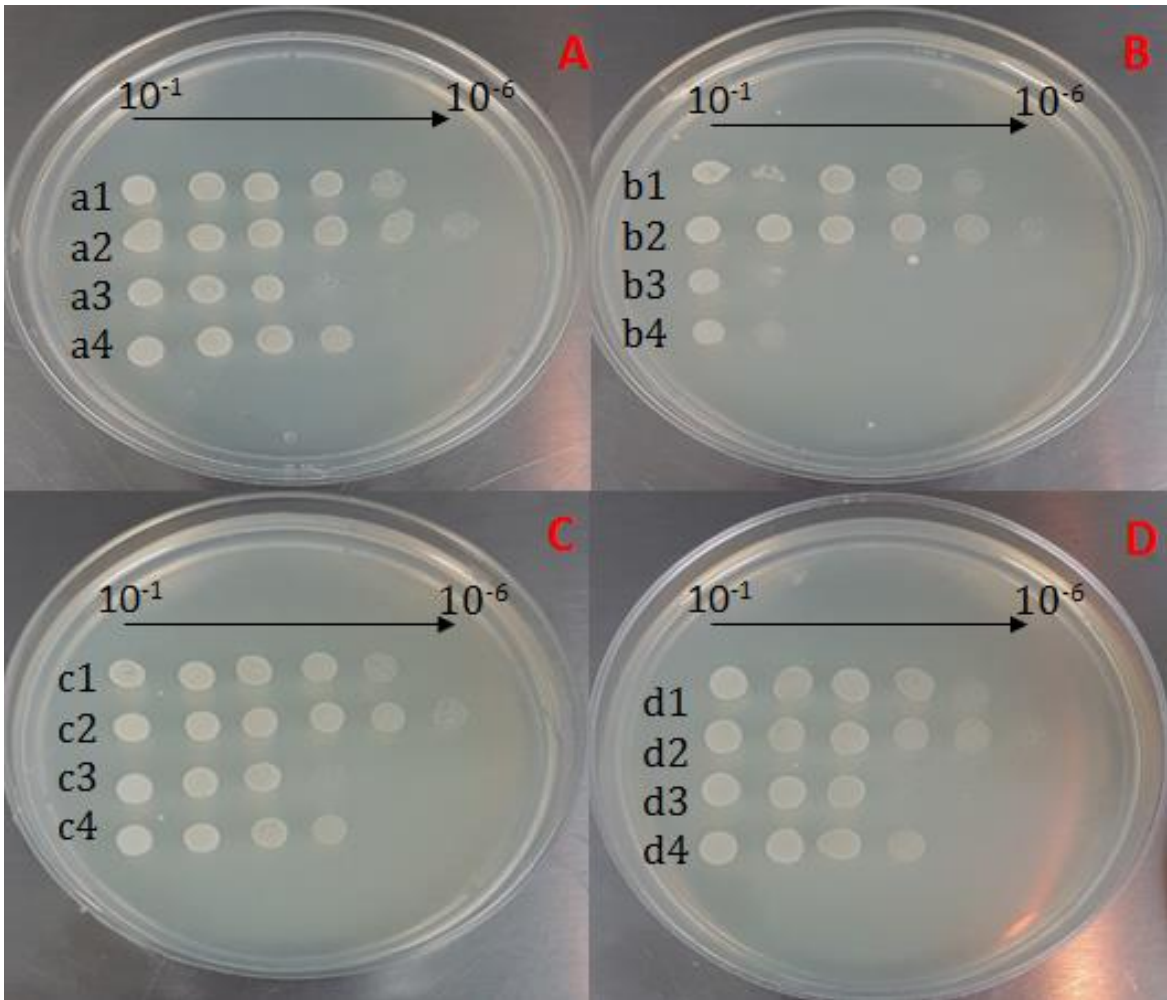


Figura 5. Comprobación de marcadores auxotróficos para Trp, Lys, Ade y Arg. Los paneles A (-Trp), B (-Lys), C (-Ade) y D (-Arg) representan 4 cajas de Petri con medio mínimo que fueron sembradas por goteo, por duplicado, a partir de diluciones seriadas de un inóculo fresco de BY4741 y BY4742, que va de la concentración 1×10^{-1} a 1×10^{-6} ; este intervalo está representado por una flecha. En el panel B, las filas b3 y b4 correspondientes al cultivo BY4742 con el marcador auxotrófico *lysΔ0* no crece a comparación de las filas b1 y b2 correspondientes al cultivo BY4741, cepa que no tiene ese marcador. Los paneles A, C y D no presentan diferencias entre el crecimiento y el genotipo descrito de ambas cepas. Fotos tomadas a las 48 horas de crecimiento a una temperatura de 30°C.

