

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências

**"Pesquisa Bioquímica e Molecular em Pacientes Brasileiros com Suspeita
de Lipofuscinose Ceróide Neuronal
formas Infantil, Infantil Tardia e Juvenil"**

Aluna: Marilyn Tsao

Orientador: Dr. Roberto Giugliani

Dissertação para obtenção do grau de Bacharel no
Curso de Ciências Biológicas Ênfase Molecular, Celular e Funcional

Porto Alegre, Janeiro de 2004

SUMÁRIO:

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 3 |
| 1.2 Subtipos Principais de NCL..... | 5 |
| 1.2.1 NCL forma Infantil..... | 5 |
| 1.2.2 NCL forma Infantil Tardia..... | 5 |
| 1.2.3 NCL forma Juvenil..... | 6 |
| 1.3 OBJETIVOS..... | 6 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 8 |
| 2.1 Análise Bioquímica..... | 8 |
| 2.1.1 Proteína Palmitoil Tioesterase1..... | 9 |
| 2.1.2 Tripeptidil Peptidase 1..... | 9 |
| 2.2 Análise Molecular..... | 9 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 11 |
| 3.1 Análise Bioquímica..... | 11 |
| 3.2 Análise Molecular..... | 12 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 15 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 16 |

1. INTRODUÇÃO

As características clínicas e patológicas de um grupo de doenças conhecidas como Lipofuscinose Ceróide Neuronal (NCL) foram primeiramente descrita por Stengel em 1826.

O termo Lipofuscinose Ceróide Neuronal foi proposto por Zeman e Dyken em 1969 para diferenciar as NCL das Idiotias Amauróticas Familiares e das Gangliosidoses¹; contituem-se em erros inatos do metabolismo e fazem parte das doenças lisossômicas de depósito (DLD). Esse grupo de doenças caracteriza-se pela presença de depósitos lisossomais em células neuronais e não-neuronais de lipopigmento autofluorescente ceróide e de lipofuscina. Os bioquímicos acreditavam que o depósito acumulado tratava-se de um esfingolípido como encontrado nas DLDs. A grande virada ocorreu quando se descobriu, no modelo animal, que a substância acumulada não era um lipídeo, e sim uma proteína². A natureza do depósito era composta da subunidade c da ATP sintase mitocondrial e saposinas A e D³. São consideradas doenças genéticas de caráter autossômico recessivo, salvo a forma de início adulto que pode ser autossômica recessiva ou dominante. A freqüência de todas as formas encontrada na população é de 0,1 a 1:100.000 nascimentos⁹.

Existem quatro subtipos principais de NCL, que variam de acordo com a idade de início do quadro clínico, que são as formas: Infantil (INCL), Infantil Tardia (LINCL), Juvenil (JNCL) e Adulto (ANCL). Além destas formas principais, existem variantes da forma INCL: variante finlandesa (fLINCL), variante turca (tLINCL), variante cigana/hindu (vLINCL), e a Northern Epilepsy, recentemente reconhecida como uma nova variante de NCL⁶. Atualmente existem oito genes envolvidos nas NCLs (Tabela 1).

Tabela 1: Subtipos de NCL, genes e proteínas relacionados.

| Tipo | Gene | Proteína |
|------------------------|-------------|----------------------------------|
| INCL | <i>CLN1</i> | Proteína Palmitoil Tioesterase 1 |
| LINCL | <i>CLN2</i> | Tripeptidil Peptidase 1 |
| JNCL | <i>CLN3</i> | Desconhecida |
| ANCL | <i>CLN4</i> | Desconhecida |
| FLINCL | <i>CLN5</i> | Desconhecida |
| vLINCL | <i>CLN6</i> | Desconhecida |
| tLINCL | <i>CLN7</i> | Desconhecida |
| Northern epilepsy (NE) | <i>CLN8</i> | Desconhecida |

Os achados da análise histopatológica pela microscopia eletrônica (ME) são considerados padrão ouro para o diagnóstico, ou seja, melhor método para diagnóstico nesta doença. Este padrão ouro, associados com os dados clínicos, eles são os únicos marcadores biológicos para o diagnóstico destas condições. Assim, cada forma possui inclusões lisossomais características, podendo ser observadas pela análise ultraestrutural à ME (Tabela 2).

