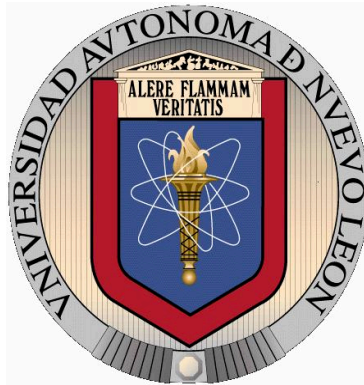


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN *pitx3*
MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE UN GEN REPORTERO EN
NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENCEFÁLICAS**

PRESENTA

Q.B.P. LAURA MIREYA ZAVALA FLORES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN TERMINAL EN MORFOLOGÍA**

ENERO 2011

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN *pitx3* MEDIANTE
LA EXPRESIÓN DE UN GEN REPORTERO EN NEURONAS
DOPAMINÉRGICAS MESENFÁLICAS**

Presenta

Q.B.P. LAURA MIREYA ZAVALA FLORES

Como requisito parcial para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Con orientación terminal en Morfología

Enero 2011

**"ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN PITX3 MEDIANTE LA
EXPRESIÓN DE UN REPORTERO EN NEURONAS
DOPAMINÉRGICAS MESENFÁLICAS"**

Aprobación de la Tesis:



DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS

Director de Tesis



DR. DANIEL MARTÍNEZ FONG

Co-Director de Tesis



DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA

Co-Director de Tesis



DR. JULIO SÉPULVEDA SAAVEDRA

Comisión de Tesis



DR. NORBERTO LÓPEZ SERNA

Comisión de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN PITX3 MEDIANTE LA EXPRESIÓN
DE UN GEN REPORTERO EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENCEFÁLICAS**

Presentado por:

Q.B.P. Laura Mireya Zavala Flores

Este trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la co-dirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y el Dr. Daniel Martínez Fong del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, México, D.F.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
Lista de tablas	i
Lista de figuras	ii
Lista de abreviaturas	iii
Resumen	v
Capítulo I Introducción	12
1.1 Neuronas Dopaminérgicas Mesencefálicas	13
1.2 Pitx3	14
1.3 Expresión génica en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas	15
1.4 Sistemas de transferencia de genes	16
1.5 NT-poliplex	17
1.6 Direccionamiento nuclear del DNA	18
1.7 Neurotensina	18
1.8 Relación de la NT con el sistema dopaminérgico	20
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
Capítulo II Materiales y Métodos	23
2.1 Estrategia experimental	24
2.2 Material y Equipo	25
2.3 Metodología	28
2.3.1 Construcción de los vectores recombinantes conteniendo el gen reportero GFP bajo la regulación de las diferentes versiones del promotor del gen <i>pitx3</i>	28
2.3.2 Evaluación de la actividad promotora de las diferentes versiones del promotor Pitx3 en una línea celular de neuroblastoma	30
2.3.3 Evaluación de la capacidad de las diferentes versiones promotoras para dirigir la expresión de la GFP en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas	34

Capítulo III Resultados	37
3.1 Obtención de los vectores recombinantes conteniendo el gen reportero GFP bajo la regulación de las diferentes regiones promotoras del gen <i>pitx3</i>	38
3.2 Expresión de la GFP dirigida por el promotor de 0.6 Kb del gen <i>pitx3</i> En una línea celular de neuroblastoma	43
3.3 Transfección in vivo mediante el NT-poliplex para evaluar la actividad promotora de las diferentes versiones del promotor Pitx3	46
Capítulo IV Discusión	49
Capítulo V Conclusiones	54
Perspectivas	56
Capítulo VI Bibliografía	57
Anexos	66

Lista de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos de secuencia para los genes <i>th</i> , <i>dat</i> , <i>nurr1</i> y <i>pitx3</i>	21
Tabla 2. Reactivos utilizados para el PCR utilizando cDNA como templado	21
Tabla 3. Programación del termociclador para amplificar los genes deseados	22

Lista de figuras

Figura 1. Caracterización de plásmidos pPitx3-Cre y pGreenLantern-1	27
Figura 2. Clonación del fragmento de 4.2 Kb	28
Figura 3. Caracterización del vector pPitx3_4.2Kb-GFP después de la eliminación del promotor CMV	29
Figura 4. Caracterización del vector pPitx3_5.2kb-GFP	30
Figura 5. Caracterización de los vectores pPitx3_1.7Kb-GFP y pPitx3_0.6Kb-GFP	31
Figura 6. Expresión de la GFP en células N1E-115	33
Figura 7. Expresión de TH y Nurr1 en células N1E-115	34
Figura 8. Expresión de mRNA de TH y Nurr1 en células N1E-115	34
Figura 9. Determinación de la concentración óptima de PK	35
Figura 10. Determinación de la relación molar óptima del acarreador para pPitx3_4.2Kb-GFP	36
Figura 11. Ausencia de actividad promotora de la secuencia de 4.2 Kb del gen pitx3 en neuronas dopaminérgicas de la SN	37

Lista de abreviaturas

DNA [*]	ácido desoxirribonucleico
cDNA [*]	ácido desoxirribonucleico complementario
RNA [*]	ácido ribonucleico
APTES	(3-Aminopropil)triétoxissilano
AP	anterior posterior
bp [*]	pares de bases
°C	grados Celsius
CO ₂	dióxido de carbono
CMV	Citomegalovirus
DAT [*]	Transportador de Dopamina
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenilindol
DMEM [*]	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	desoxirribonucleósidos trifosfato
DV	dorso ventral
EDTA [*]	ácido etilendiaminotetracético
FITC [*]	isotiocianato de fluoresceína
GFP [*]	proteína verde fluorescente
H ₂ O	agua
Kb	kilobases
LB	Luria Bertani
LC-SPDP	Succinimidil 6-(3'-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato
lbs	libras

MgCl ₂	cloruro de magnesio
ML	medio lateral
mL	mililitros
μL	microlitros
μg	microgramos
NaOH	hidróxido de sodio
ng	nanogramos
NT	Neurotensina
PBS*	Buffer salino de fosfatos
PFA	Paraformaldehído
PK	péptido cariofílico
PLL	poli-L-lisina
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR*	Transcriptasa reversa-Reacción en cadena de la polimerasa
SDS*	dodecilsulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SN	Sustancia negra
TH	tirosina hidroxilasa
TRITC*	trimetil isotiocianato de rodamina
U	unidades
UV	luz ultravioleta
VTA*	Área ventral tegmental

*Por sus siglas en inglés

Resumen

Laura Mireya Zavala Flores
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Enero 2011

Título de tesis: ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN *pitx3* MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE UN GEN REPORTERO EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENCEFÁLICAS.

Candidata para el grado de Doctor en Ciencias
con orientación terminal en Morfología

Área de Estudio: Morfología

Objetivo y Método del estudio: La pérdida de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (NDM) provoca la enfermedad de Parkinson. Y hasta la fecha no existe tratamiento que detenga el avance de la muerte neuronal. En terapia génica es indispensable contar con promotores específicos para dirigir genes terapéuticos. El promotor del gen *pitx3* es específico de las NDM pero, aún se desconoce su secuencia mínima con actividad promotora. En este trabajo decidimos delimitar la región promotora del gen *pitx3* y confirmar su actividad promotora en una línea celular de neuroblastoma, para posteriormente demostrarlo in vivo. Para esto se obtuvieron diferentes vectores recombinantes que portan diferentes versiones de la región promotora del gen *pitx3* fusionadas al gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP). Analizamos la funcionalidad promotora mediante la transfección de una línea celular de neuroblastoma con los diferentes vectores recombinantes. Finalmente se probó in vivo uno de los vectores recombinantes, al transfectar las NDM del cerebro de ratas Wistar. Mediante inmunohistoquímica se analizó la expresión del gen reportero.

Contribuciones y conclusiones: Se obtuvo una secuencia corta (0.6 kb) con actividad promotora en las células de neuroblastoma N1E-115, pero carece de especificidad. Ya que durante el desarrollo de nuestro trabajo, al tratar de demostrar la presencia del factor de transcripción Pitx3, este estaba ausente en esta línea celular. Por lo tanto, aún y cuando se detectó la presencia de los marcadores dopaminérgicos (Nurr1 y TH), esta línea celular no presenta el fenotipo de una subpoblación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas que expresan *pitx3*. El vector recombinante 4.2 kb carece de actividad promotora en las NDM del cerebro de rata.



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Director de tesis

CAPITULO I

Introducción

Introducción

El aumento del promedio de vida del hombre ha conducido a un incremento en el número de individuos con enfermedades degenerativas, siendo el sistema nervioso uno de los más susceptibles a dañarse conforme avanza la edad del individuo. La región del sistema nervioso más susceptible a sufrir muerte neuronal, es la región ventral del mesencéfalo o cerebro medio. Las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (NDM) se encuentran agrupadas en dos núcleos principalmente, el Área Ventral Tegmental (VTA) y la Sustancia Negra (SN). Las NDM controlan el movimiento motor voluntario, las actividades cognitivas y de conducta al producir el neurotransmisor dopamina y liberarlo al cuerpo estriado. Al morir las NDM, ésta comunicación se pierde y se presentan los síntomas característicos de la Enfermedad de Parkinson (EP).

1.1 Neuronas Dopaminérgicas Mesencefálicas

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, las células progenitoras de células nerviosas se diferencian a fenotipos celulares específicos. Actualmente se conocen varios genes que están involucrados en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas¹⁻³. Entre ellos se encuentra el gen de la Tirosina hidroxilasa (TH). Su expresión inicia a los 11.5 días del desarrollo embrionario en el ratón y su función está implicada en la síntesis del neurotransmisor dopamina⁴. El factor de transcripción Nurr1 se expresa a los 10.5 días del desarrollo embrionario de ratón^{5,6} y es importante para que las células adquieran un fenotipo dopaminérgico ya que su inactivación en ratones, provocó la falta de expresión de marcadores dopaminérgicos y muerte celular por apoptosis en la región ventral del mesencéfalo⁷⁻⁹. Otro gen involucrado en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas es el gen *pitx3*. Pitx3 es un factor de transcripción que se une a la región promotora del gen de la TH y lo transcribe^{10,11}. Pitx3 comienza a expresarse en precursores dopaminérgicos mesencefálicos y en el cristalino de embriones de ratón. Su expresión inicia a los 11 días del desarrollo embrionario del ratón y se mantiene hasta la etapa adulta¹².

1.2 Pitx3

El gen *pitx3* pertenece a la familia de factores de transcripción y genes homeóticos Pitx. Otros miembros de esta familia son los genes *pitx1* y *pitx2*. Ambos genes se expresan en la hipófisis, de allí deriva su nombre “pit-x”(pituitary homeobox)¹³. El homeodominio de estos genes es altamente conservado y difiere en uno o dos aminoácidos. Inicialmente se pensó que al igual que los miembros de su familia se expresaba en la hipófisis, sin embargo no fue así. La expresión de Pitx3 se localizó en el sistema dopaminérgico, específicamente en la región ventral del mesencéfalo y posteriormente se descubrió que también se expresa en el cristalino y músculo¹⁴.

El gen *pitx3* mide 12.6 kb y está organizado en 4 exones y 3 intrones. Los exones miden 125, 129, 210 y 927 bp respectivamente. Los intrones son de 10729, 196 y 379 bp respectivamente. El homeodominio es interrumpido por un intrón en la posición 46. El codón de inicio de la traducción está situado en el exón 2¹⁵. En la región 5' del gen, situada antes del punto de inicio de transcripción se localizaron las cajas TATA y la caja CAAT en la posición -86 a -80 y -205 a -200, así como algunos dominios de unión para factores de transcripción relacionados con el desarrollo del cristalino y la formación de la región cráneo-facial, entre ellos el de las proteínas AP-2 y Maf.

El gen *pitx3* es flanqueado por dos genes. En su región 5' UTR se localiza la región promotora del gen *gbf1*, situado a 4.2 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen *pitx3*. Ambos genes posiblemente tienen en común parte de sus secuencias promotoras. En la región 3' del gen *pitx3* se localiza el gen *cig30* de quien al menos 10 nucleótidos de la región 3' UTR se traslapan con la secuencia del gen *pitx3*¹⁶.

El locus del gen *pitx3* se encontró en el cromosoma 19 del ratón, cerca de una región previamente identificada, cuya mutación provoca alteraciones morfológicas en ratones. El fenotipo de esos ratones conocidos como “aphakia” se caracteriza por alteraciones oculares durante el desarrollo embrionario. Posterior al nacimiento los ratones presentan ojos pequeños

con ausencia del cristalino y párpados unidos¹⁵. En ese momento aún no se había determinado qué gen o genes producían tales alteraciones, por lo que al identificar el locus del gen *pitx3* cercano a esa región se pensó que el gen podría estar involucrado en el fenotipo de los ratones aphakia. Cuando se analizó la secuencia codificante del gen *pitx3* en el genoma de los ratones aphakia no se encontró ninguna alteración. Sin embargo al analizar la región 5' UTR se encontró una deleción de 652 bp situada a -2.5 kb del punto de inicio de la transcripción^{17,18}. Posteriormente se encontró que los ratones aphakia también presentaban la pérdida del exón 1, sitio donde inicia el homeobox del gen *pitx3*¹⁷. Las alteraciones observadas en los ratones no solo se restringieron al ojo sino que también hubo una disminución considerable del número de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del mesencéfalo¹⁹⁻²². Mostrando con ello que el gen *pitx3* y su región 5' UTR son esenciales en el desarrollo de neuronas dopaminérgicas a nivel mesencefálico.

Nuestro grupo ha delimitado la región promotora del gen *pitx3* y confirmado su función en una línea celular de neuronas con fenotipo dopaminérgico²³. Por lo tanto, el promotor del gen *pitx3* debido a su alta especificidad en el Sistema Nervioso Central (SNC), es un candidato ideal para dirigir la expresión de transgenes en NDM con fines terapéuticos.