Por otra parte, en la **Figura 6** se muestran los resultados para los marcadores E) Metionina (-Met), F) Leucina (-Leu), G) Histidina (-His) y H) -Uracilo. Las 4 cajas sembradas corresponden correctamente según su crecimiento con el genotipo descrito para ambas cepas. En el panel E, las filas e1 y e2 correspondientes al cultivo de BY4741 que tienen el marcador *met15Δ0*, como era de esperarse, no crece en el medio no enriquecido con el aminoácido, caso contrario a la cepa

BY4742 que no presenta en su genotipo dicho marcador y crece de manera normal. Ambas cepas son auxotrófas a Leu, His y a la base nitrogenada Uracilo (Paneles F, G y H, respectivamente), por lo tanto no se observa crecimiento en ninguna fila y demuestran que su genotipo concuerda con el patrón de crecimiento. Nuevamente, es indispensable no confundir la muestra sembrada a 1×10^{-1} con un crecimiento óptimo de la cepa.

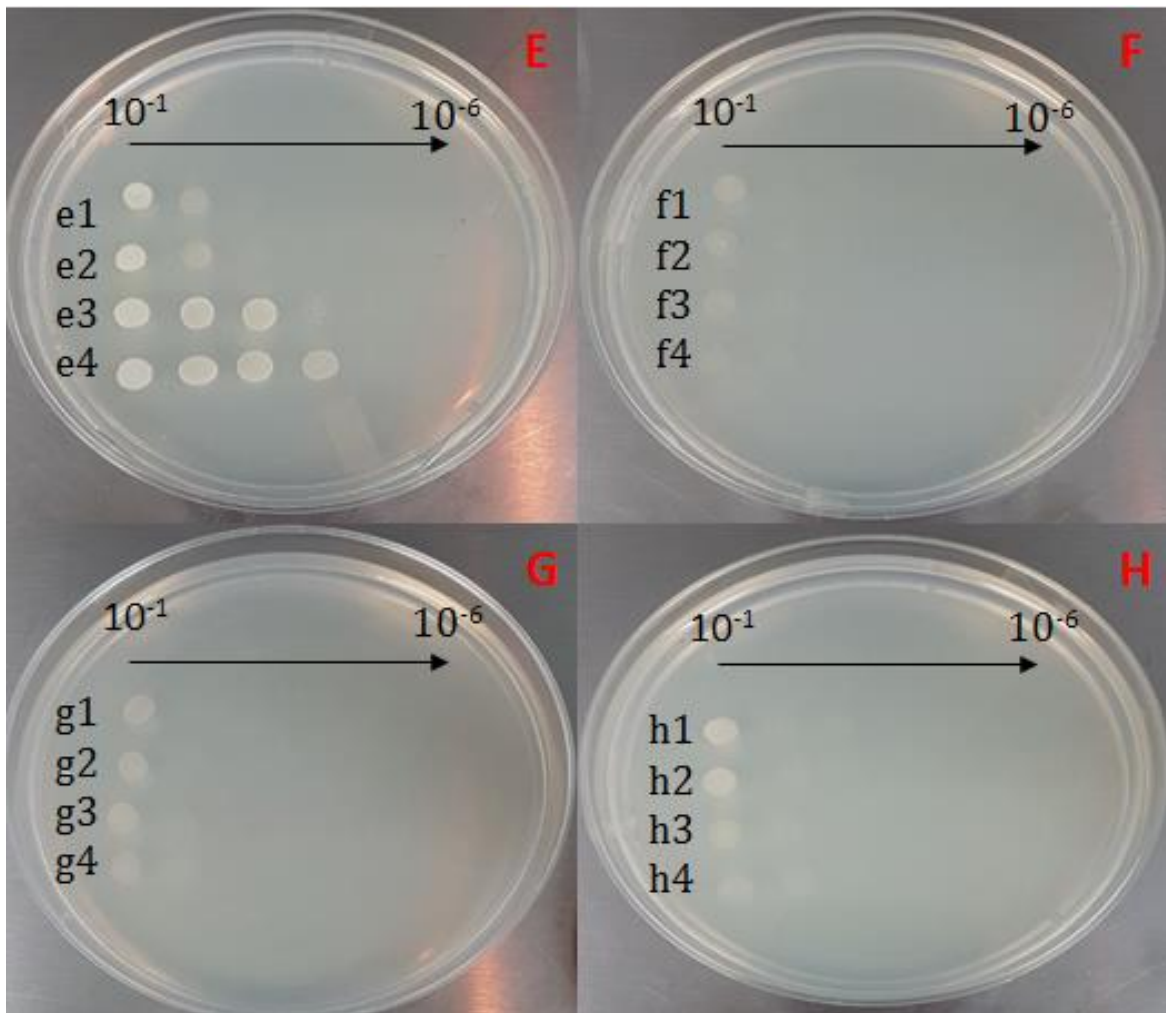


Figura 6. Comprobación de marcadores auxotróficos para Met, Leu, His y Uracilo. Los paneles E (-Met), F (-Leu), G (-His) y H (Uracilo) representan 4 cajas de Petri con medio mínimo que fueron sembradas por goteo, por duplicado, a partir de diluciones seriadas de un inóculo fresco de BY4741 y BY4742, que va de la concentración 1×10^{-1} a 1×10^{-6} ; este intervalo está representado por una flecha. El panel E, en