Os achados ultraestruturais principais podem ser classificados da seguinte maneira:

- 1) Depósitos Granulares Osmiofílicos (GRODS): são corpos circulares com aspecto granular. O achado de GRODS, isolados exclusivos constitui o diagnóstico característico das NCLs causadas por mutações no gene *CLN1*.
- 2) Corpos Curvilíneos (CV): possuem estrutura lamelar, constituídos por linhas escuras e claras intercaladas. Os CV são predominantemente encontrados na LINCL (mutações no gene *CLN2*) e menos comumente em outros tipos de NCL.
- 3) Corpos Retilíneos (RL): são constituídos por uma pilha oligolamelar, com uma conformação predominantemente reta. Podem ser encontradas nas formas relacionadas com os genes *CLN3*, *CLN5*, *CLN6* e *CLN7*.
- 4) Corpos Digitiformes (FP): são compostos por linhas paralelas dispostas aos pares, lembrando uma marca de impressão digital. Este achado está presente principalmente na JNCL (mutações no gene *CLN3*), mas também em variantes de LINCL relacionadas com os genes *CLN5* e *CLN7*.
- 5) FP mistos, CV e Complexos RL associados (Misto): esta forma de depósito pode ocorrer simultaneamente numa mesma estrutura. Geralmente relacionadas com alterações nos genes *CLN3*, *CLN5* e *CLN6*.

Tabela 2: Tipo de deposição em relação ao gene mutado

| Gene | Histologia Ultra estrutural | Linfócitos |
|-------------|-----------------------------|------------|
| <i>CLN1</i> | GROD | |
| <i>CLN2</i> | CV / Misto | |
| <i>CLN3</i> | FP ou Misto ou RL | vacuolado |
| <i>CLN4</i> | Misto | |
| <i>CLN5</i> | RL, FP ou Misto | |
| <i>CLN6</i> | CV, FP, RL | |
| <i>CLN7</i> | FP ou Misto ou RL | |
| <i>CLN8</i> | CV ou GROD | |

1.2 Subtipos Principais de NCL

1.2.1 NCL forma Infantil

As manifestações clínicas da INCL são mais freqüentes na população finlandesa, onde a incidência é de 1:20.000⁷ sendo a doença prevalente⁶.

Esta forma caracteriza-se pelo início do quadro clínico entre 6 meses e 2 ano de idade⁶. Os primeiros sinais clínicos são hipotonia muscular, irritabilidade e perda de visão, assim como a microcefalia. Entre os 12 e 20 meses de idade, ocorre rápida deterioração neurológica⁷. A expectativa de vida varia de 2 a mais de 53 anos.

A inclusão lisossomal caracterizada na histopatologia é a presença de GRODS. O gene responsável por esta forma é o *CLN1*, localizada no cromossomo 1p32, que codifica a proteína palmitoil tioesterase 1 (PPT1)⁸. Mais de 38 mutações diferentes foram encontradas no gene *CLN1*⁵. Dependendo da mutação que o paciente porta no gene *CLN1*, apresentará diferentes fenótipos⁵.

Os indivíduos que apresentam a doença relacionada ao gene *CLN1* apresentam deficiência da PPT1. O diagnóstico é feito pela histopatologia, podendo ser auxiliada pelo ensaio enzimático da atividade da enzima PPT1.

1.2.2 NCL forma Infantil Tardia

A forma clássica de LINCL mostra-se mais comum nas populações do norte da Europa do que em outras populações. A incidência desta forma na Alemanha é de 0,46:100.000 nascimentos e na Itália é de 0,36:100.000 nascimentos²⁰.

Nesta forma os pacientes apresentam o quadro clínico entre 2 e 4 anos de idade. Os sinais clínicos são caracterizados pelo processo neurodegenerativo resultando em perda de visão, regressão mental, mudanças no comportamento, descoordenação dos movimentos e morte precoce¹¹. Esta ocorre entre os 10 e 15 anos de idade⁶.

A análise histológica do material armazenado pela microscopia eletrônica tem os corpos curvilíneos (CV) como as inclusões características. O gene *CLN2* localiza-se no cromossomo 11p15 e codifica a enzima tripeptidil peptidase 1 (TPP1). Mais de 40 mutações são conhecidas⁵. Assim, como a NCL forma Infantil, o diagnóstico é realizado pela microscopia eletrônica da biópsia de pele. Como existe uma enzima relacionada com o gene em questão, o diagnóstico pode ser auxiliado pela dosagem enzimática da TPP1.