1.3 Expresión génica en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas

Para poder dirigir la expresión del transgén específicamente en NDM, es necesario utilizar la región promotora de un gen que se exprese únicamente en este tipo celular. En el mesencéfalo se expresan varios genes, entre ellos, el gen *Nurr1*, *Th*, *Sonic hedgehog (Shh)*, *AADH*, *DAT* y *Limx1* entre otros^{2, 24-26}. Sin embargo cada uno de ellos se expresa en otras regiones del SNC. El gen que únicamente se expresa en la región ventral mesencefálica a nivel del sistema nervioso central, es *Pitx3*. Por lo que, la región promotora del gen *pitx3* puede utilizarse para dirigir la expresión de genes terapéuticos para la EP.

1.4 Sistemas de transferencia de genes

Los sistemas de transferencia génica se han clasificado en dos categorías: los vectores virales recombinantes y los vectores sintéticos.

En la actualidad, la mayoría de los estudios de transferencia de genes reportados en la literatura han empleado a los vectores virales, y un 69% de los ensayos clínicos en humanos utilizan este sistema para transferir el gen terapéutico²⁷. A pesar de su alta eficiencia de transducción y ser los más utilizados, destacan la alta inmunogenicidad de los adenovirus²⁸, lo que a su vez dificulta la administración de dosis repetidas del vector, y la oncogenicidad de los retro y lentivirus²⁹⁻³¹. Además tienen poca especificidad para reconocer la célula blanco e incapacidad para empaquetar DNA de gran tamaño³².

Con respecto a vectores sintéticos, se dispone de varios tipos, uno de ellos son los conjugados moleculares denominados poliplex que son generados por la condensación de los ácidos nucleicos con un polímero catiónico, que puede ser químicamente unido a un ligando para dirigir la liberación a una célula blanco específica. El diseño de los polímeros catiónicos para liberar genes comprende gran diversidad química. Debido a su flexibilidad en la constitución química es posible incorporarle múltiples funciones para incrementar la liberación eficiente de genes, conservando su bio-compatibilidad, su fácil manufacturación y estabilidad. La capacidad de transportar DNA de gran tamaño, su baja toxicidad e inmunogenicidad y la protección del material genético transportado de la degradación enzimática, bloqueando el acceso de las enzimas nucleolíticas³³, hace que los polímeros catiónicos tengan un gran potencial para la terapia génica en humanos.

La Poli-L-lisina (PLL) facilita la solubilidad de algunas moléculas y se utiliza de forma rutinaria como vehículo para la liberación de medicamentos por periodos largos. Los policationes unen y condensan al DNA en estructuras pequeñas y compactas, debido a las interacciones electrostáticas entre los grupos fosfatos negativos situados a lo largo del esqueleto del DNA y las cargas positivas de la PLL del vector. El proceso de condensación es

dirigido por fuerzas de entropía y los poliplex se forman de manera espontánea al lograrse una relación molar precisa entre el polímero catiónico y el DNA. Las partículas resultantes son estructuras de forma toroide o de bastón cuyos tamaños oscila en el rango de 50 a 100 nm de diámetro. Por lo tanto, se pueden lograr nanopartículas del poliplex de diferente tamaño que refleja diferente grado de condensación. Cada partícula de poliplex compromete varias moléculas de DNA con muchas cadenas poliméricas a su alrededor.

Un polímero debe balancear suficiente fuerza de unión para proteger inicialmente al DNA de la degradación, pero a su vez permitir la descondensación del poliplex para la exitosa transcripción del transgén^{34,35}. La concentración del DNA también es un factor que influye en la solubilidad del poliplex; se ha observado que concentraciones menores de 20µg/mL forman complejos solubles.

1.5 NT-poliplex

Los vectores sintéticos no tienen la capacidad de dirigirse a una célula determinada. Sin embargo, poseen una gran flexibilidad química que les permite la adición de motivos para el direccionamiento celular específico. Generalmente se ha acoplado a los poliplex, ligandos para receptores de membrana específicos que dirigen su entrada por endocitosis mediada por receptor. El NT-poliplex es uno de los conjugados más reciente que se ha sintetizado y sobre todo que ha demostrado alta eficiencia, especificidad y prolongada expresión de los transgenes *in vivo*. Las características de la Neurotensina (NT) para internalizarse a las neuronas dopaminérgicas han facilitado su utilización exitosa como molécula ligando del poliplex.

Posterior a su internalización, los poliplex enfrentan barreras intracelulares que afectan la eficiencia de transfección. Por lo tanto, el poliplex debe ser provisto de estrategias funcionales para superar cada una de los obstáculos intracelulares que va enfrentando en su trayecto hacia el núcleo celular. Aunque más del 95% de las células en cultivo internalizan el vector (>100.000 copias por célula), sólo una fracción menor al 50% expresan el transgén³⁶.

La eficiencia en la endocitosis mediada por receptor depende de su afinidad, la avidéz por su ligando y la concentración del complejo ligando-receptor. La acidez es una de las condiciones que degrada a los poliplex. Durante la evolución, algunos virus desarrollaron estrategias para escapar de la acidez oportunamente. Una de estas estrategias, es el uso de péptidos fusogénicos que les permite evitar su degradación en el endosoma tardío. Utilizando la estrategia viral para escapar del endosoma, se le incorporó al NT-poliplex el péptido fusogénico de la hemaglutinina HA2 del virus de la influenza³⁷.

1.6 Direccionamiento nuclear del DNA

Diferentes experimentos establecen que la envoltura nuclear representa el último obstáculo para la transferencia de genes por métodos no virales. Estudios utilizando lipoplex y microscopía electrónica de transmisión demuestran que 1 de 100 moléculas de DNA presentes en el citoplasma alcanzan el núcleo celular³⁸, resultados que apoyan la fuerte restricción de la barrera nuclear para el importe de los lipoplex. Es bien conocido que una gran variedad de macromoléculas y proteínas de procedencia exógena como los virus o endógena como las histonas son dirigidas al núcleo por poseer una señal de localización nuclear (SLN). Hasta la fecha se han reportado diferentes SLN, la integración de la proteína VP1 del SV40 en el DNA del NT-poliplex incrementó significativamente la eficiencia de transfección³⁷.

Finalmente, para favorecer el desensamblaje del conjugado NT-poliplex, es necesario reducir la fuerza de unión entre el polímero y el DNA. Esto se logra reduciendo el número de cargas positivas mediante la conjugación con cadenas polietilenglicol (PEG) o disminuyendo la masa molecular del polímero.

1.7 Neurotensina

La Neurotensina es la molécula ligando encargada de dar el primer punto de especificidad a la transferencia de genes por el NT-poliplex^{37,39-43}. La NT es un tridecapéptido (Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu), cuya actividad biológica radica en los 6

aminoácidos del extremo carboxilo⁴⁰. La funcionalidad del NT-poliplex confirma que el método de conjugación utilizado permite la conservación del dominio de unión al receptor^{37,39-42,44}.

La NT es un neuromodulador que tiene una amplia distribución en el cerebro⁴⁵ y en tejidos periféricos, en los que ejerce diferentes efectos fisiológicos^{43,46-49}. Sin embargo, los niveles de la NT endógena no impiden la internalización del NT-poliplex por las neuronas dopaminérgicas del cerebro.

Tempranamente se conoció que la NT mediaba sus efectos fisiológicos a través de la interacción con receptores específicos, localizados en la membrana plasmática de la célula blanco⁵⁰. Estudios de auto-radiografía con NT radioactiva realizados en cortes cerebrales de diferentes mamíferos han determinado diferente densidad de los receptores a NT (NTR) en diversas regiones del SNC. Los núcleos que tienen moderada densidad de NTR son el estriado, el hipocampo ventral, la materia gris periacueductal, el colículo superior y el núcleo dorsal del rafe⁵¹. La densidad más alta de receptores está en las neuronas de la SNC y en el VTA. La alta densidad de los NTR en estos dos núcleos mesencefálicos fue el antecedente primordial para transferir genes a neuronas dopaminérgicas a través del NT-vector en un modelo murino de ratas hemiparkinsonianas^{37,39-42,44}.

Se han identificado tres subtipos de NTR, denominados NTS1, NTS2, NTS3. Estos receptores han sido clonados y se conoce la secuencia peptídica⁵². Los dos primeros receptores están acoplados a la proteína G (GPCR). Al igual que todos los receptores de la familia de los GPCR, NTS1 y NTS2 tienen 7 dominios trans-membranales⁵³. La homología entre el NTS1 y el NTS2 es de un 64%, pero las diferencias estructurales entre ellos son marcadas⁵⁴. Se tomó ventaja de esta propiedad de internalización del NTS1 para considerar a la NT como molécula ligando del vector génico de NT.

1.8 Relación de la NT con el sistema dopaminérgico

El conocimiento de la distribución del NTS1 asociado a diferentes formas de transporte intracelular ha sido fundamental para desarrollar diferentes modelos de transferencia génica mediante el NT-poliplex. Una de las aportaciones de Arango Rodríguez y colaboradores, fue la factibilidad de enviar genes a las neuronas dopaminérgicas nigrales utilizando el transporte retrógrado para la NT desde el núcleo estriado.

Ensayos con radioisótopos en el estriado de la rata, han mostrado que la mayoría de los receptores de NT están localizados en las terminales axónicas de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, por ello la vía nigroestriatal dopaminérgica es un modelo de elección para estudiar el transporte axonal retrógrado de la NT desde el estriado hasta la SN.

Estudios de inyección intraestriatal con [125 I]-NT indican que la acumulación de la marca radioactiva en la SN se inicia después de dos horas de la inyección, detectándose el nivel más alto a las 4 horas, y ausencia del marcaje después de 24 horas. Estos datos muestran que el transporte retrógrado de la NT es más rápido que el descrito para otras moléculas en otras terminales axónicas⁵⁵.

Diversas hipótesis han surgido respecto a la localización de la NT en el núcleo celular de las neuronas dopaminérgicas. Una de ellas es que la NT puede alcanzar el cuerpo celular y posteriormente se disocia de su receptor y se une a receptores específicos localizados en la membrana nuclear. Se ha reportado la evidencia de sitios de unión de alta afinidad de la NT en el núcleo de neuronas del cerebro medio⁵⁶. Por lo tanto, el complejo ligando-receptor puede entrar al núcleo y se puede unir a proteínas de unión nuclear para participar en la expresión de diferentes genes. Además, la asociación de la NT con el núcleo se puede explicar por la escasa degradación de la NT. Un hallazgo que sustenta la acción fisiológica de la internalización nuclear de la NT es el incremento en la expresión del ARNm de la TH (+39%) 4 horas post-inyección intraestriatal de NT, en las células de la SN ipsilateral del estriado inyectado, comparado con los controles estriados inyectados con solución salina. A su vez se correlacionó el tiempo de la

expresión del ARNm de TH con la presencia nuclear de NT en la SN⁵⁷⁻⁵⁸. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que el efecto de la NT en la expresión del ARNm de TH no sea directo, sino a través de otras moléculas mensajeras producidas por la activación del receptor a NT en la superficie de la membrana celular.

OBJETIVO GENERAL

Obtener una región con actividad promotora del gen *pitx3* que dirija la expresión de un gen reportero en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construir diferentes versiones de la región promotora del gen *pitx3* fusionadas al gen reportero de la GFP.
2. Evaluar la actividad promotora de las diferentes versiones en una línea celular de neuroblastoma.
3. Evaluar la capacidad de las diferentes versiones promotoras para dirigir la expresión de la GFP en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas *in vivo*.

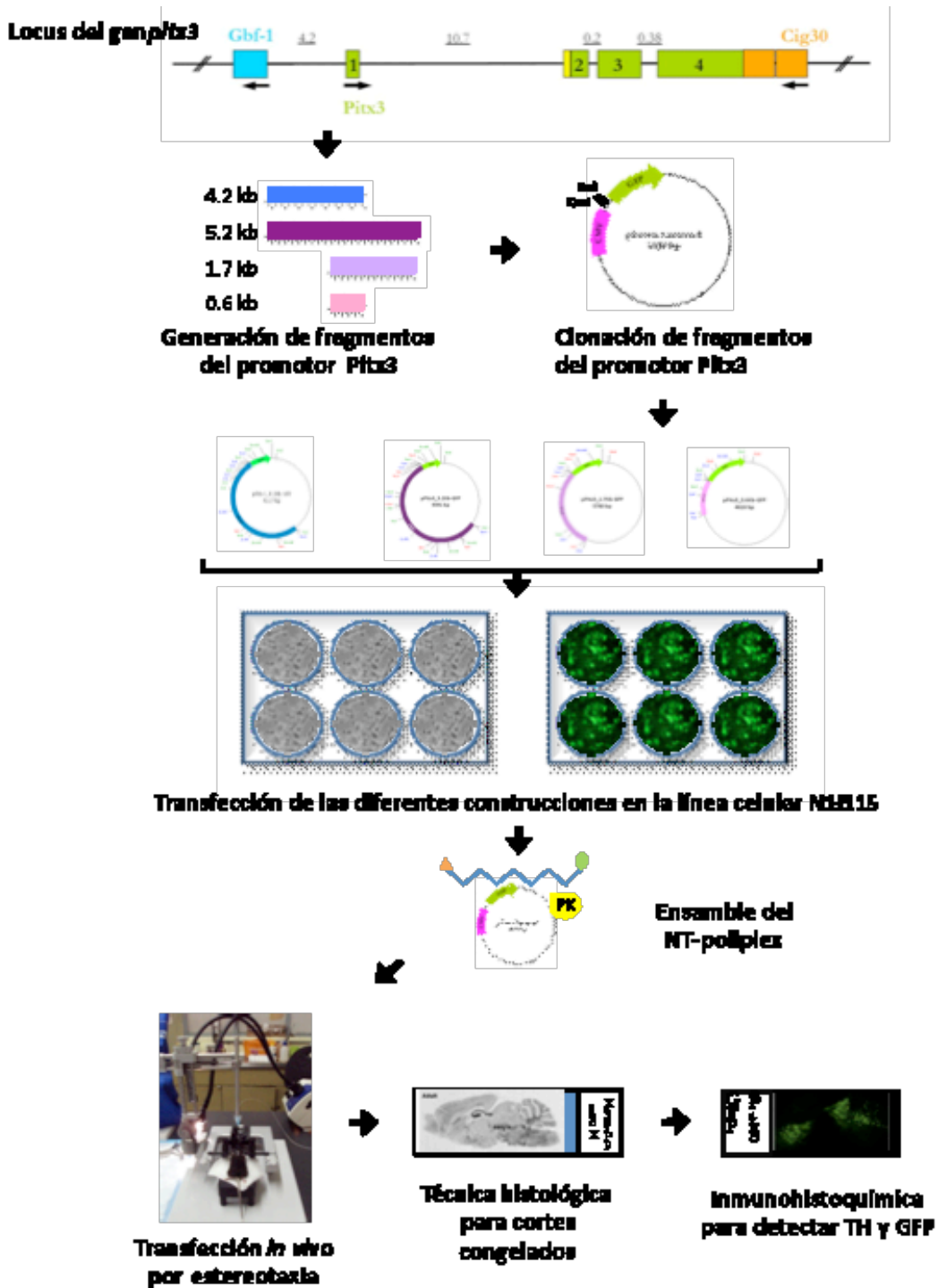
CAPITULO II

2.1 Estrategia Experimental

2.2 Material y Equipo

2.3 Metodología

2.1 Estrategia Experimental



Estrategia experimental. Se clonaron los diferentes fragmentos río arriba del gen de la GFP. Las células N1E-115 fueron transfectadas con los vectores recombinantes y se analizaron para la expresión de GFP. Con el plásmido que expresó la GFP, se ensambló en NT-poliplex para transfectar las neuronas DA de la SN. Se realizaron cortes de la región mesencefálica y se analizaron con inmunohistoquímica para TH y GFP.