las filas e1 y e2 correspondientes al cultivo de la cepa BY4741 con el marcador $met15\Delta 0$ no presentan crecimiento, las filas e3 y e4 correspondientes a BY4742 (sin marcador auxotrófico para metionina) muestran un crecimiento normal. Los paneles F, G y H no presentan crecimiento, siendo ambas cepas

auxótrofas a Leu, His y Uracilo. Fotos tomadas a las 48 horas de crecimiento a una temperatura de 30°C.

9.2 Síntesis del *cassette URA3* amplificado con “*primers*” Yhc3ura_FWD y Yhc3ura_REV.

Tras el gradiente de temperatura realizado con la finalidad de encontrar la *T_M* ideal de los primers Yhc3ura_FWD y Yhc3ura_REV, la visualización del amplicón esperado de aproximadamente de 1 kb solo se logró en el carril 7 (**Figura 7**) a una temperatura de 58°C adicionando 1µl de cada “*primer*”. Los demás carriles no presentaron amplificación.

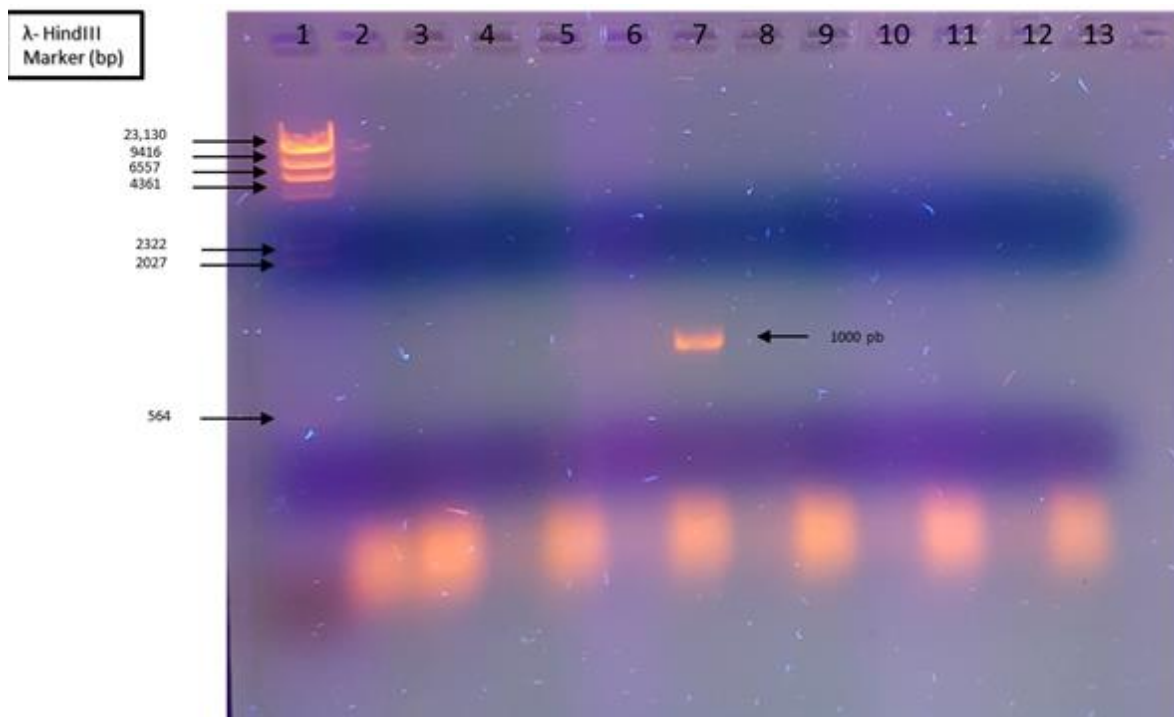


Figura 7. Gradiente de temperatura para la amplificación del *cassette URA3*. Carril 1, Marcador de peso molecular Lambda HindIII. Controles negativos en los carriles 4, 6, 8, 10 y 12. Carril 2 y 3, mix de PCR a 50°C. Carril 5, mix de PCR a 54°C. Carril 7, mix de PCR 58°C. Carril 9, mix de PCR a 62°C. Carril 11, mix de PCR a 68° C. Carril 13, mix de PCR A 70°C. Productos de PCR corridos en un gel de agarosa al 1% y revelado bajo luz UV en transiluminador.