1.2.3 NCL forma Juvenil

Estima-se que a incidência desta forma seja de 1/25.000 nascimentos, com aumento da prevalência nas populações do norte da Europa¹⁹.

O quadro clínico inicia-se entre os 4 e 7 anos de idade. Os sintomas são perda de visão, crise convulsiva, deterioração psicomotora levando ao estado vegetativo e morte prematura na terceira década¹².

Para o diagnóstico histopatológico, a inclusão predominantemente encontrada nesta forma são os corpos digitiformes. O gene *CLN3* está localizado no cromossomo 16p12.1 e a função da enzima codificada ainda não é conhecida⁵. Por este motivo se realiza a análise molecular. Acredita-se que, pela seqüência de aminoácidos, se trata de uma proteína transmembrana. Existem mais de 25 mutações descritas⁵, sendo que uma deleção de 1,02 kb é a mutação comum. Esta deleção remove os éxons 7 e 8 do gene e está presente em aproximadamente 85% dos casos de JNCL⁹. Outra característica marcante desta forma é a presença de linfócitos vacuolados no esfregaço de sangue periférico¹⁰.

1.3 Objetivos

Este trabalho teve como objetivos estabelecer técnicas para auxílio do diagnóstico de NCL nas formas:

- a) Infantil: padronizar a técnica para dosagem da atividade da Proteína Palmitoil Tioesterase 1 (PPT1), visto que o gene relacionado com esta forma, o *CLN1*, codifica a proteína PPT1.
- b) Infantil Tardia: padronizar a técnica para dosagem enzimática da enzima Tripeptidil Peptidase 1 (TPP1); o gene *CLN2* codifica esta enzima.
- c) Juvenil: estabelecer a PCR alelo-específico para a deleção de 1,02kb no gene *CLN3*, uma vez que essa deva ser a mutação mais comum em nossa população.
- d) introduzir estas técnicas na rotina do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo no Serviço de Genética Médica, para a assistência ao diagnóstico clínico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

O material utilizado para este estudo consistiu em 18 pacientes e familiares com suspeita clínica de Lipofuscinose Ceróide Neuronal das três formas, provenientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Destes, 13 tiveram leucócitos extraídos de sangue periférico e 8 tiveram DNA. Foram colhidos sangue periférico para obtenção de leucócitos, para a análise bioquímica e para extração de DNA, para análise molecular.

Para controle da análise bioquímica, utilizou-se amostra de sangue de doadores (não identificados) do banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Seguiu-se o seguinte protocolo: suspeita clínica de NCL seguindo para coleta de biópsia de pele para análise por microscopia eletrônica. Sendo positivo para NCL, encaminhou-se para as dosagens enzimáticas de PPT1, TPP1 e pesquisa da deleção no gene *CLN3* (Figura 1).

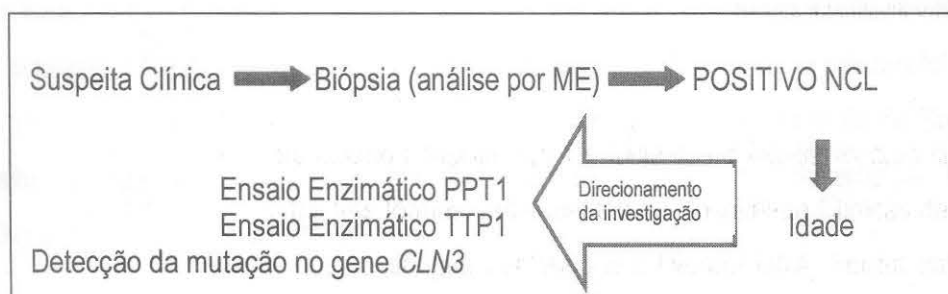


Figura 1: Fluxograma para inserção de pesquisa para NCL

2.1 Análise Bioquímica

Utilizou-se leucócitos extraídos a partir de 10 mL de sangue periférico em heparina. Os leucócitos foram diluídos em água destilada e sonificados. Foi medida a quantidade de proteína pelo método de Lowry¹³. As amostras foram armazenadas à temperatura de -20°C . Os valores de referência foram padronizados segundo a atividade enzimática dos controles. Para PPT1 utilizou-se 21 controles e para a TPP1, 23 controles.