2.2 Material y Equipo

Reactivos

Los reactivos químicos empleados para la obtención de DNA plasmídico como glucosa, EDTA, tris base, hidróxido de sodio, SDS, acetato de potasio, ácido acético, isopropanol, etanol, glicerol, fenol y cloroformo fueron de las marcas Sigma-Aldrich y J. T. Baker. Los reactivos para preparar buffer salino como cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de potasio monobásico; así como los reactivos para procesar tejidos como paraformaldehído y sacarosa fueron de Sigma-Aldrich.

Las enzimas de restricción utilizadas fueron de las marcas Promega, New England Biolabs y Fermentas. La enzima T4 DNA polimerasa para rellenar los extremos cohesivos fue de Promega. La T4 DNA Ligasa utilizada fue de la marca Fermentas.

El kit EndoFree Plasmid Maxi^R para extracción a mediana escala de plásmido libre de endotoxinas fue de Qiagen. El kit GoScript Reverse Transcriptase^R para realizar el RT-PCR fue de la marca Promega.

Los reactivos para la transfección de las líneas celulares como LipofectaminaTM 2000, los medios de cultivo DMEM y DMEM:F12; así como tripsina-EDTA, SFB, L-Glutamina y Antibiótico-Antimicótico fueron de la casa comercial Invitrogen. El APTES para tratamiento de cubreobjetos fue de la marca Sigma-Aldrich. El VECTASHIELD^R con y sin DAPI fue de la marca Vector Labs. El Hoechst fue de Sigma-Aldrich.

Los reactivos para la transfección *in vivo* como el péptido fusogénico, el péptido cariofílico, LC-SPDP, Neurotensina y poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), así como los anestésicos utilizados fueron proveídos por el Dr. Daniel Martínez Fong del Cinvestav, Unidad Zacatenco, México, D.F.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: Anti-TH producido en ratón; dilución 1:200 (Sigma), Anti-TH producido en conejo; dilución 1:1000 (Chemicon), Anti-Pitx3 producido en conejo; dilución 1:50 (Invitrogen), Anti-Nurr1 producido en conejo; dilución 1:100 (Santa Cruz), Anti-DAT producido en cabra; dilución 1:50 (Santa Cruz) y Anti-GFP producido en ratón; dilución 1:200 (Chemicon). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: FITC anti-ratón hecho en cabra; dilución 1:60 (Invitrogen), FITC anti-conejo hecho en cabra; dilución 1:60 (Jackson IR), FITC anti-cabra hecho en burro; dilución 1:50 (Jackson IR) y TRITC anti-conejo hecho en cabra; dilución 1:60 (Invitrogen).

Plásmidos

El plásmido pGreenLantern-1 fue proporcionado por el Dr. Daniel Martínez Fong. El plásmido pPitx3-Cre fue generado por la Dra. Diana L. Castillo Carranza y es propiedad del Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste del IMSS.

Material Biológico

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α que se manipuló para la replicación de los plásmidos utilizados fue obtenida del cepario del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL.

Las células de neuroblastoma de origen murino N1E-115 fueron obtenidas del ATCC con la clave CRL-2263.

Las ratas de la cepa Wistar que se utilizaron tenían un peso entre 220 y 230 gr. Los animales fueron mantenidos bajo temperatura constante (23°C) y ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, con alimento y agua *ad libitum*, en el bioterio del Cinvestav, Unidad Zacatenco.

Equipo para:**Construcción de vectores**

Se utilizaron incubadoras a 37°C con agitación (Orbital), balanza analítica (A&D Company), transiluminador de luz UV (BioRad), espectrofotómetro (Eppendorf), centrífuga refrigerada (Sigma), termociclador (MJ Research), vortex (Labnet), microcentrífuga (Labnet), fuente de poder (Labnet), cámara de electroforesis (Owl Separation Systems, Inc.), juego de pipetas calibradas de 10, 20, 200 y 1000 µL (Gilson), baño de agua con control de temperatura (PolyScience), autoclave (Felisa), potenciómetro (Denver Instrument), cámara digital (Sony), ultracongelador (So-Low).

Cultivo de células

Las células fueron manipuladas en una campana de flujo laminar (Telstar), mantenidas en una incubadora de CO₂ (Thermo Electron Corporation), observadas en un microscopio invertido (Southern Precision Instruments) se utilizó centrífuga clínica (Hamilton Bell), centrífuga con refrigeración (Sigma), baño de agua con control de temperatura (PolyScience), placas de 24 pozos (Corning), cajas de 25 cm (Corning), cubreobjetos (Fisher), tubos criogénicos (Corning). Las células con fluorescencia fueron observadas y capturadas en un microscopio de fluorescencia invertido marca Leica.

Cirugía estereotáxica

Para la cirugía se utilizó un equipo estereotáxico con barras para los oídos de 18° y un adaptador para ratón de la marca Stoelting. El material de cirugía como tijeras, pinzas, escalpelo no. 3, navajas no. 15, microtaladro y pinza gubia para hueso, así como equipo para rasurar, bomba de infusión y mangueras fueron de la marca Stoelting. Para la inyección se utilizó una jeringa de 10 µL de la marca Hamilton Serie 900.

2.3 Metodología

2.3.1 Construcción de los vectores recombinantes conteniendo el gen reportero GFP bajo la regulación de las diferentes versiones del promotor del gen *pitx3*.

Digestiones para la caracterización de pGreenLantern-1 y pPitx3-Cre

Las digestiones de 1 µg de plásmido fueron realizadas con 1 U de la enzima correspondiente para cada vector, bajo las condiciones recomendadas por el proveedor en un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó a 37°C por 2 horas. Se analizó el patrón de restricción en gel de agarosa al 0.8%.

Digestión de los vectores pPitx3-Cre y pGreenLantern-1 para clonación

La digestión de 4 µg de cada vector se realizó con 4 U de cada una de las enzimas de restricción correspondientes bajo las condiciones recomendadas por las casas comerciales en un volumen final de 50 µL. Las reacciones fueron incubadas a 37°C por 2 horas. Después de pasado el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 1.5 µL y se analizó en gel de agarosa 0.8% para determinar la digestión total de los vectores.

Purificación de fragmentos

Los plásmidos digeridos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Las bandas en el gel correspondientes al fragmento *KpnI-XhoI* del promotor Pitx3 liberado del plásmido pPitx3-Cre y al vector pGreenLantern-1 digerido con *KpnI-SalI* fueron cortadas y los fragmentos se recuperaron siguiendo el protocolo del Kit Wizard SV Gel^R y PCR Clean-Up System^R (Promega).

Ligación

Los fragmentos fueron ligados en una relación vector:inserto de 1:3 utilizando 50 ng totales, 1 U de enzima T4 DNA Ligasa, el buffer de reacción y agua estéril hasta un volumen final

de 15 μ L. La reacción fue incubada a 4°C toda la noche. Pasado el tiempo de incubación la enzima fue inactivada a 65°C por 15 minutos.

Transformación

Células calcio-competentes de *E. coli* DH5 α fueron transformadas por choque térmico con las reacciones de ligación. Se agregaron 3 μ L de ligación a una alícuota de 100 μ L de células calcio-competentes. Para dar el choque térmico se siguió el protocolo 24 del Manual de Laboratorio (Referencia). Después de la transformación, se tomaron 100 μ L de las células y se sembraron en cajas de agar LB-ampicilina 100 μ g/mL. Las células restantes fueron concentradas en un volumen de 50 μ L y también fueron sembradas e incubadas a 37°C toda la noche.

Extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina

Las clonas obtenidas de la transformación fueron inoculadas en 3 mL de medio LB-ampicilina 100 μ g/mL. Se incubaron a 37°C durante toda la noche en agitación constante a 150 rpm. Para realizar la extracción de plásmido se siguió el protocolo 1 del Manual de Laboratorio (Referencia).

Caracterización por restricción

Se digirieron 500 ng de los plásmidos recombinantes con 1 U de la enzima correspondiente siguiendo las recomendaciones de la casa comercial en un volumen final de 50 μ L. La reacción se incubó a 37°C por 2 horas. Se analizó el patrón de restricción en gel de agarosa al 0.8%.

Reparación de extremo cohesivo con T4 DNA polimerasa

Se mezcló el buffer de reacción 5x, dNTP 2.5mM, 1.5 μ g de plásmido y la enzima T4 DNA polimerasa en un volumen final de 20 μ L. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Después del tiempo de incubación se inactivó a 70°C por 10 minutos.

Digestión parcial con *Ecl136II*

De la reacción anterior se tomaron 15 μL y se mezclaron con 1 U de enzima *Ecl136II*, el buffer de reacción 10x y se llevaron a un volumen final de 30 μL con agua estéril. La reacción se incubó a 37°C por 10 minutos y se pasó inmediatamente a hielo. Se tomó una alícuota de 2 μL y se analizó en un gel de agarosa 0.8%. Se inactivó la enzima a 65°C por 20 minutos. La reacción se cargó en un gel de agarosa 1% y se aplicó un campo eléctrico de 50 volts durante 3 horas. El gel de agarosa fue teñido en una solución de Bromuro de etidio durante 5 minutos. Las bandas fueron observadas en un transiluminador de luz UV; donde la banda correspondiente al vector con extremos *Pcil* y *Ecl136II* se identificó, cortó y purificó de la manera antes descrita.

2.3.2 Evaluación de la actividad promotora de las diferentes versiones del promotor Pitx3 en una línea celular de neuroblastoma.

Cultivo celular

Las células N1E-115 fueron crecidas en medio DMEM adicionado con SFB 10%, L-Glutamina 2mM y Antibiótico-Antimicótico 1x (Invitrogen) y cosechadas con solución salina Puck's. Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y en 95% de humedad.

Tratamiento de cubreobjetos con APTES

Los cubreobjetos se sumergen en una solución de H₂SO₄ al 20% durante 1 hora. Se enjuagan 4 veces en agua MilliQ^R. Se sumergen en una solución de NaOH 1N durante 5 minutos. Se enjuagan 4 veces en agua MilliQ^R. Se dejan secar durante 30 minutos. Se colocan en una caja petri de vidrio y se adiciona 1 mL de APTES durante 4 minutos. Se enjuagan 10 veces en agua MilliQ^R. Se secan bien y se esterilizan a 20 lbs por 15 minutos.

Inmunofluorescencia

Se cultivaron 80,000 células por pozo en placas de 24 pozos sobre cubreobjetos tratados con APTES. Se removió el medio de cultivo y las células fueron fijadas con 300 μ L de PFA 3.5% durante 20 minutos. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x. Se realizó la permeabilización de las células dando 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tritón 0.1%. Se bloquearon los sitios inespecíficos durante 1 hora con Suero de caballo 10% preparado en PBS-Tritón 0.1%. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-Tritón 0.1%. Se incubó con el anticuerpo primario diluido en PBS-Tritón 0.1%-Suero de caballo 1.5% durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-Tritón 0.1%. Se incubó con el anticuerpo secundario diluido en PBS-Tritón 0.1%-Suero de caballo 1.5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x. Se contratiñeron los núcleos celulares con 200 μ L de una solución Hoechst 1 μ M durante 5 minutos. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x. Se dejaron secar un poco las células adheridas a los cubreobjetos y se montaron con VECTASHIELD^R.

Obtención del RNA total

Se cosecharon las células cultivadas en cajas de 25 cm a una confluencia de 90%. Se centrifugaron a 4,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtener la pastilla celular que fue resuspendida en 1 mL de TRIzol^R. Se incubó el homogenizado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 μ L de Cloroformo y se mezcló por inversión. Se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, se agregaron 500 μ L de isopropanol y se mezcló por inversión. Se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 1 mL de etanol 75%. La pastilla de RNA obtenida fue resuspendida en 15 μ L de H₂O MilliQ^R estéril. La integridad del RNA fue analizada en un gel de agarosa 0.8%.

RT-PCR

La reacción de transcriptasa reversa se realizó siguiendo las indicaciones del Kit GoScript Reverse Transcriptase^R (Promega). El DNA complementario (cDNA) sintetizado a partir del RNA obtenido de las células N1E-115 se utilizó para amplificar los genes *th*, *dat*, *nurr1* y *pitx3* con los oligonucleótidos específicos detallados en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos de secuencia para los genes *th*, *dat*, *nurr1* y *pitx3*.