9.3 Síntesis del *cassette URA3* y transfección en *S. cerevisiae*

Al haber encontrado la TM ideal de alineación para la amplificación del *cassette URA3*, se hicieron varias corridas de PCR con la finalidad de obtener una gran cantidad de producto y estandarizar la transfección según la concentración y calidad del *cassette*. En la **Figura 8**, se observa que todas las muestras sometidas al tratamiento generaron un producto de 1 kb correspondiente al tamaño del gen *URA3*. Al realizar la transfección y seleccionar positivamente las colonias crecidas en un medio SD-Ura, se hizo una prueba de PCR tiempo final para la confirmación de la disrupción de *BTN1*. El resultado demostró que las mutantes $\Delta Btn1-1$ y $\Delta Btn1-2$ (carriles 6-9, **Figura 9**) carecen por completo del gen *BTN1* respecto al control y la cepa parental BY4741 (carriles 2-5, **Figura 9**).

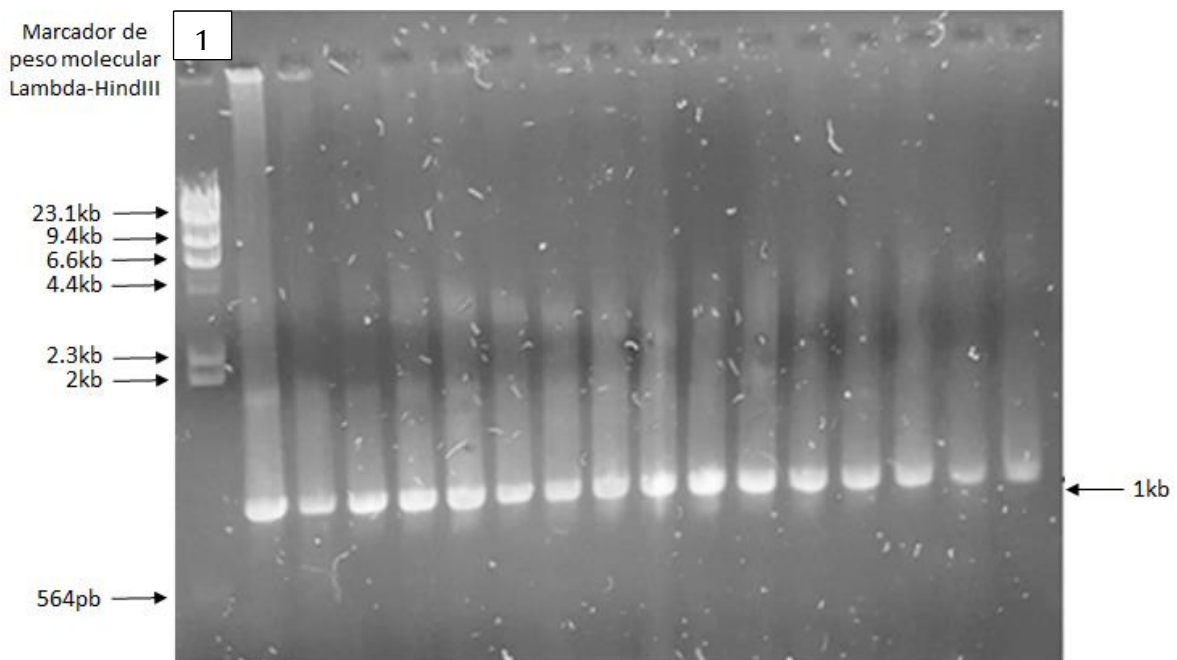


Figura 8. Amplificación del *cassette URA3*. Carril 1, marcador de peso molecular Lambda HindIII, los demás carriles contienen el producto de PCR A 58°C, obteniendo amplicones de 1kb que corresponden al *cassette URA3*. Gel de agarosa a 1% revelado bajo luz UV en el transiluminador.