2.1.1 Proteína Palmitoil-tioesterase 1

Foram utilizados 20 μ L das amostras dos pacientes e controles numa concentração de 30 μ g de proteína. Adicionou-se 40 μ L de substrato 0,64mM 4-methylumbelliferyl-6-thiopalmitoyl β -D-glucoside (Moscerdam) e a mistura incubada a 37°C por 1 hora. Para parar a reação utilizou-se 400 μ L de Tampão 0,5M Bicarbonato de Sódio / Carbonato de Sódio pH 10,7 + 0,025% de Triton X-100. A leitura foi feita em espectrofluorômetro em comprimento de onda 450 nm de emissão e 365 nm de excitação. O resultado foi expresso em nanomol/h/mg prot^{18,19}.

2.1.2 Tripeptidil Peptidase 1

Foram utilizados 7 μ L das amostras dos pacientes e controles numa concentração de 1,5 mg/mL. Adicionou-se 93 μ L de EDTA/Acetato/Triton (40mM EDTA em 50mM Acetato pH 4,0 contendo 0,1% Triton) e 100 μ L de substrato 500 μ M Ala-Ala-Phe-7-amido-4-methylcoumarin (Sigma). A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C. Para parar a reação utilizou-se 1 mL de Tampão 0,1M Cloroacetato de Sódio pH 4,3. A leitura foi feita em espectrofluorômetro em comprimento de onda 450 nm de emissão e 365 nm de excitação. O resultado foi expresso em nanomol/h/mg prot¹⁷.

2.2 Análise Molecular

Foi realizada a extração de DNA a partir de sangue periférico em EDTA utilizando o método de precipitação por sais¹⁴. O DNA foi conservado em uma solução de Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM pH 7,5 e EDTA 1mM pH 8,0) à temperatura de - 20°C.

A quantificação do DNA foi realizada num espectrofotômetro que mede em UV. As amostras foram diluídas para obter-se uma concentração de 40ng/ μ L.

Seguiu-se com a identificação direta da deleção pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) alelo-específica. Em cada tubo foram utilizados: 2 mM de dNTP (Sigma), 2,5 de Tampão Gibco, 50mM de MgCl₂, 5U/ μ L de DNA Taq polimerase, 20pmóis de *primers* específicos que foram desenhados para o fragmento a ser amplificado, em um volume final de 50 μ L. A seqüência dos primers foi descrita por

Taschner *et al.*¹⁶. A seqüência dos primers são: 2.3LR3 (5'-GGGGGAGGACAAGCACTG-3'), 2.3IntF7 (5'CATTCTGTCACCCTTAGAAGCC-3') e CLN3 mut756R (5'-GGACTTGAAGGACGGAGTCT-3'). O primer 2.3INTF7 anela na fita de DNA numa região anterior à deleção. O primer 2.3LR3 identifica a fita de DNA sem a deleção, ou seja, ela anela numa região entre os éxons 7 e 8, resultando num fragmento de 729 bp. Já o primer CLN3mut756R, que identifica a deleção, anela antes e depois da deleção, num único segmento, formando um fragmento de 426 bp (Figura 2).

Utilizou-se um programa com desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguindo por 35 ciclos de amplificação, com 1 minuto de desnaturação a 94°C, 2 minutos de anelamento a 56°C e 1 minuto de extensão a 72°C, com extensão final de 72°C por 10 minutos.

As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5% coradas com brometo de etídio e visualizadas em luz UV.