Gen		Secuencia
<i>th</i>	THFN2	5'-ggaaatgctgttctcaacctgc-3'
	THRN2	5'-gatggtccagggtccaggtcagg-3'
<i>dat</i>	DAT-Fw	5'-ccagagaggtggagctcatc-3'
	DAT-Rv	5'-ggcagatcttccagacacc-3'
<i>nurr1</i>	E3N3	5'-cccagcttcagttacctttatgg-3'
	E3N4	5'-cgtagtggccacgtagttctgg-3'
<i>pitx3</i>	Pitx3-FN219	5'- cttccagaacatggctgcaagg-3'
	Pitx3-RN700	5'- aatacaggctgtgaagccagagg-3'

La reacción se realizó en un volumen final de 25 μ L como se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Reactivos utilizados en el PCR usando cDNA como templado.

Reactivo	Concentración	Cantidad
Buffer	10x	2.5 μ L
Oligonucleótido sentido	100ng/ μ L	1 μ L
Oligonucleótido antisentido	100ng/ μ L	1 μ L
dNTP	2.5mM	2.5 μ L
MgCl ₂		2.5 μ L
Taq polimerasa	1 U	0.5 μ L
cDNA	--	2 μ L
H ₂ O	--	13 μ L

El programa utilizado siguió los pasos especificados en la tabla 3. La temperatura de alineamiento para los genes *dat* y *nurr1* fue de 55°C y para el resto de los genes fue la que se menciona en la tabla 3.

Tabla 3. Programación del termociclador para amplificar los genes deseados.

Temperatura	Tiempo
1. 94°C	2 minutos
2. 94°C	1 minuto
3. 58°C	1 minuto
4. 72°C	1 minuto
5. 30 ciclos al paso 2	---
6. 72°C	5 minutos

Transfección de células N1E-115

Las células fueron crecidas en cajas de 24 pozos hasta alcanzar una confluencia del 80%. Los complejos para la transfección fueron preparados con 800 ng de plásmido diluido en medio DMEM en un volumen final de 50 µL. En otro tubo Eppendorf de 1.5 mL, se diluyeron 2 µL de Lipofectamina™ 2000 en 48 µL de medio DMEM y se incubó por 5 minutos. Después del tiempo de incubación, el contenido de los tubos con la Lipofectamina™ 2000 diluida fue pasado a cada uno de los tubos con el plásmido diluido e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, a las células se les removió el medio de cultivo y se les agregaron 400 µL de DMEM suplementado con 10% de SFB. Después de cumplido el tiempo de incubación de la Lipofectamina™ 2000 y el plásmido se agregaron los 100 µL de la mezcla a las células con medio fresco. Los cultivos se incubaron por 6 horas a 37°C en 5% de CO₂ y en 95% de humedad. Después de transcurridas las 6 horas se removió el medio de cultivo y se les agregó medio DMEM suplementado con SFB 10%, L-Glutamina 2mM y Antibiótico-Antimicótico 1x. Las células se mantuvieron en incubación por 48 horas bajo las mismas condiciones de temperatura, CO₂ y humedad.

2.3.3 Evaluación de la capacidad de las diferentes versiones promotoras para dirigir la expresión de la GFP en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

Preparación del NT-poliplex

El acarreador se sintetizó en el laboratorio del Dr. Daniel Martínez Fong bajo su supervisión y siguiendo el protocolo publicado (Referencia). Para ensamblar el sistema de transfección *in vivo*, se mezclaron cada uno de los plásmidos a una concentración de 6nM con el PK a una concentración de 6 μ M para pGreenLantern-1 y 8 μ M para pPitx3_4.2Kb.GFP y pPitx3_0.6Kb-GFP. Las diluciones tanto de los plásmidos como del PK fueron hechas en medio DMEM. Los tubos fueron mantenidos en agitación constante a 950 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, se preparó una solución de trabajo del acarreador a una concentración de 1080nM. Con esta solución de trabajo se prepararon diferentes relaciones molares que fueron mezcladas por separado con los tubos conteniendo el DNA y el PK. Los tubos fueron mantenidos en agitación constante a 950 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Geles de Retardo

Se prepararon soluciones de trabajo, tanto de los plásmidos a 12nM, como del PK a 96 μ M. A partir de la solución de trabajo del PK, se prepararon diluciones a diferentes concentraciones (2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M y 10 μ M). Se tomaron 7.5 μ L de cada una de las concentraciones y se distribuyeron en 9 tubos de 0.2 mL dejando 1 tubo vacío. Se agregaron 2.5 μ L de la solución de trabajo del plásmido a cada uno de los tubos que contenía la solución de PK así como al tubo vacío, el cual se llevo a un volumen final de 10 μ L con medio DMEM. Todas las diluciones fueron hechas en este medio. Los tubos fueron mantenidos en agitación constante a 950 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Cumplido este tiempo, los 10 μ L fueron cargados en un gel de agarosa 0.8% y se aplicó un campo eléctrico de 70 volts por 2 horas. El gel fue teñido con una solución de Bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV.

Geles de Retención

Se preparó el complejo de plásmido y PK a una concentración de 12nM y 8 μ M respectivamente y se mantuvo en agitación durante 30 minutos bajo las condiciones antes descritas. Mientras tanto, se preparó una solución de trabajo del acarreador a una concentración de 1080nM. A partir de esta solución de trabajo, se prepararon 5 μ L de diferentes diluciones del acarreador, los cuales fueron agregados a los tubos conteniendo el plásmido y el PK. Estas diluciones fueron realizadas de tal manera que al mezclarlas con el plásmido y el PK resultaran en diferentes relaciones molares (1:3, 1:6, 1:9, 1:12, 1:15, 1:18, 1:21, 1:24, 1:27, 1:30, 1:33, 1:36 y 1:39). Los tubos fueron mantenidos en agitación constante a 950 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Cumplido este tiempo, los 15 μ L fueron cargados en un gel de agarosa 0.8%. El gel de agarosa fue teñido y visualizado de la manera antes descrita.

Cirugía estereotáxica

Se anestesiaron ratas Wistar de 220-230 gr de peso con hidrato de cloral (350 mg/kg de peso) por vía intraperitoneal. Se colocaron en el aparato estereotáxico con la barra de incisivos a 6 mm por debajo de la línea interaural. Se ajustaron las coordenadas AP +2.5 desde la línea interaural, ML +1.5 desde la línea media y DV -6.8 desde la corteza cerebral. Con estas coordenadas nos posicionamos en el borde dorsal de la sustancia negra donde después de la trepanación craneal se microinyectaron 5 μ L del poliplex a una velocidad de 0.1 μ L/minuto.

Obtención de cortes para inmunofluorescencia

Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral y perfundidas a través de la aorta ascendente con 100 mL de PBS 1x seguido de 100 mL de PFA 4%. El cerebro fue removido y fijado en PFA 4% durante toda la noche a 4°C. Después de la fijación, el cerebro se pasó a una solución de sacarosa 30% durante 24 horas a 4°C. El cerebro se congeló y se obtuvieron cortes coronales de 35 μ m de grosor. Los cortes fueron colectados en una placa de 24 pozos conteniendo PBS 1x y almacenados a 4°C hasta su análisis por inmunofluorescencia. Al momento de realizar la inmunofluorescencia, los cortes fueron nuevamente fijados con PFA 4%

durante 20 minutos. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x. La técnica se siguió de la manera antes descrita. El anticuerpo primario utilizado fue Anti-GFP producido en ratón; dilución 1:200 (Chemicon). El anticuerpo secundario fue FITC anti-ratón hecho en cabra; dilución 1:60 (Invitrogen).

CAPITULO III

Resultados

Resultados

3.1 Obtención de los vectores recombinantes conteniendo el gen reportero GFP bajo la regulación de las diferentes regiones promotoras del gen *pitx3*.

Los vectores conteniendo el gen que codifica para la GFP bajo la regulación de las diferentes versiones del promotor del gen *pitx3* (anexo 1) se construyeron a partir del plásmido pGreenLantern-1. Para comprobar la identidad de dicho plásmido, se realizó la caracterización por restricción con la enzima *HincII*. La digestión con esta enzima generó los fragmentos esperados de 3890 bp, 619 bp y 521 bp (figura 1). De igual manera, para comprobar la identidad del plásmido pPitx3-Cre, el cual contiene el fragmento promotor de 4.2 Kb del gen *pitx3*, fue digerido con la enzima *EcoRV*, generando fragmentos de 5406 bp, 2330 bp y 1973 bp que concuerdan con el patrón esperado (figura 1).

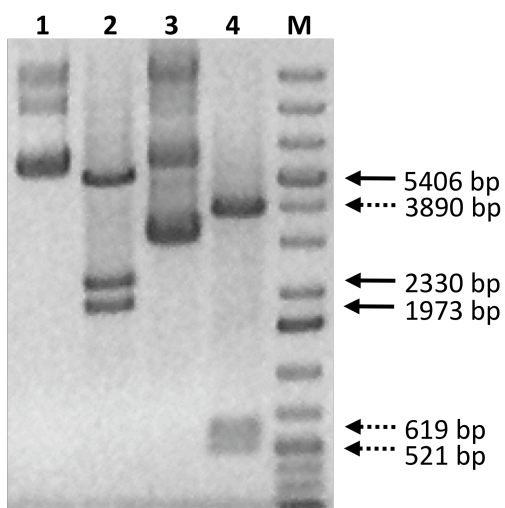


Figura 1. Caracterización de plásmidos pPitx3-Cre y pGreenLantern-1. Carril 1 plásmido pPitx3-Cre sin digerir. Carril 2 plásmido pPitx3-Cre digerido con *EcoRV*. Carril 3 plásmido pGreenLantern-1 sin digerir. Carril 4 plásmido pGreenLantern-1 digerido con *HincII*. M marcador de peso molecular. Se señalan los tamaños de los fragmentos con flechas de línea sólida para pPitx3-Cre digerido con *EcoRV* y con flechas de línea punteada para pGreenLantern-1 digerido con *HincII*.

Construcción del vector pPitx3_4.2Kb-GFP

El vector pPitx3-Cre fue digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* liberando un fragmento de 4207 bp que corresponde al promotor del gen *pitx3* y subclonado en el vector pGreenLantern-1 que fue digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *Sall* y cuyos sitios de reconocimiento se encuentran dentro del sitio de clonación múltiple separados por 18 bp liberadas al momento de la digestión (figura 2). El fragmento del promotor Pitx3 con extremos *KpnI* y *XhoI* fue purificado y ligado al vector pGreenLantern-1 digerido con *KpnI* y *Sall* (los extremos *XhoI* y *Sall* son extremos compatibles). La reacción de ligación fue transformada en células calcio-competentes de *E. coli* DH5 α .

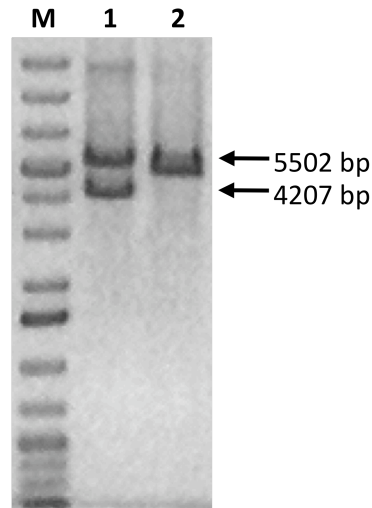


Figura 2. Clonación del fragmento de 4.2 Kb. M marcador de peso molecular. Carril 1 plásmido pPitx3-Cre digerido con *KpnI* y *XhoI*. Carril 2 plásmido pGreenLantern-1 digerido con *KpnI* y *Sall*. Se señalan los tamaños de los fragmentos generados con la digestión *KpnI/XhoI* del plásmido pPitx3-Cre. El plásmido pGreenLantern-1 digerido con *KpnI* y *Sall* migra a 5012 bp. No pueden ser observadas las 18 bp liberadas por esta digestión en el gel de agarosa 0.8%.

El plásmido recombinante recuperado de las clonas resultantes de la transformación fue digerido con la enzima de restricción *BamHI* generando los fragmentos de 5102 bp, 3597 bp y 520 bp que concuerdan con el patrón esperado. Pero debido a que el fragmento de 4.2 Kb se clonó río abajo del promotor CMV, se realizó una estrategia para eliminar este promotor.

Eliminación del promotor CMV

Se realizó una digestión del vector pPitx3_4.2Kb-GFP con la enzima de restricción *PciI*. El extremo *PciI* se reparó con la enzima T4 DNA polimerasa. Este vector con extremo *PciI* en romo, fue digerido parcialmente con la enzima de restricción *Ecl136II* liberando un fragmento de 992 bp que corresponde al promotor CMV. Se purificó la banda de 8227 bp que corresponde al vector sin el promotor CMV. El vector fue ligado, transformado en *E. coli* DH5 α , recuperado y caracterizado con la enzima de restricción *BamHI*. Los fragmentos generados en esta digestión fueron de 4110 bp, 3597 bp y 520 bp que concuerdan con el patrón esperado (figura 3, a).

Para comprobar la eliminación de este promotor, se realizó la caracterización por restricción con la enzima *Ecl136II*. En el vector que aun contenía el promotor CMV se generaron fragmentos de 4850 bp y 4369 bp debido a la presencia de 2 sitios *Ecl136II* en este vector. El vector del cual se eliminó el promotor CMV perdió uno de los sitios *Ecl136II* por lo que al digerirlo con esta enzima de restricción sólo se linearizó a 8227 bp (figura 3, b).