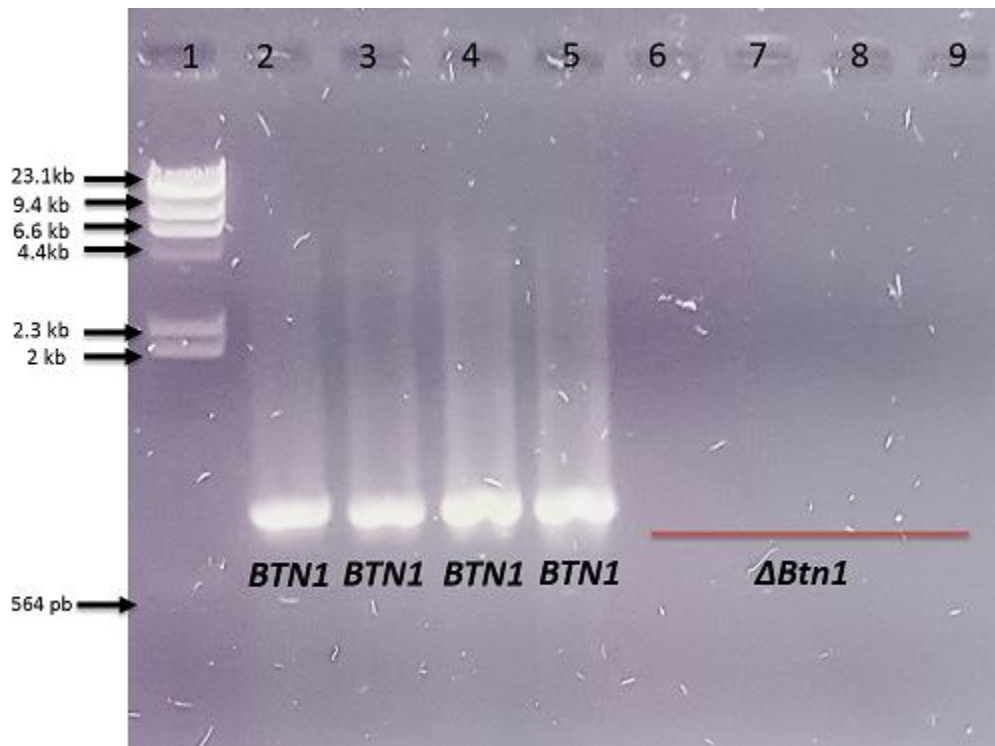


Figura 9. Resultados de PCR para confirmación de la recombinación homóloga de BTN1 por el cassette URA3. Carril 1 marcador de peso molecular Lambda HindIII. Carriles 2 y 3, producto de PCR con gDNA de levadura comercial (control positivo). Carriles 4 y 5, producto de PCR con gDNA de la cepa BY4741 (control positivo). Carriles 6 y 7, producto de PCR con gDNA de la mutante $\Delta Btn1-1$. Carriles 8 y 9, producto de PCR con gDNA de la mutante $\Delta Btn1-2$. Gel de agarosa al 1% revelado en luz UV en el transiluminador.

9.4 Resistencia al compuesto ANP y acidificación del medio

Pearce y colaboradores (1998) encontraron un fenotipo característico de la mutante que podía ser correlacionado con la severidad de la enfermedad de Batten. Dicho fenotipo denotaba un cambio en el pH celular, derivando en un desbalance electroquímico dentro de las células neuronales, específicamente en el los organelos designados para el desecho de metabolitos celulares. Los parámetros que se midieron en este estudio fue el cambio del pH celular respecto al medio de cultivo en mutantes $\Delta Btn1$ con un indicador colorimétrico y la resistencia al compuesto ANP, que se sugiere es un efecto secundario.

Midiendo la resistencia al compuesto ANP mediante un ensayo de dosis-respuesta (**Figura 10**) se identificó que la mutante $\Delta Btn1-1$ creció a una mayor concentración respecto al control y a la cepa parental, evidenciando que aquellas células que

carecen de *BTN1* crecerán hasta en una concentración de 4mg/ml mientras que la cepa parental en su estado silvestre mostrará un decaimiento en el crecimiento desde su cultivo a una concentración de 1mg/ml.