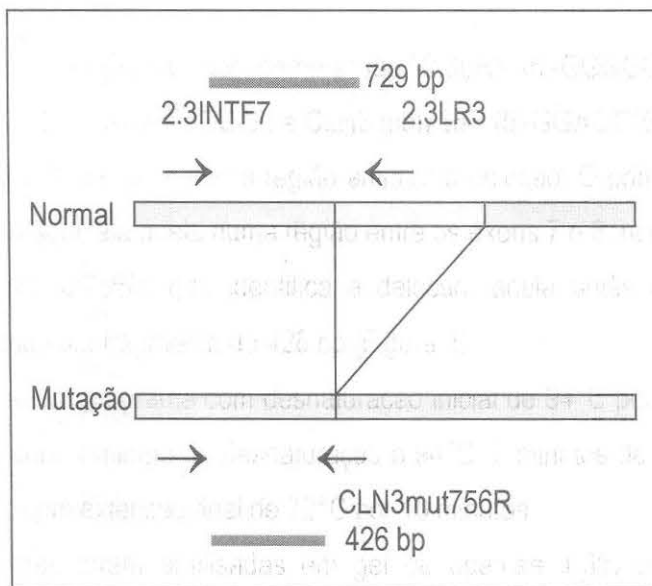


Figura 2: Esquema do anelamento dos primers e tamanho dos fragmentos

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi colhida a biópsia de pele e enviada para a análise histopatológica (Tabela 3). A análise histopatológica da biópsia de pele foi realizada em Portugal. Os pacientes foram inicialmente incluídos nas diferentes formas pela idade de início dos sinais clínicos.

Tabela 3: Análise Histopatológica

| Paciente | Resultado da Biópsia de pele | NCL Suspeita (idade) |
|----------|------------------------------|----------------------|
| P1 | Aguardando | INCL |
| P2 | Aguardando | LINCL |
| P3 | Corpos Retilíneos | INCL |
| P4 | Fingerprints bodies | INCL |
| P5 | Fingerprints bodies | INCL |
| P6 | Corpos Curvilíneos | LINCL |
| P7 | Fingerprints bodies | INCL |
| P8 | Aguardando | INCL |
| P9 | Aguardando | JNCL |
| P10 | Aguardando | INCL |
| P11 | Fingerprints bodies | INCL / LINCL |
| P12 | Aguardando | INCL |
| P13 | Aguardando | INCL |
| P14 | Corpos Curvilíneos | LINCL |
| P15 | Aguardando | INCL |
| P16 | Fingerprints bodies | LINCL |
| P17 | Aguardando | JNCL |
| P18 | GRODS + Fingerprints bodies | JNCL |

3.1 Análise Bioquímica

Os resultados alcançados pela análise bioquímica da atividade das enzimas Proteína Palmitoil Tioesterase 1 (PPT1) e Tripeptidil Peptidase 1 (TPP1) obtidos de amostra de sangue de 13 pacientes são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Valores da atividade enzimática

| Paciente | PPT1 (19-104*) | TPP1 (93-521*) | Suspeita clínica |
|----------|----------------|----------------|------------------|
| P1 | 32 | 179 | INCL |
| P3 | 75 | 297 | INCL |
| P4 | 74 | 426 | INCL |
| P5 | 32 | 264 | INCL |
| P6 | 92 | 35 | LINCL |
| P9 | 65 | 227 | JNCL |
| P10 | 48 | 174 | INCL |
| P11 | 55 | 339 | INCL / LINCL |
| P12 | 123 | 256 | INCL |
| P13 | 30 | 309 | INCL |
| P14 | 19 | 158 | LINCL |
| P15 | 26 | 91 | INCL |
| P16 | 37 | 223 | LINCL |

* unidade de referência: nanomol/h/mg prot

Os resultados obtidos pela análise bioquímica da PPT1 mostram que os pacientes não apresentam alterações significativas, não se tratando de NCL.

Contudo a análise bioquímica da TPP1 para o paciente P6 indicou atividade diminuída, sugerindo que se trata de um caso de NCL forma Infantil Tardia, corroborando com os resultados da análise histopatológica. Os demais pacientes analisados devem se enquadrar em outro erro inato do metabolismo, que não as NCLs.

4.2 Análise Molecular

Os resultados obtidos pela análise molecular apresentam-se na tabela 5. Foram investigados 8 pacientes para a deleção (Figura 3).

Tabela 5: Detecção da deleção nos alelos

| Paciente | Deleção no gene <i>CLN3</i> | Suspeita Clínica |
|----------|-----------------------------|------------------|
| P6 | -/- | LINCL |
| P8 | -/- | INCL |
| P9 | -/- | JNCL |
| P14 | +/- | LINCL |
| P15 | -/- | INCL |
| P16 | -/- | LINCL |
| P17 | -/- | JNCL |
| P18 | -/- | JNCL |