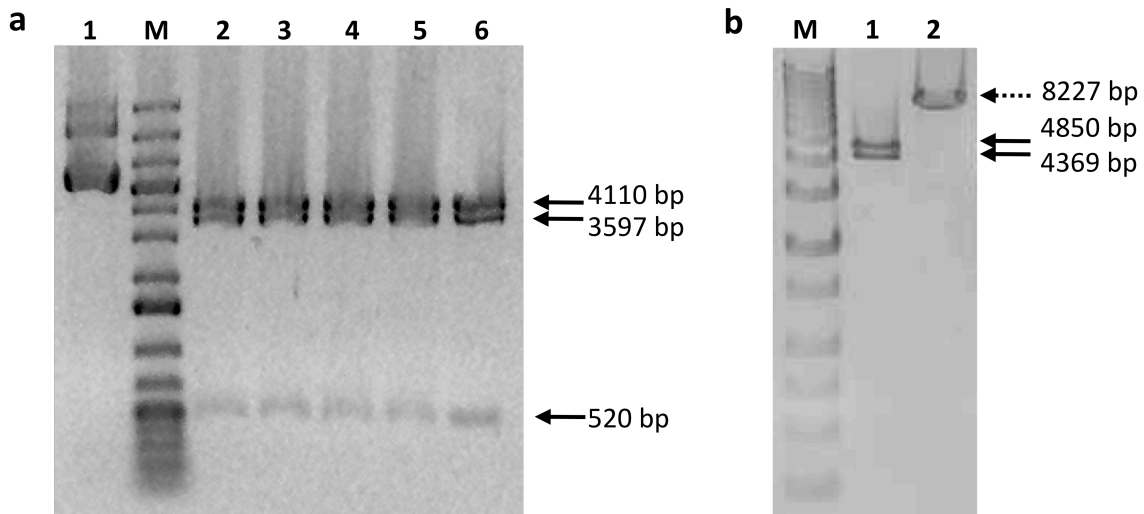


Figura 3. Caracterización del vector pPitx3_4.2Kb-GFP después de la eliminación del promotor CMV. a) Carril 1 plásmido pPitx3_4.2Kb-GFP sin digerir. M marcador de peso molecular. Carril 2 - 6 clonas digeridas con *BamHI*. b) M marcador de peso molecular. Carril 1 pPitx3_4.2-GFP con el promotor CMV. Carril 2 pPitx3_4.2Kb-GFP sin el promotor CMV. Se señalan los tamaños de los fragmentos con flechas de líneas sólidas para pPitx3_4.2Kb-GFP con CMV y con flecha de línea punteada para pPitx3_4.2Kb-GFP sin CMV.

Construcción del vector pPitx3_5.2Kb-GFP

El vector pPitx3_4.2-GFP fue digerido con las enzimas de restricción *SphI* y *SacI* liberando un fragmento de 276 bp que corresponde al extremo 3' del promotor de 4.2 Kb del gen *pitx3*. A partir de la secuencia reportada para el gen *pitx3* se sintetizó un fragmento de 1446 bp que contiene las 276 bp de la región 3' del promotor 4.2 Kb y 1170 bp del extremo 5' del intrón 1 del gen. Este fragmento fue ligado al vector pPitx3_4.2Kb-GFP digerido con *SphI* y *SacI* y transformado en células *E. coli* DH5 α . De las clonas obtenidas se recuperó el plásmido que fue caracterizado por restricción con las enzimas *EcoRI*, *NotI* y *StuI* (figura 4). La digestión con *EcoRI* linearizó el plásmido a 9391 bp. La digestión con *NotI* generó fragmentos de 7325 bp, 1334 bp y 732 bp. La digestión con *StuI* liberó fragmentos de 7750 bp y 1641 bp. El patrón de restricción con cada una de las enzimas fue el esperado.

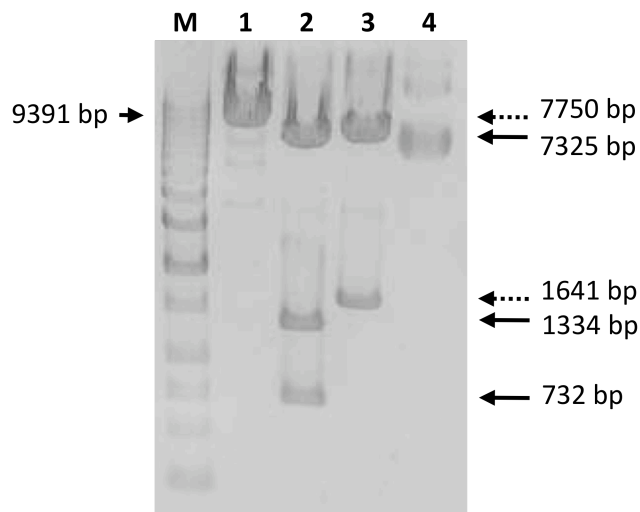


Figura 4. Caracterización del vector pPitx3_5.2Kb-GFP. M marcador de peso molecular. Carril 1 plásmido digerido con *EcoRI* (flechas cortas). Carril 2 plásmido digerido con *NotI* (flechas con línea sólida). Carril 3 plásmido digerido con *StuI* (flechas con línea punteada). Carril 4 plásmido sin digerir.

Construcción de los vectores pPitx3_1.7Kb-GFP y pPitx3_0.6Kb-GFP

El vector pPitx3_5.2Kb-GFP y pPitx3_4.2Kb-GFP fueron digeridos con la enzima de restricción *Pst*I. Los plásmidos fueron religados, transformados en células *E. coli* DH5 α , recuperados y caracterizados. El vector pPitx3_1.7Kb-GFP fue caracterizado con las enzimas de restricción *Sca*I generando fragmentos de 3635 bp y 2145 bp (figura 5, a). El vector pPitx3_0.6Kb-GFP se caracterizó con las enzimas de restricción *Not*I, *Nhe*I y *Sca*I (figura 5, b). Los fragmentos generados con la enzima *Not*I fueron de 3714 bp, 732 bp y 170 bp. Con la enzima *Nhe*I se generaron fragmentos de 4295 bp y 321 bp. La digestión con la enzima *Sca*I generó fragmentos de 2471 bp y 2145 bp. Los patrones de restricción con cada una de las enzimas fueron los esperados.

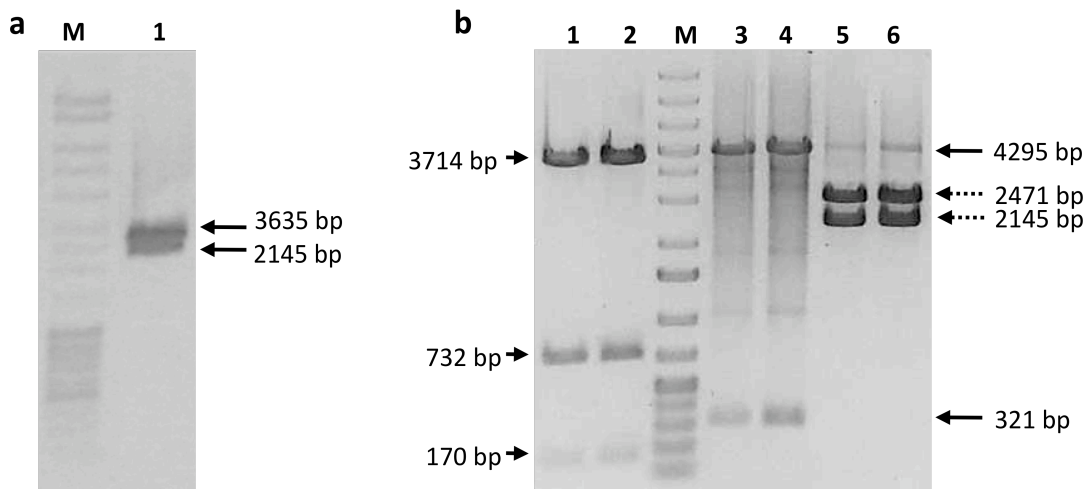


Figura 5. Caracterización de los vectores pPitx3_1.7-GFP y pPitx3_0.6Kb-GFP. a) Carril 1 plásmido pPitx3_1.7Kb-GFP digerido con *Sca*I. b) Carriles 1-2 plásmido pPitx3_0.6Kb-GFP digerido con *Not*I (flechas cortas). Carriles 3-4 plásmido pPitx3_0.6Kb-GFP digerido con *Nhe*I (flechas con línea sólida). Carriles 5-6 plásmido pPitx3_0.6Kb-GFP digerido con *Sca*I (flechas con línea punteada). M marcador de peso molecular.

3.2 Expresión de la GFP dirigida por el promotor de 0.6 Kb del gen *pitx3* en una línea celular de neuroblastoma.

Para evidenciar la funcionalidad promotora de alguna de las regiones del promotor Pitx3, se transfectó la línea celular N1E-115 con los vectores recombinantes construidos. Los vectores que contienen los fragmentos de 4.2 Kb, 5.2 Kb y 1.7 Kb no expresaron la GFP. Mientras que el vector que contiene el fragmento de 0.6 Kb dirigió la expresión del gen reportero, aunque sólo en un 10% de las células transfectadas. Como control positivo de la transfección se utilizó el pGreenLantern-1, el cual contiene el promotor CMV. Este promotor dirigió la expresión de la GFP en aproximadamente el 35% de las células transfectadas (figura 6).

Debido a la expresión de la GFP dirigida por el promotor de 0.6 Kb en las células N1E-115, nos interesó determinar el fenotipo de esta línea celular. Para esto, se realizó la detección de marcadores como TH, DAT, Nurr1 y Pitx3 por inmunofluorescencia (figura 7). Se observó la expresión de TH y Nurr1 con el patrón de localización celular esperado; pero el patrón de DAT no concuerda con el patrón de una proteína de membrana y el patrón de Pitx3 fue citoplasmático y no nuclear como se reporta para esta proteína. Por lo que se realizó RT-PCR para la detección cualitativa de estos marcadores (figura 8). Se amplificó el mRNA de TH y Nurr1 pero no se detectó amplificación del mRNA de DAT ni de Pitx3; por lo que se confirma que las células N1E-115 son TH⁺ y Nurr1⁺ pero DAT⁻ y Pitx3⁻. Para el RT-PCR, se utilizó como control positivo mRNA extraído del VTA y la sustancia negra de ratón. Como control interno, se amplificó el gen *actina*.

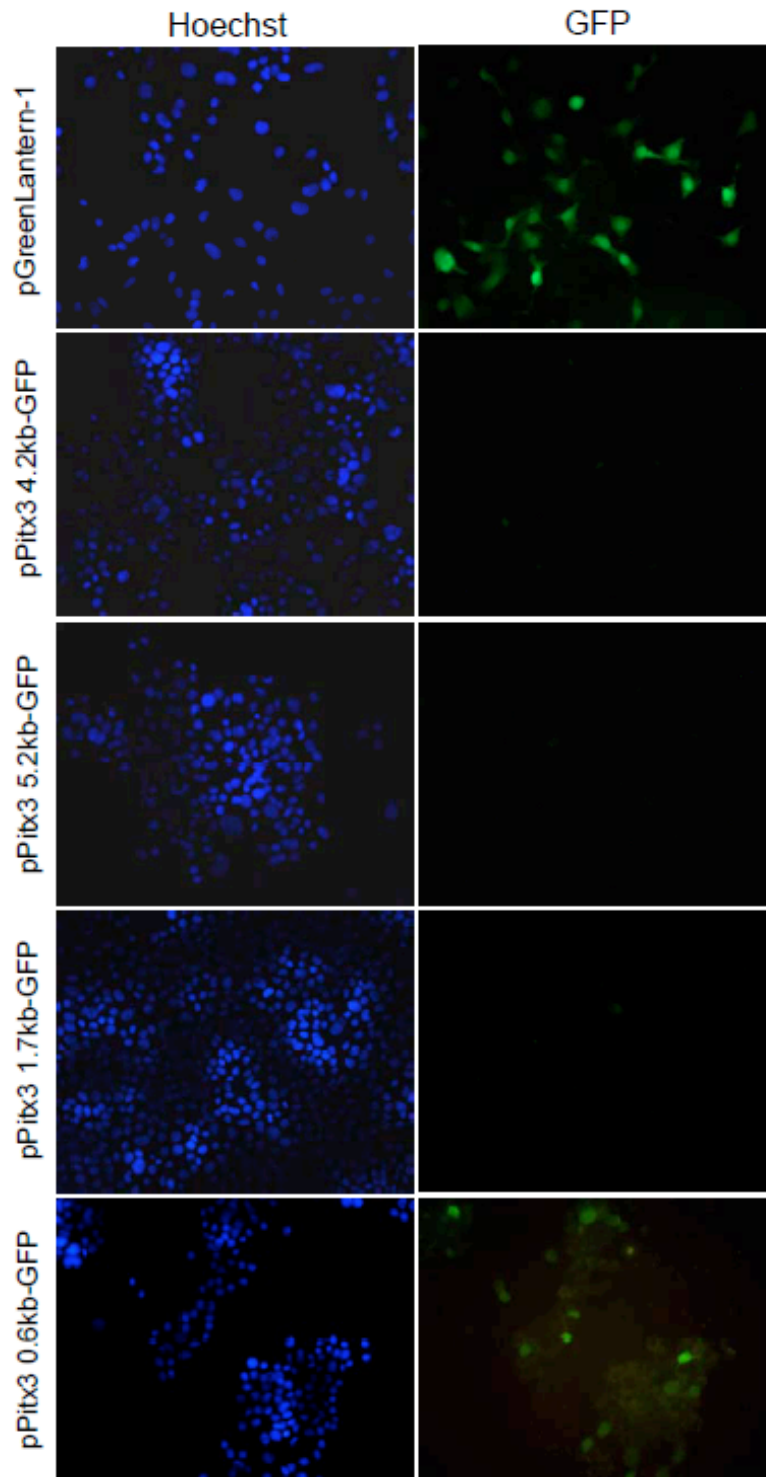


Figura 6. Expresión de la GFP en células N1E-115. La expresión de la GFP fue observada en las células transfectadas con el vector pPitx3_0.6Kb-GFP y con el pGreenLantern-1. En las células transfectadas con los vectores pPitx3_4.2Kb-GFP, pPitx3_5.2Kb-GFP y pPitx3_1.7Kb-GFP no se observó la expresión de la GFP. Los núcleos fueron contrateñidos con Hoechst. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia con el objetivo 20x.