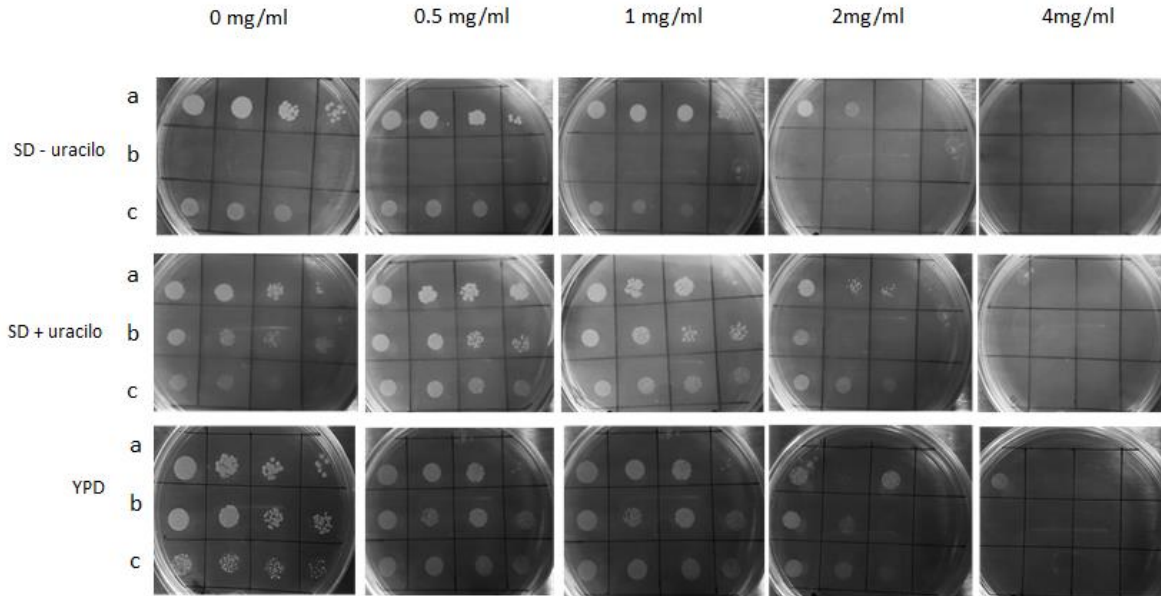


Figura 10. Experimento dosis-respuesta a ANP. Las cepas a) control, b) BY4741 y c) Δ -*btn1*, se cultivaron en medio líquido. Se realizaron cuatro diluciones 1) 1×10^{-1} , 2) 1×10^{-2} , 3) 1×10^{-3} y 4) 1×10^{-4} de las cuales se sembraron 10ul de cada una por goteo en medio SD sin uracilo, SD con uracilo y YPD respectivamente. Imágenes capturadas a las 48 horas de crecimiento a 30°C.

Respecto a la acidificación del medio y usando el indicador de pH púrpura de bromocresol, se encontró que la cepa mutante Δ *Btn1* tiene la capacidad de acidificar el medio en el que se encuentre cultivada, respecto a la cepa parental BY4741 (**Figura 11**). Esto sugiere que si existe un desbalance electroquímico dentro de la célula, por lo que es necesario que los protones salgan hacia el medio externo para evitar una subida en la acidificación que conlleve a la muerte de la célula. Esto puede traducirse que posiblemente *BTN1* actúe como un regulador del transporte de protones en la levadura.

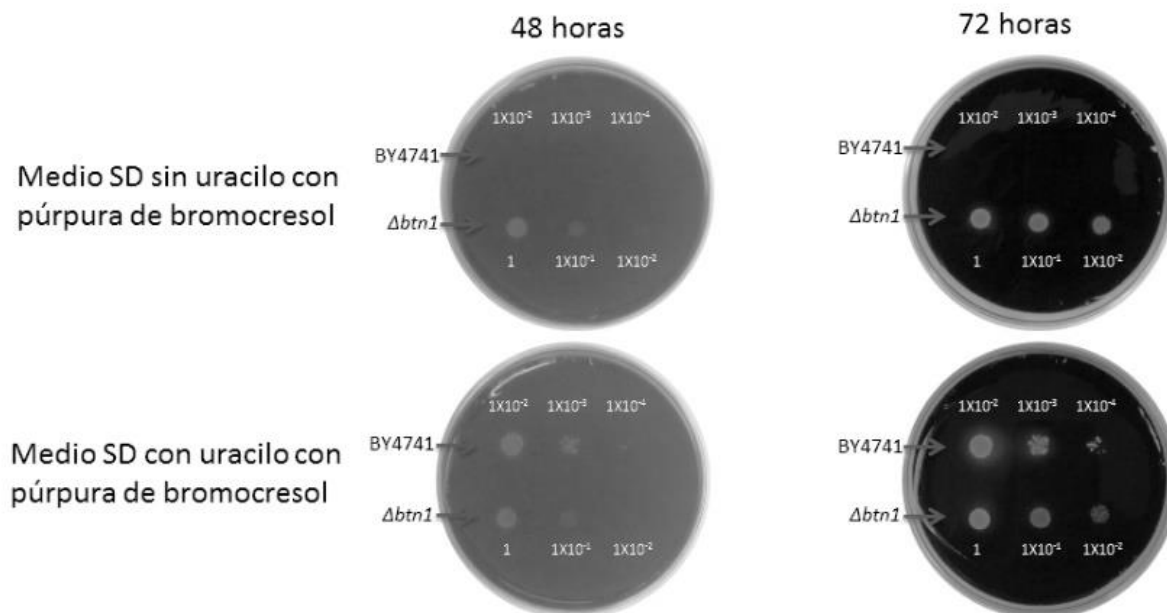


Figura 11. Acidificación del medio. La cepa Δ -btn1 presenta un halo mayor respecto al de la cepa parental. Imágenes tomadas a las 48 y 72 horas. Diluciones de 1×10^1 - 1×10^{-3} .

10. DISCUSIÓN

La Lipofuscinosis Neuronal Ceroidea Clásica Juvenil, también llamada enfermedad de Batten (EB), es una afección neurodegenerativa fatal de herencia autosómica recesiva que afecta a 1 de cada 12,500 infantes entre los 5 y 10 años de edad en los Estados Unidos de Norteamérica (Cotman SL, *et al.* 2012). El gen responsable de la EB es llamado *hCLN3* y puede presentar múltiples mutaciones que deriven en la enfermedad, pero en el 85% de los casos, se relaciona con una deleción de 1.02 kb, específicamente en los exones 7 y 8 (*cln3* ^{Δ ex7/8}) (Haines RL, *et al.* 2009). Esta mutación afecta el marco de lectura abierto y se traduce en una proteína trunca no funcional. El gen *hCLN3* silvestre codifica una proteína de membrana lisosomal

(CLN3p), de la cual su función biológica permanece desconocida (Padilla-López S, *et al.* 2012).