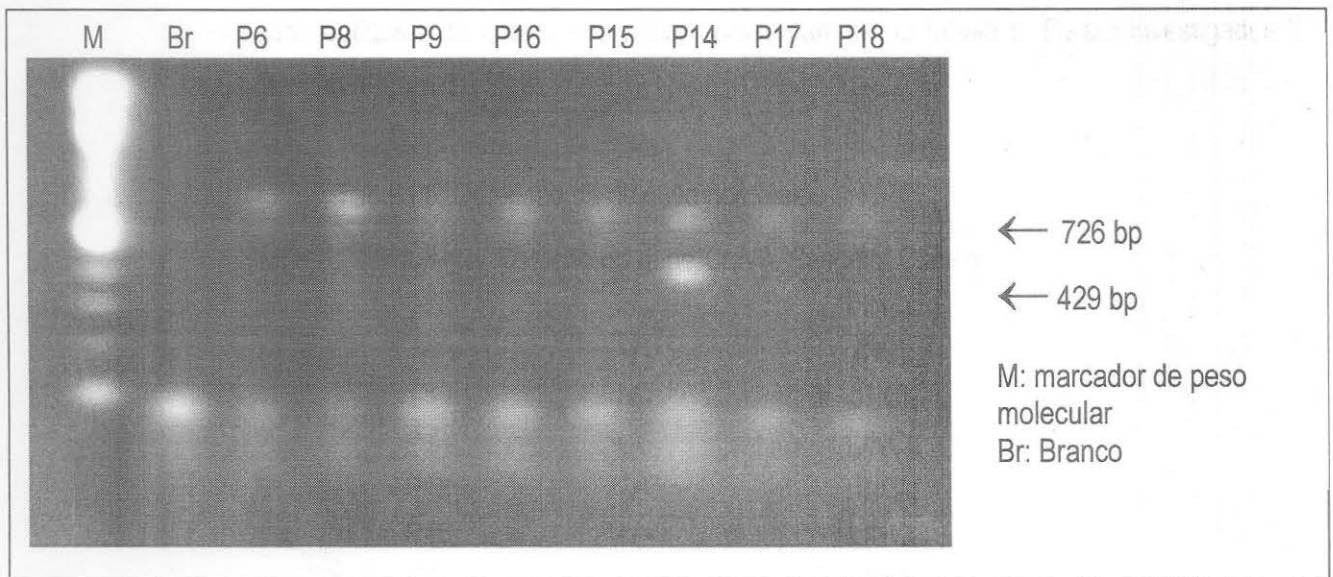


Figura 3: Foto da análise da deleção no gene *CLN3* por PCR dos pacientes estudados

A frequência da deleção no gene *CLN3* foi estudada apenas em populações do norte da Europa e dos Estados Unidos da América, não havendo dados para a frequência no Brasil.

O P14 é heterozigoto para a deleção, podendo apresentar outra mutação no outro alelo, dado não analisado neste estudo. Pode-se suspeitar que seja um caso de heterozigoto composto ou que possa ser um caso de uma forma mais grave e severa manifestando-se precocemente, pois deve haver outra mutação que explique o quadro clínico. Já que a suspeita diagnóstica com base na idade de início dos sinais clínicos deste paciente não se relaciona com a JNCL.

4. CONCLUSÃO

A análise bioquímica da enzima PPT1, deste estudo, necessita ser validada com pacientes confirmados pela análise histopatológica e molecular de mutações no gene *CLN1*. Para confirmação os resultados obtidos neste estudo.

A dosagem da TPP1, mostra-se confiável, pois o P6 confirma a suspeita clínica e apóia com os resultados obtidos pela análise histopatológica.