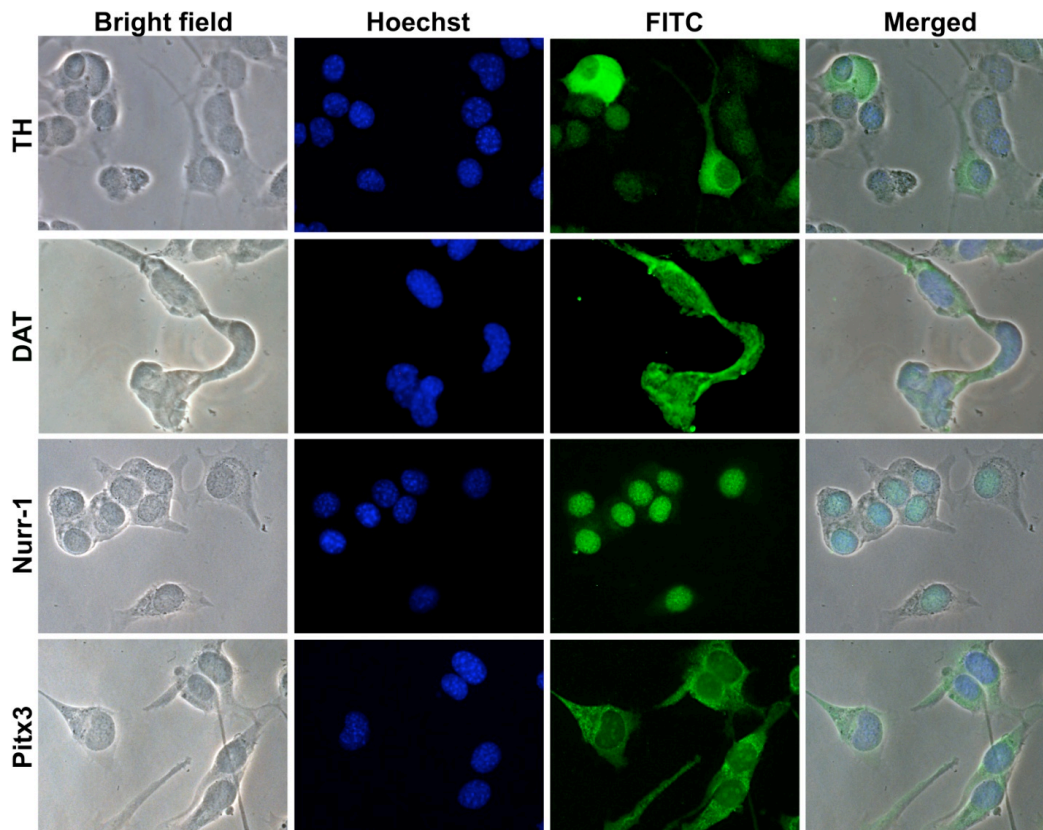


Figura 7. Expresión de TH y Nurr1 en células N1E-115. Se realizó la detección de los marcadores TH, DAT, Nurr1 y Pitx3 en las células N1E-115. Se muestran imágenes a campo claro para evidenciar el contorno celular. La detección de los marcadores se realizó utilizando anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios marcados con FITC. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia con el objetivo 40x.

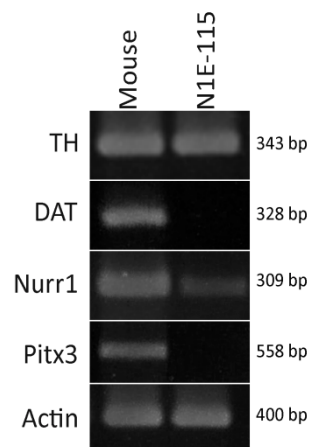


Figura 8. Expresión de mRNA de TH y Nurr1 en células N1E-115. Se realizó la detección de TH, DAT, Nurr1 y Pitx3 por RT-PCR. En la primera columna se muestran los fragmentos amplificados del cDNA sintetizado a partir del RNA extraído del VTA y SN de ratón. En la segunda columna se muestran los fragmentos amplificados del cDNA sintetizado a partir del RNA extraído de células N1E-115. Se señalan los tamaños de cada uno de los fragmentos amplificados.

3.3 Transfección *in vivo* mediante el NT-poliplex para evaluar la actividad promotora de las diferentes versiones del promotor Pitx3.

Para evaluar *in vivo* la capacidad promotora de las regiones clonadas, se utilizó el sistema NT-poliplex. Para ensamblar el NT-poliplex, fue necesario como primer paso, determinar la concentración óptima de Péptido Cariofílico (PK) que se uniría a cada plásmido. Dicha determinación se realizó mediante la electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos unidos a diferentes concentraciones del PK. La unión del péptido al plásmido genera un retardo en el corrimiento del DNA en el gel de agarosa debido a la neutralización de las cargas negativas en la molécula ácida. Cuando el retardo se posiciona en el punto medio de la banda de DNA sin PK se considera la concentración óptima del péptido. Siguiendo este criterio, se determinó que la concentración óptima de PK para cada plásmido transfectado fue de 6 μ M para pGreenLantern-1 y 8 μ M para pPitx3_4.2Kb-GFP y pPitx3_0.6Kb-GFP (figura 9).

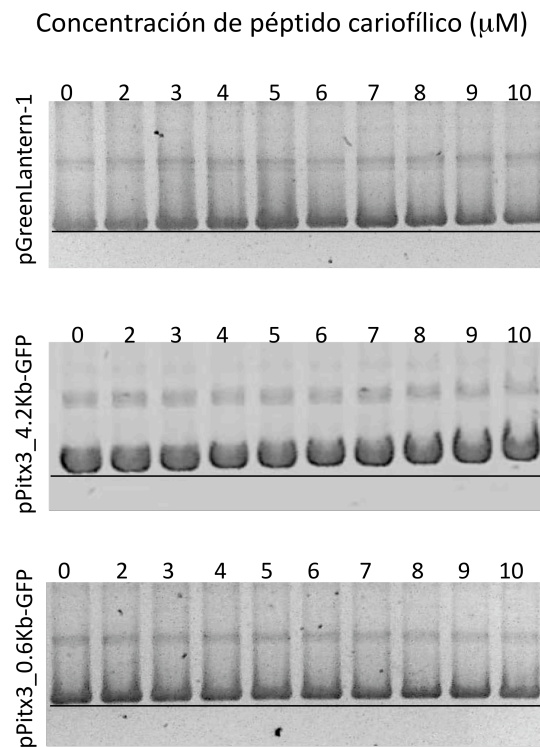


Figura 9. Determinación de la concentración óptima de PK. Los números superiores indican la concentración de PK unida al plásmido en cada uno de los carriles. La concentración de plásmido en todos los carriles es de 6nM.

Una vez determinada la concentración del PK unido a cada plásmido, fue necesario determinar la relación molar óptima del acarreador. Esto se realizó mediante la electroforesis en gel de agarosa del complejo DNA:PK unido a diferentes relaciones molares del acarreador. Al unirse el acarreador al complejo DNA:PK y aplicar un campo eléctrico, se genera la retención de la nanopartícula en el pozo del gel de agarosa debido a la neutralización de las cargas negativas del DNA. La relación molar óptima es aquella donde se observa mayor retención en el pozo del gel de agarosa. Siguiendo este criterio, se determinó la relación molar óptima para cada uno de los plásmidos transfectados. Para el plásmido pGreenLantern-1 fue de 1:24 y para los plásmidos pPitx3_4.2Kb-GFP (figura 10) y pPitx3_0.6Kb-GFP fue de 1:27.

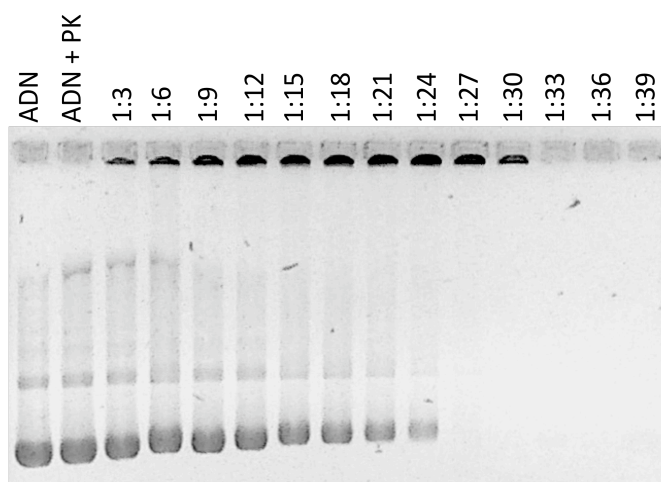


Figura 10. Determinación de la relación molar óptima del acarreador para pPitx3_4.2Kb-GFP. El primer carril corresponde al plásmido pPitx3_4.2Kb-GFP. El segundo carril corresponde al plásmido con $8\mu\text{M}$ de PK. El resto de los carriles corresponden al plásmido con $8\mu\text{M}$ de PK y con el acarreador en las relaciones molares mencionadas en la parte superior de la figura. Las bandas que se observan en los carriles donde fueron cargadas las muestras corresponden a la retención del plásmido generada por la neutralización de cargas negativas del DNA al formar el complejo con el acarreador. En los últimos tres carriles no se observan bandas de DNA ya que migraron al polo negativo debido al incremento en las cargas positivas proporcionadas por el acarreador.

Después de determinar la concentración de PK y la relación molar óptima del acarreador, se ensambló cada plásmido con el NT-poliplex. Para la transfección *in vivo*, se realizó la inyección de cada uno de los plásmidos ensamblados con el NT-poliplex, en la región mesencefálica de ratas mediante cirugía estereotáxica. Las ratas fueron sacrificadas 8 días después de la transfección para analizar la expresión de la GFP. Se detectó la expresión de la GFP en la SN de ratas transfectadas con el pGreenLantern-1 utilizado como control positivo. En las ratas transfectadas con el pPitx3_4.2Kb-GFP no se detectó la expresión del gen reportero (figura 11).

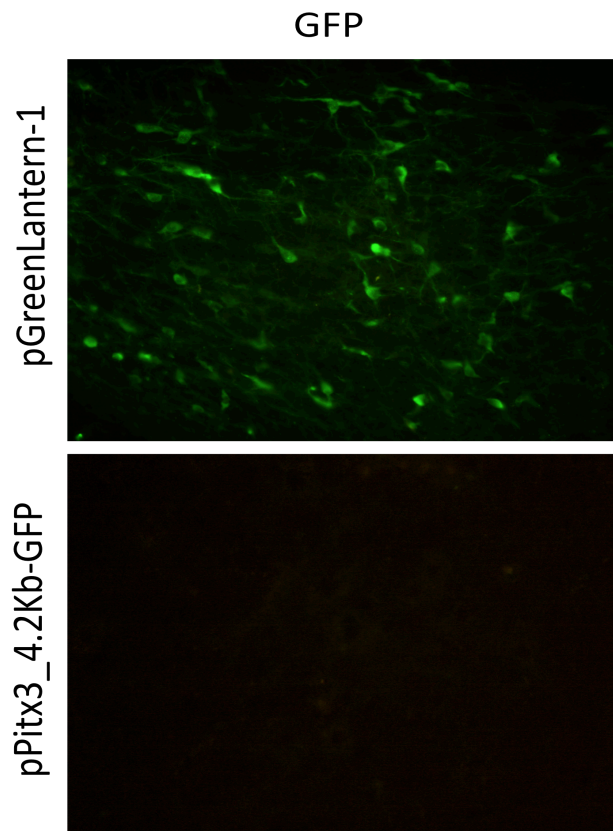


Figura 11. Ausencia de actividad promotora de la secuencia de 4.2 Kb del gen *pitx3* en neuronas dopaminérgicas de la SN. Los cortes de cerebro fueron teñidos por inmunofluorescencia. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia en objetivo 20x.

CAPITULO IV

Discusión

Discusión

Pitx3 es un factor de transcripción que comienza a ser expresado en el cristalino, músculo esquelético y NDM en la etapa embrionaria y continúa con su expresión hasta la etapa adulta exclusivamente en las NDM¹². Se ha demostrado que Pitx3 es importante para el desarrollo, supervivencia y mantenimiento de éste grupo neuronal^{60,21,19}. El patrón de expresión altamente específico del gen *pitx3* lo hace un excelente candidato para el envío dirigido de genes a las NDM utilizando su región promotora cuya delimitación aún se desconoce.

Como primer abordaje para seguir esta estrategia de terapia génica, nuestro grupo clonó la región de 4.2 Kb del gen *pitx3* murino. En los ensayos *in vitro*, se observó que el promotor de 4.2 Kb dirigió la expresión de la enzima Cre recombinasa en la línea celular SH-SY5Y²³. Aunque, los niveles de expresión de la enzima Cre recombinasa no fueron altos debido a que la línea celular SH-SY5Y es de origen humano. Por lo que se decidió subclonar el promotor de 4.2 Kb para dirigir la expresión del gen reportero GFP en la línea celular N1E-115 de origen murino y demostrar una mejor actividad promotora.

A diferencia de los resultados obtenidos con la línea SH-SY5Y, no se logró detectar expresión del gen reportero GFP en las células N1E-115 transfectadas con el plásmido pPitx3_4.2Kb-GFP. Pensamos que éstos resultados pueden deberse a que las líneas celulares, aunque son células de neuroblastoma, son de diferente origen y pudieran expresar diferentes factores de transcripción y que no estén reconociendo la secuencia de 4.2 Kb del gen *pitx3*. Esta hipótesis se origina debido a que se sabe de la existencia de genes que son regulados por diferentes factores de transcripción dependiendo del tipo celular. Un ejemplo importante, es el gen *th* que contiene elementos de respuesta para Nurr1 y para Pitx3. Cada uno de éstos factores de transcripción, regula la determinación dopaminérgica dependiendo de la subpoblación neuronal en la que se expresen^{10, 61, 62}.

En cuanto a los vectores recombinantes que portan los fragmentos de 5.2 Kb y 1.7 Kb del promotor Pitx3; estos contienen una secuencia altamente conservada del intrón 1. Y consideramos que pudieran existir elementos que regulen de manera negativa la función promotora estos fragmentos, ya que no tuvieron actividad en las células N1E-115.