Dado que en la actualidad se sigue desconociendo la función biológica de BTN1, Pearce y colaboradores en 1998 realizaron una mutante *knockout* para el gen *BTN1* en levadura, describiendo así al menos 5 diferentes fenotipos (Guo WX, *et al.* 1999). Por la morfología que presenta y los estudios que revelan su posible función, se ha propuesto que la proteína BTN1 actúa como regulador de la homeostasis de protones dentro de los organelos destinados a desechar los metabolitos que la célula ya no requiere. Si la proteína BTN1 está mutada o no se encuentra en la membrana vacuolar, la célula optará por deshacerse de la acumulación de radicales H⁺, acidificando el medio donde se encuentre (Cárcel-Trullols J, *et al.* 2015).

La resistencia al compuesto ANP es un efecto secundario del incremento del pH celular y se correlaciona con la severidad de la enfermedad de Batten. Pearce y colaboradores (1998) haciendo experimentos de complementación con mutaciones puntuales de *CLN3* que derivan en EB en mutantes $\Delta Btn1$, demostraron que hay reversión parcial del fenotipo dependiendo de la mutación en *CLN3* y por lo tanto, diferentes grados en la severidad de la Enfermedad de Batten (Kama R, *et al.* 2011).

En nuestro método de validación de dicho modelo, nos enfocamos en la resistencia a ANP y la acidificación del medio, ya que sugerimos que BTN1 está ligada a la homeostasis vacuolar en *S. cerevisiae*. *BTN1* codifica una proteína de membrana de la vacuola que en condiciones de pH bajo incrementa su expresión y permite que las dos subunidades que conforman a las bombas V-ATPasa se acoplen entre sí y sea un complejo funcional. Se cree que a partir de que la levadura sensa el pH del medio, la V-ATPasa a partir de reguladores (como BTN1) incrementa o disminuye el intercambio iónico de la vacuola al lumen celular. En condiciones de pH bajo y cuando la proteína BTN1 se encuentra mutada, el pH vacuolar disminuye, resultando en una incapacidad para controlar el flujo de protones (**Figura 12**) (Taschner PE, *et al.* 1997).

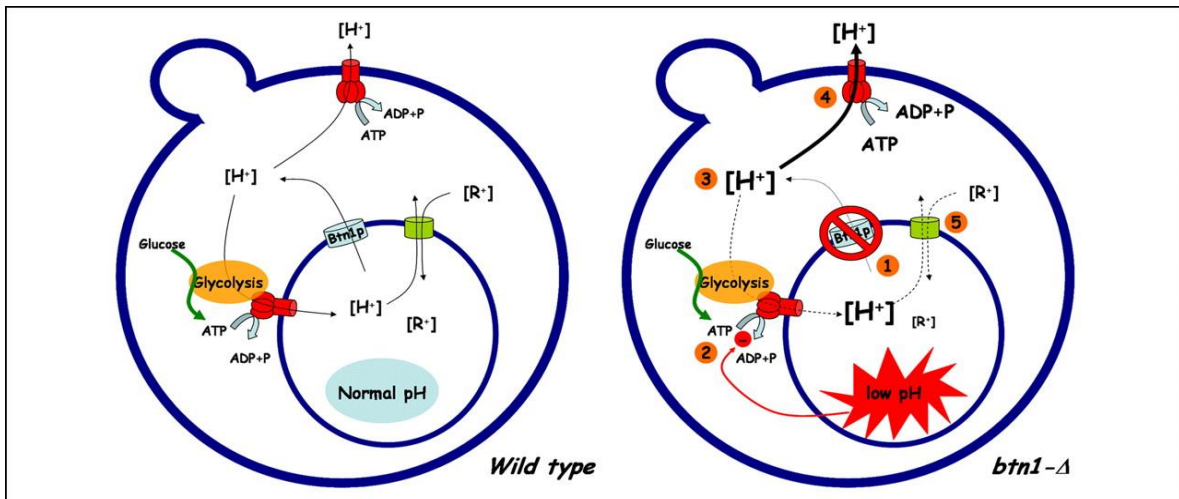


Figura 12. Posible función de BTN1 en la levadura *S. cerevisiae*. Al tener la morfología de un canal, Taschner y colaboradores (2005) proponen que la función de BTN1 en la vacuola es la regulación del flujo de protones en el organelo. Si la proteína de *BTN1* está mutada está ausente, de esta forma el flujo de protones acidificará la vacuola y en el intento de estabilizar su pH y por medios de bombas V-ATPasas, los protones saldrán al medio donde se encuentren.