As perspectivas para este trabalho são utilizar as técnicas padronizadas como métodos não-invasivos para detecção de Lipofuscinose Ceróide Neuronal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) **Goebel HH, Mole SE and Lake BD.** *Introduction.* In: Goebel HH et al. (Eds): *The Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (Batten Disease)* 1st ed. IOS Press Amsterdam. 1999. Pg 1 – 4.
- 2) **Palmer DN, Barns G, Husbands DR and Jolly RD.** *Ceroid Lipofuscinosis in sheep. II. The major component of the lipopigment in liver, kidney, pancreas and brain is low weight protein.* J. Biol. Chem 1986, 261:1773 – 1777.
- 3) **Mitchison HM and Mole SE.** *Neurodegenerative disease: the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease).* Current Opinion in Neurology 2001, 14:795 – 803.
- 4) **Elleder BD, Lake DB, Goebel HH, Rapola J, Haltia M and Carpenter S.** *Definitions of the Ultrastructural patterns found in NCL.* In: Goebel HH et al (eds): *The Neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten Disease)* 1st ed. IOS Press. Amsterdam 1999. Pg 5-7.
- 5) **Wisniewski, KE.** *Neuronal Ceroid-Lipofuscinoses.* Gene Reviews formerly GENEclinics. 2001.
- 6) **Hofmann SL and Peltonen L.** *The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses.* In: Scriver CR et al (eds) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease.* 8th ed. Mc Graw Hill Companies 2001. Pg 3877 – 3896.
- 7) **Santavuori P, Vanhanen S-L, Sainio K, Nieminen M, Wallden T, Launes J and Raininko R.** *Infantile Neuronal Ceroid-lipofuscinosis (INCL): Diagnostic Criteria.* J. Inher. Metab. Dis. 1993, 16:227 – 229.
- 8) **Mitchison HM, Hofmann SL, Becerra CHR, Munroe PB, Lake BD, Crow YJ, Stephenson JBP, Williams, RE, Hofman IL, Taschner PEM, Martin J-J, Philippart M, Andermann E, Anderman F, Mole SE, Gardiner RM and Rawe AMO.** *Mutations in palmitoyl-protein thioesterase gene (PPT; CLN1) causing juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis with granular osmiophilic deposits.* Human Molecular Genetics, 1998, Vol. 7, No. 2, 291 – 297.
- 9) **Mole SE, Mitchison HM and Munroe PB.** *Molecular Basis of the Neuronal Ceroid Lipofuscinoses: Mutations in CLN1, CLN2, CLN3, and CLN5.* Human Mutation, 1999, 14:199 – 215.
- 10) **Ikeda K and Goebel HH.** *Ultrastructural Pathology of Lymphocytes in Neuronal Ceroid-Lipofuscinoses.* Brain Dev 1979, 4:285 – 292.

- 11) **Steinfeld R, Heim P, Gregory HV, Meyer K, Ullrich K, Goebel HH and Kohlshütter A.** *Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis: Quantitative Description of the Clinical Course in Patients with CLN2 Mutations.* American Journal of Medical Genetics 2002, 112:347 – 354.
- 12) **Janes RW, Munroe PB, Mitchison HM, Gardiner RM, Mole SE and Wallace BA.** *A model for Batten disease protein CLN3: Functional implications from homology and mutations.* FEBS Letters 1996, 399:75 – 77.
- 13) **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ.** *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J. Biol. Chem. 1951, 193:265 – 275.
- 13) **Miller AS, Dykes DD and Polesky HF.** *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.* Nucleic Acids Res 1988;16(7):1215.
- 14) **Munroe PB, Mitchison HM, O'Rawe AM, Anderson JW, Boustany R-M, Lerner TJ, Taschner PEM, Vos ND, Breuning MH, Gardiner RM and Mole SE.** *Spectrum of Mutations in the Batten Disease Gene, CLN3.* Am. J. Hum. Genet. 1997, 61:310 – 316.
- 15) **Tashner PEM, Vos, ND and Breuning MH.** *Rapid detection of the major deletion in the Batten disease gene CLN3 by allele specific PCR.* J. Med Genet 1997, 34:955 – 956.
- 16) **Diggelen OPV, Keulemans JLM, Winchester B, Hofman IL, Vanhanen SL, Santavouri P and Voznyi YV.** *A Rapid Fluorogenic Palmitoyl-Protein Thioesterase Assay: Pre and Postnatal Diagnosis of INCL.* Molecular Genetics and Metabolism 1999, 66:240 – 244.
- 17) **Vines DJ and Warburton MJ.** *Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl peptidase 1.* FEBS Letters 1999 443:131 – 135.
- 18) **Vines D and Warburton MJ.** *Purification and characterization of a tripeptidyl aminopeptidase I from rat spleen.* Biochimia et Biophysica Acta 1998 1384:233-242.
- 19) **The International Batten Disease Consortium.** *Isolation of a Novel Gene Underlying Batten Disease, CLN3.* Cell, 1995, Vol. 82, 949 – 957.
- 20) **Williams, RE, Gottlob I, Lake BD, Goebel HH, Winchester BG and Wheeler RB.** *CLN2 Clasic Late Infantile NCL.* In: Goebel HH et al. (Eds): *The Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (Batten Disease)* 1st ed. IOS Press Amsterdam, 1999. Pg 1 – 4.