Considerando la posibilidad de que los fragmentos de 4.2 Kb, 5.2 Kb y 1.7 Kb contengan secuencias que regulen de manera negativa la función promotora en la línea celular N1E-115, construimos el fragmento de 0.6 Kb (anexo 1). Este fragmento contiene secuencias que se han reportado como potenciales cajas CAAT y TATA en la posición -205 a -200 y -86 a -80 respectivamente. En los resultados observamos que el fragmento de 0.6 Kb fue capaz de dirigir la expresión de la GFP en las células N1E-115 pero con bajos niveles de expresión comparado con el promotor fuerte CMV. A pesar de que el fragmento de 0.6 Kb contiene las cajas CAAT y TATA que se consideran parte del promotor mínimo y son necesarias para iniciar la transcripción de muchos genes, éstas secuencias no determinan la especificidad o la fuerza del promotor, ya que esta última característica está determinada por los elementos potenciadores. Debido a que el promotor de 0.6 Kb es una secuencia corta que contiene regiones reguladoras importantes así como el sitio de reconocimiento para iniciar la transcripción, podrían faltarle, tanto las secuencias reguladoras que permitan la especificidad dopaminérgica, así como elementos potenciadores que determinen altos niveles de expresión.

Debido a los resultados observados en las transfecciones con los vectores recombinantes contruidos, en especial por la ausencia de expresión de GFP con el fragmento de 4.2 Kb, decidimos determinar cuáles son los marcadores dopaminérgicos expresados en la línea celular N1E-115, para entender la falta de actividad de este promotor de ratón en la línea de origen murino. Nuestro interés se centró en determinar si hay expresión de Pitx3 endógeno, ya que su presencia seria indicativo de que en las células N1E-115 existen todos los factores de transcripción necesarios para reconocer el promotor recombinante.

En los resultados obtenidos por inmunofluorescencia se observó señal positiva para los marcadores DAT y Pitx3, aunque con un patrón que no era característico para una proteína de membrana y nuclear respectivamente. La técnica de RT-PCR nos permitió determinar que las células N1E-115 no expresan DAT ni Pitx3, ya que es una técnica más sensible al amplificar directamente los mRNA expresados en estas células.

Los resultados obtenidos de la caracterización de la línea celular N1E-115 nos hace pensar que no cuenta con los factores de transcripción necesarios para reconocer la secuencia promotora del gen *pitx3* endógeno, por lo tanto, tampoco podría reconocer las secuencias de los fragmentos de 4.2 Kb, 5.2 Kb y 1.7 Kb de nuestros vectores recombinantes. Con respecto a los resultados de la transfección del fragmento de 0.6 Kb, la expresión de GFP podría no ser específica ya que éste fragmento cuenta con las secuencias consideradas parte del promotor mínimo pero éstas, no determinan la especificidad dopaminérgica.

Si bien es cierto que las líneas celulares son valiosas herramientas en el campo de la biología molecular, los resultados que se obtienen son limitados por el patrón de expresión de genes del tipo celular utilizado. Para el análisis de promotores, que necesitan de factores de transcripción específicos, es necesario realizar los ensayos en sistemas biológicos que cuenten con el microambiente y las combinaciones específicas de proteínas reguladoras que permitan un resultado confiable.

La complejidad y diversidad neuronal depende de la expresión de factores de transcripción que orquestan la regulación de genes ubicuos y específicos. De allí la necesidad de probar in vivo, los vectores recombinantes con los que obtuvimos resultados prometedores. Por lo que decidimos transfectar las NDM de rata con los vectores recombinantes que contienen los fragmentos de 4.2 Kb, debido a su actividad promotora en las células SH-SY5Y²³ y el fragmento de 0.6 Kb debido a su actividad promotora en las células N1E-115.

Con las transfecciones *in vivo*, se descartó la funcionalidad del fragmento de 4.2 Kb, reiterando nuestra hipótesis de que éste fragmento podría contener secuencias que regulan negativamente la expresión del gen reportero, ya que no fue funcional aún en el microambiente en el cual se mantienen las NDM *in vivo*.

CAPITULO V

Conclusiones

Conclusiones

- ∂ El fragmento de 4.2 Kb no tiene actividad promotora *in vivo*.
- ∂ El fragmento de 0.6 Kb tiene actividad promotora *in vitro*, pero carece de especificidad.
- ∂ La línea celular N1E-115 no presenta el fenotipo de una subpoblación de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas que expresan *pitx3*.

Perspectivas

Con el desarrollo del presente trabajo surgen nuevas preguntas que nos interesa responder y nuevos objetivos que plantearnos, como:

- ∂ Identificar las secuencias presentes en los fragmentos de 4.2 Kb, 5.2 Kb y 1.7 Kb que regulan negativamente la expresión del gen reportero.
- ∂ Probar *in vivo* la funcionalidad promotora del fragmento corto de 0.6 kb.
- ∂ Identificar las secuencias reguladoras que determinan la especificidad dopaminérgica del fragmento de 0.6 Kb.
- ∂ Identificar elementos potenciadores que aumenten la expresión de un gen reportero sin afectar la especificidad dopaminérgica.

CAPITULO VI

Bibliografía

Bibliografía

1. Burbach JP, Smits S, Smidt MP. Transcription factors in the development of midbrain dopamine neurons. *Ann N Y Acad Sci* 2003;991:61-68.
2. Simon HH, Bhatt L, Gherbassi D, Sgado P, Alberi L. Midbrain dopaminergic neurons: determination of their developmental fate by transcription factors. *Ann N Y Acad Sci* 2003;991:36-47.
3. Smidt MP, Smits SM, Burbach JP. Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. *Eur J Pharmacol* 2003;480:75-88.
4. Blanchard V, et al. Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;22:29-38.
5. Saucedo-Cardenas O, Conneely OM. Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *J Mol Neurosci* 1996;7:51-63.
6. Zetterstrom RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, Perlmann T. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol* 1996;10:1656-66.
7. Saucedo-Cardenas O, et al. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4013-4018.

8. Castillo SO, et al. Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. *Mol Cell Neurosci* 1998;11:36-46.
9. Zetterstrom RH, et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 1997;276:248-250.
10. Lebel M, Gauthier Y, Moreau A, Drouin J. Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site. *J Neurochem* 2001;77:558-567.
11. Cazorla P, Smidt MP, O'Malley KL, Burbach JP. A response element for the homeodomain transcription factor Ptx3 in the tyrosine hydroxylase gene promoter. *J Neurochem* 2000;74:1829-1837.
12. Smidt MP, et al. A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94: 13305-13310.
13. Gage PJ, Suh H, Camper SA. The bicoid-related Pitx gene family in development. *Mamm Genome* 1999;10:197-200.
14. L'Honoré, et al. Sequential expression and redundancy of Pitx2 and Pitx3 genes during muscle development. *Dev Biol* 2007;307:421-433.
15. Semina EV, Reiter RS, Murray JC. Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum Mol Genet* 1997;6:2109-2116.
16. Tvrdik P, et al. Cig30 and Pitx3 genes are arranged in a partially overlapping tail-to-tail array resulting in complementary transcripts. *J Biol Chem* 1999;274:26387-2692.

17. Rieger DK, Reichenberger E, McLean W, Sidow A, Olsen BR. A double-deletion mutation in the Pitx3 gene causes arrested lens development in aphakia mice. *Genomics* 2001;72:61-72.
18. Semina EV, Murray JC, Reiter R, Hrstka RF, Graw J. Deletion in the promoter region and altered expression of Pitx3 homeobox gene in aphakia mice. *Hum Mol Genet* 2000;9:1575-1585.
19. van den Munckhof P, et al. Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* 2003;130:2535-2542.
20. Smidt MP, et al. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development* 2004;131:1145-55.
21. Smidt MP, Smits SM, Burbach JP. Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 2004;318:35-43.
22. Smits SM, Mathon DS, Burbach JP, Ramakers GM, Smidt MP. Molecular and cellular alterations in the Pitx3-deficient midbrain dopaminergic system. *Mol Cell Neurosci* 2005;30:352-363.
23. Carranza-Castillo DL, Rodríguez-Rocha H, Montes-de-Oca-Luna R, Sepúlveda-Saavedra J, Martínez HR, López-Vidal Y, Saucedo-Cardenas O. Pitx3 promoter directs Cre-recombinase specifically in a human neuroblastoma cell-line. *Mol Cell Biochem.* 2007 Nov 30.
24. Wagner J, et al. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol* 1999;17:653-659.
25. Wang X, et al. Forskolin cooperating with growth factor on generation of dopaminergic neurons from human fetal mesencephalic neural progenitor cells. *Neurosci Lett* 2004;362:117-121.

26. Zetterstrom RH, Williams R, Perlmann T, Olson L. Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res Mol Brain Res* 1996;41:111-120.
27. Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:581-593.
28. Schagen FH, Ossevoort M, Toes RE, Hoeben RC. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50:51-70.
29. Brown DW, Blais BP, Robinson HL. Long terminal repeat (LTR) sequences, env, and a region near the 5' LTR influence the pathogenic potential of recombinants between Rous-associated virus types 0 and 1. *J Virol* 1988;62:3431-3437.
30. Anson DS. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther* 2004;2:9.
31. Fuller M, Anson DS. Can the use of HIV-1 derived gene transfer vectors for clinical application be justified? *Curr Gene Ther* 2004;4:65-77.
32. Robbins PD, Tahara H, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 1998;16:35-40.
33. Chiou HC, Tangco MV, Levine SM, Robertson D, Kormis K, Wu CH, Wu GY. Enhanced resistance to nuclease degradation of nucleic acids complexed to asialoglycoprotein-polylysine carriers. *Nucleic Acids Res* 1994;22:5439-5446.

34. Schaffer DV, Lauffenburger DA. Targeted synthetic gene delivery vectors. *Curr Opin Mol Ther* 2000;2:155-161.
35. Wolfert MA, Dash PR, Nazarova O, Oupicky D, Seymour LW, Smart S, Strohalm J, Ulbrich K. Polyelectrolyte vectors for gene delivery: influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjug Chem* 1999;10:993-1004.
36. Tseng WC, Haselton FR, Giorgio TD. Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1999;1445:53-64.
37. Navarro-Quiroga I, Gonzalez-Barrios JA, Barron-Moreno F, Gonzalez-Bernal V, Martinez-Arguelles DB, Martinez-Fong D. Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;105:86-97.
38. Labat-Moleur F, Steffan AM, Brisson C, Perron H, Feugeas O, Furstenberger P, Oberling F, Brambilla E, Behr JP. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther* 1996;3:1010-1017.
39. Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I, Ochoa I, Alvarez-Maya I, Meraz MA, Luna J, Arias-Montaña JA. Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;69:249-262.
40. Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I. Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor. *Brain Res Brain Res Protoc* 2000;6:13-24.
41. Alvarez-Maya I, Navarro-Quiroga I, Meraz-Rios MA, Aceves J, Martinez-Fong D. In vivo gene transfer to dopamine neurons of rat substantia nigra via the high-affinity neurotensin receptor. *Mol Med* 2001;7:186-192.

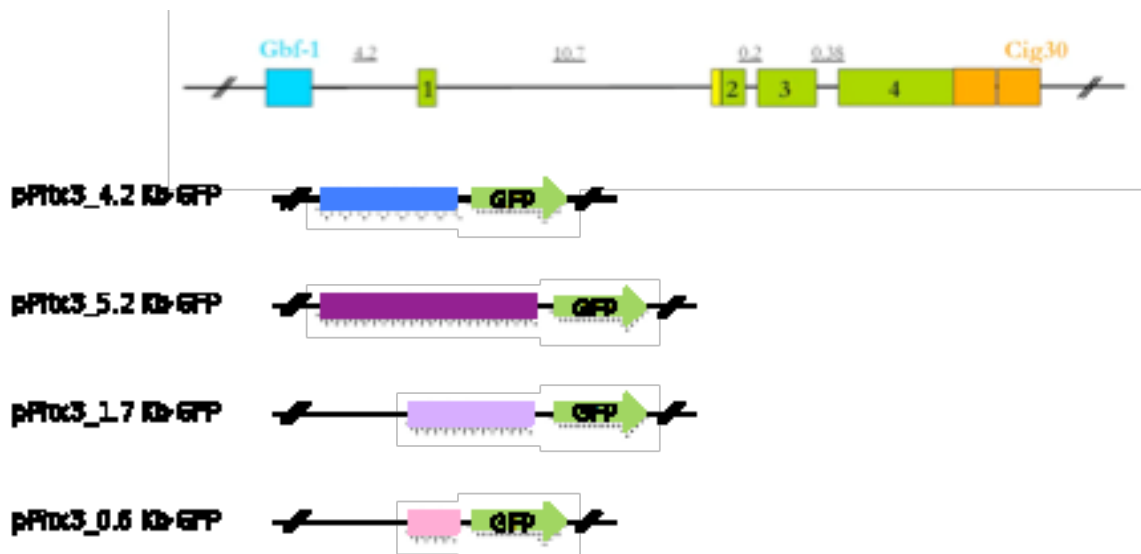
42. Arango-Rodriguez ML, Navarro-Quiroga I, Gonzalez-Barrios JA, Martinez-Arguelles DB, Bannon MJ, Kouri J, Forgez P, Rostene W, Garcia-Villegas R, Jimenez I, Martinez-Fong D. Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:1009-1020.
43. Tyler-McMahon BM, Boules M, Richelson E. Neurotensin: peptide for the next millennium. *Regul Pept* 2000;93:125-136.
44. Gonzalez-Barrios JA, Lindahl M, Bannon MJ, Anaya-Martínez V, Flores G, Navarro-Quiroga I, Trudeau LE, Aceves J, Martinez-Arguelles DB, Garcia-Villegas R, Jiménez I, Segovia J, Martinez-Fong D. Neurotensin-polyplex as an efficient carrier for delivering the human gdnf gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Mol Ther* 2006a.
45. Uhl GR, Kuhar MJ, Snyder SH. Neurotensin: immunohistochemical localization in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:4059-4063.
46. Bissette G, Nemeroff CB, Loosen PT, Prange AJ, Jr. Lipton MA. Hypothermia and intolerance to cold induced by intracisternal administration of the hypothalamic peptide neurotensin. *Nature* 1976;262:607-609.
47. Kitabgi P, Checler F, Mazella J, Vincent JP. Pharmacology and biochemistry of neurotensin receptors. *Rev Clin Basic Pharm* 1985;5:397-486.
48. Nemeroff CB. The interaction of neurotensin with dopaminergic pathways in the central nervous system: basic neurobiology and implications for the pathogenesis and treatment of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 1986;11:15-37.