Estos fenotipos fueron complementados totalmente al insertar el gen *CLN3* demostrando que ambos genes comparten la misma función. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Pearce *et. al.* (1998) y sientan las bases para determinar hasta que punto la mutación *hCLN3^{Δex7/8}* (85% de prevalencia en los casos de EB) puede complementar los fenotipos descritos para este modelo en levadura (Vidal-Donet JM, *et al.* 2013).

Hasta la fecha, no hay estudios de complementación en cepas $\Delta Btn1$ con la mutación más frecuente de EB (*hCLN3^{Δex7/8}*), por lo cual el modelo validado por nosotros, podría dar continuidad en la búsqueda de la función biológica de *BTN1/CLN3* y el desarrollo de tratamientos efectivos para la EB (Cotman SL, *et.al.* 2012).

11. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir lo siguiente:

- La cepa de levadura *S. cerevisiae knockout* para la proteína BTN1, efectivamente mostró un fenotipo característico que consideramos es compatible con la Enfermedad de Batten.
- La ausencia de BTN1 genera un desbalance que se refleja en la acidificación del medio así como en la resistencia a ANP.
- De esta forma, podemos concluir que BTN1 funciona como regulador del flujo de protones en la vacuola.
- Este trabajo sienta los fundamentos para realizar posteriores ensayos de complementación con la mutación más prevalente con la finalidad de determinar la función biológica de *CLN3*.

12. REFERENCIAS

- Cárcel-Trullols J, K. A. (2015). Cell biology of the NCL proteins: What they do and don't do. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2242-2255.
- Cotman SL, S. J. (2012). The juvenile Batten disease protein, CLN3, and its role in regulating anterograde and retrograde post-Golgi trafficking. *Clin Lipidol*, 7(1): 79-91.
- Dermaut B, N. K. (2005). Aberrant lysosomal carbohydrate storage accompanies endocytic defects and neurodegeneration in Drosophila benchwarmer. *Neuron*, 127-139.
- Gachet Y, C. S. (2005). btn1, Schizosaccharomyces pombe homologue of the human Batten Disease gene CLN3, regulates vacuole homeostasis. *Journal of Cell Science*, 5525-5536.
- Guo WX, M. C. (1999). A Disrupted Homologue of the Human CLN3 or Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Gene in Saccharomyces Cerevisia: A Model Study of Batten Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, Vol.19, No.5.
- Haines RL, C. S. (2009). The fission yeast model for the lysosomal storage disorder Batten disease predicts disease severity caused by mutations in CLN3. *Disease Model and Mechanisms*, 2(1-2):84-92.
- IEM Digest. (2008). The function of CLN3P, the Batten disease protein. *Molecular Genetics and Metabolism*, 269-274.
- Kama R, K. V. (2011). The yeast Batten disease orthologue Btn1 controls endosome-Golgi retrograde transport via SNARE assembly. *The Journal of Cell Biology*, 195(2):203-15.
- Narayan SB, R. D. (2006). CLN3P, the Batten's disease protein, is a novel palmitoyl-protein Delta-9 desaturase. *Annals of Neurology*, 60(5):570-7.
- Oetjen S, K. D. (2016). Revisiting the neuronal localization and trafficking of CLN3 in juvenile neuronal ceroid lipofuscinoses. *Journal of Neurochemistry*, 139(3):456-470.
- Osorio NS, C. A. (2007). Nitric Oxide Signaling Is Disrupted in the Yeast Model for Batten Disease. *Molecular Biology of the Cell*, 18(7): 2755-2767.
- Padilla-López S, L. D. (2012). BTN1, the Saccharomyces cerevisiae homolog to the human Batten disease gene, is involved in phospholipid distribution. *Disease Models & Mechanisms*, 5(2): 191-199.
- Pearce DA, N. S. (1999). Studies of pH regulation by Btn1p, the Yeast Homologue of Human Cln3p. *Molecular Genetics and Metabolism*, 320-323.
- Pearce DA, S. F. (1998). A yeast model of Batten Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12):6915-6918.
- Phillips SN, M. N. (2006). Characterizing pathogenic processes in Batten disease: Use of small eukaryotic model systems. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762, 906-919.

- Rakheja D, N. S. (2008). CLN3P, the Batten's disease protein. *Molecular Genetics And Metabolism*, 269-274.
- Taschner PE, d. V. (1997). Cross-species homology of the CLN3 gene. *Neuropediatrics* , 18-20.
- Vidal-Donet JM, C.-T. J. (2013). Alterations in ROS activity and lysosomal pH account for distinct patterns of macroautophagy in LINCL and JNCL fibroblasts. *PLoS One*, e55526.