49. Souza F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, Gompel A, Forgez P. Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res* 2006;66:6243-6249.
50. Barroso S, Richard F, Nicolas-Etheve D, Reversat JL, Bernassau JM, Kitabgi P, Labbe-Jullie C. Identification of residues involved in neurotensin binding and modeling of the agonist binding site in neurotensin receptor 1. *J Biol Chem* 2000;275:328-336.
51. Fassio A, Evans G, Grisshammer R, Bolam JP, Mimmack M, Emson PC. Distribution of the neurotensin receptor NTS1 in the rat CNS studied using an amino-terminal directed antibody. *Neuropharmacology* 2000;39:1430-1442.
52. Tanaka K, Masu M, Nakanishi S. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 1990;4:847-854.
53. Pelaprat D. Interactions between neurotensin receptors and G proteins. *Peptides*. 2006;27:2476-2487.
54. Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:302-309.
55. Johnston KM, Connolly JA, van der KD. Inhibition of axonal transport 'in vivo' by a tubulin-specific antibody. *Brain Res* 1986;385:38-45.
56. Beaudet A, Dournaud P, Boudin H. Complementarity of radioautographic and immunohistochemical techniques for localizing neuroreceptors at the light and electron microscopy level. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:215-223.
57. Burgevin MC, Castel MN, Quarteronet D, Chevet T, Laduron PM. Neurotensin increases tyrosine hydroxylase messenger RNA-positive neurons in substantia nigra after retrograde axonal transport. *Neuroscience* 1992a;49:627-633.

58. Burgevin MC, Laduron PM, Quarteronnet D, Chevet T, Castel MN. Striatal injection of neurotensin increases tyrosine hydroxylase mRNA in substantia nigra. *Ann N Y Acad Sci* 1992b;668:311-313.
59. Amar S, Mazella J, Checler F, Kitabgi P, Vincent JP. Regulation of cyclic GMP levels by neurotensin in neuroblastoma clone N1E-115. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;129:117-125.
60. Nunes I, Tovmasian LT, Silva RM, Burke RE, Goff SP. Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Science* 2003; 100:4245-4250.
61. Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TH and Gage FH. Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* 1999; 126:4017-4026.
62. Korotkova TM, Ponomarenko AA, Haas HL, Sergeeva OA. Differential expression of the homeobox gene Pitx3 in midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci*. 2005; 6:1287-93

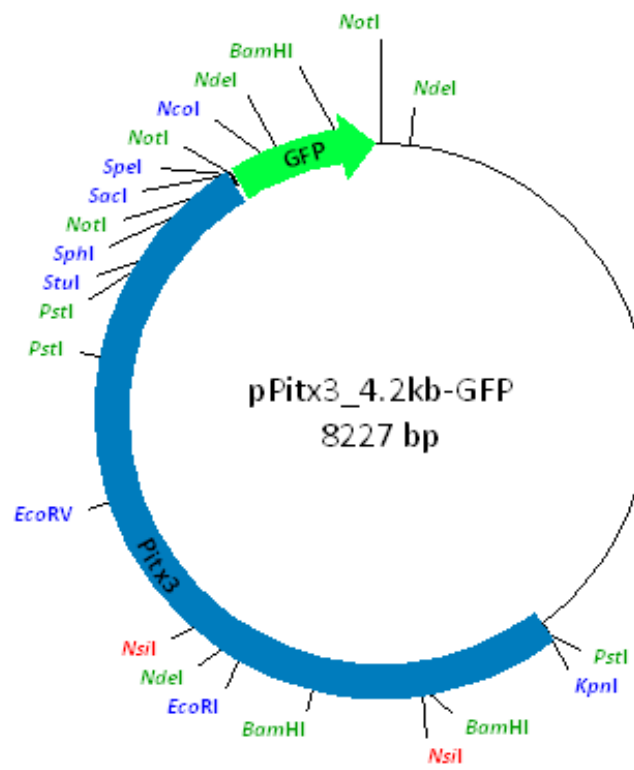
ANEXOS

Anexo 1



Vectores construidos que contienen los diferentes fragmentos promotores del gen *pitx3*. Los diagramas de las diferentes regiones promotoras muestran la región clonada en cada uno de los vectores y su localización con respecto al locus del gen *pitx3*.

Anexo 2



pPitx3_4.2Kb-GFP

1 GGCCGCTCTA GCTTGGGATC TTTGTGAAGG AACCTTACTT CTGTGGTGTG
51 ACATAATTGG ACAAACTACC TACAGAGATT TAAAGCTCTA AGGTAAATAT
101 AAAATTTTTA AGTGTATAAT GTGTTAAACT AGCTGCATAT GCTTGCTGCT
151 TGAGAGTTTT GCTTACTGAG TATGATTTAT GAAAATATTA TACACAGGAG
201 CTAGTGATTG TAATTGTTTG TGTATTTTAG ATTCACAGTC CCAAGGCTCA
251 TTTCAGGCC CTCAGTCCTC ACAGTCTGTT CATGATCATA ATCAGCCATA
301 CCACATTTGT AGAGGTTTTA CTTGCTTTAA AAAACCTCCC ACACCTCCCC
351 CTGAACCTGA AACATAAAAT GAATGCAATT GTTGTGTTA ACTTGTTTAT
401 TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTTCACAA
451 ATAAAGCATT TTTTTCCTG CATTCTAGTT GTGGTTTGTC CAAACTCATC
501 AATGTATCTT ATCATGTCTG GATCGATCCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC
551 GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG CGTATTGGCT GGCCTAATAG CGAAGAGGCC
601 CGCACCGATC GCCCTTCCCA ACAGTTGCGC AGCCTGAATG GCGAATGGAC
651 GCGCCCTGTA GCGGCGCATT AAGCGCGGCG GGTGTGGTGG TTACGCGCAG
701 CGTGACCGCT ACACTTGCCA GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT TTCGCTTTCT
751 TCCCTTCCTT TCTCGCCACG TTCGCCGGCT TTCCCCGTCA AGCTCTAAAT
801 CGGGGGCTCC CTTTAGGGTT CCGATTTAGT GCTTTACGGC ACCTCGACCC
851 CAAAAAATT GATTAGGGTG ATGGTTCACG TAGTGGGCCA TCGCCCTGAT
901 AGACGGTTTT TCGCCCTTTG ACGTTGGAGT CCACGTTCTT TAATAGTGGA
951 CTCTTGTTCC AAACCTGGAAC AACACTCAAC CCTATCTCGG TCTATTCTTT
1001 TGATTTATAA GGGATTTTGC CGATTTTCGGC CTATTGGTTA AAAAATGAGC
1051 TGATTTAACA AAAATTTAAC GCGAATTTTA ACAAATATT AACGTTTACA
1101 ATTTTCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT
1151 ATTTTTCTAA ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGCCA GGTCTTGGAC
1201 TGGTGAGAAC GGCTTGCTCG GCAGCTTCGA TGTGTGCTGG AGGGAGAATA
1251 AAGGTCTAAG ATGTGCGATA GAGGGAAGTC GCATTGAATT ATGTGCTGTG
1301 TAGGGATCGC TGGTATCAAA TATGTGTGCC CACCCCTGGC ATGAGACAAT

1351 AACCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT
1401 CAACATTTCC GTGTCGCCCT TATTCCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC
1451 TGTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC
1501 AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG
1551 ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT
1601 TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTATTGAC GCCGGGCAAG
1651 AGCAACTCGG TCGCCGCATA CACTATTCTC AGAATGACTT GGTTGAGTAC
1701 TCACCAGTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT
1751 ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC
1801 TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG
1851 GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC
1901 CATACCAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGTAGCA ATGGCAACAA
1951 CGTTGCGCAA ACTATTAACT GGCGAACTAC TTAGCTTAGC TTCCCGCAA
2001 CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG
2051 CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGTATTATGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG
2101 AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC
2151 TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA
2201 ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT
2251 AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAAACCT
2301 CATTTTTAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT
2351 GCCATAACTT CGTATAATGT ATGCTATACG AAGTTATGGC ATGACCAAAA
2401 TCCCTTAACG TGAGTTTTTCG TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG
2451 ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTTT CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT
2501 GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTGGTTTTG CCGGATCAAG
2551 AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAACGT GCTTCAGCAG AGCGCAGATA
2601 CCAAATACTG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA
2651 CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT GCTAATCCTG TTACCAGTGG
2701 CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA
2751 TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC TGAACGGGGG GTTCGTGCAC

2801 ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC
 2851 GTGAGCATTG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GGCGGACAGG
 2901 TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC
 2951 AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT
 3001 GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG
 3051 AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC
 3101 TTTTGCTCAC ATGCTCGTTT AGTGAACCGT CAGATCGCCT GGAGACGCCA
 3151 TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA TCCAGCCTCC
 3201 GGACTCTAGC CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT ATTTAGGTGA CACTATAGAA

 PstI KpnI
 3251 GGTACGCCTG CAGGTACCGC TCAGCCAATC AGAGCGTGGC ACTCTGAAAA
 3301 GTGGCATTCC GACTATCCAA TCGAAGAAAG AAATTAGCTC TGGGAGGCGT
 3351 GCAATGCCCA AAGAGACCAG ATTACAAGGG AAAGAAGAGT AGGTAGGGGA
 3401 CAGCCAACGG ATACGAGGAT TCTCTGACTG ACAGTTACAG AAGCCAATAA
 3451 ACAATGAAAA ATTGTGCTGG GCGGTTGAAG AGGTGGGGTC AGATAGGGTT
 3501 CGGTTGCAGT GCGCTGTTTA GCAGTGGCTG CTGGGCATCC TGGGCAGGAA
 3551 GGCTATGATT TGCTGGAAAG GGGGCGGGGT CCGTTTTGAG AGCTTGAGCG
 3601 GGGGACCCTA CTCCCCAACT TCATCCTACC AAAGTCACCT GGGCTTTACT
 3651 ACTTTAGGGA TCGCTCTCTT TCCAGGCAGG TCTGGGGTTG AAACGCGTTC
 3701 CTAAATTCGG CCCGTGCAAT CTTGCCTACG CCCTCCTGTC TTCTGTGCC
 3751 CACTTGGGTA TATGTGCCTG TCTCATCCTA ACTCTGATTT TTGCATTTTC
 3801 TACTCCATTC CTACCATCCA GAAATAGAGA AAATGGTAGC AGAAATCTTG
 3851 GATACCTAAT TAGAGTATCC TCATTTTCCA GACGTGGAAA GAGTTCTACC

 BamHI NsiI
 3901 GAGGAAAGCT GGATCCATGC ATAGCAGAGA AAAACATACA CCTACCCAG
 3951 CCAATTCGGT GCGGAGAGTA AGGGGCATGG GGGTACTTAA TACTTCTTTT
 4001 TAAAAAGAAA GAATTTGTCT ATTTTAAGAT AATGCTCTTA GCCACTAAAC
 4051 CATCTCTCCA GCCTCCCTCA ATACTTGGTA TACCTTACTC CATAGGGCTA
 4101 TATGACTCTC AGTTCAGCCC TTCCTATTAA GCCTTGGACA AATCTTAATG

4151 AACGATTGGT GGAGGTGTAT GAGGATCAAG TCTGAGGGCC TAATCTCACA
 4201 CCATTAGTCC ACATCGTTAA CAAAAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA
 4251 GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGATGAT GATGATGATT TCCCATTTTC
 4301 CTTCGAAATG CGGACAGGTG ARACTGGAAA GGAAGCTTAG CAGTTAAGTG
 4351 TGCTTGCTGC TCTTCCAGAA GACCTGAGTT CAGTTCCCAG GATGTACATA

BamHI
 4401 GCACTATCTA CTGTAACTCC AGCTCCAGAG GGATCCAACA CTTTGGGCAC
 4451 ATACTCACAC AGAGACACGC GCGCTCTCGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT
 4501 GTGTGTGTGT GAGAGAGAGA GAGAGGGGGG GGGAGAGAGA GAGAGAGAGA
 4551 GAGAGAGAGA GAGAGAGAGA GAGAGAGAGA GAGAGATCTT TCTGTAACCC
 4601 TGGCTACTGA CTGTCCTTGA AGCACAGGCT GGCTTCAACC TCACAGAGAT
 4651 CTACCTGCCA CTGCCTCCCA AATGCTGCAC CACTATGCCA GGCACAGACA
 4701 CATACATTTT AAATAATAAA AAATAAATCT TTTGTTTGTG TGTTTTTTCAA

EcoRI
 4751 AACAGAGTTT CTCTGGGTAA CAGCCCTGGC TGCCCCTGGC TGCCCCTGGAA
 4801 TTCACTTTGT AGACCAGGCT GGCCTCGAAC TCAGGTCTGT CTGCCTGCCT

NdeI
 4851 CTGCCTCTCA AGTGCTGGGA TTAAAGTCAT ATGCTACCAT GTCCAGCAA
 4901 GCAAACCTTT TCTAAGGCCA TTGGAATGTG GCCTTGAAAC AGGCACCCAA
 4951 GGCATCCATA GGTTATGATC CTCTAATTTA AAAAACCATC AGAGCCAAAT

NsiI
 5001 CCAATATGAA GAATCCCCCA ACAACTCCCT GTGTCTATGC ATTGGTCTTG
 5051 GTCTCTAGGT CCAGCTAGGA ACCTAAAGGA AGTCAGATGA AGATGATACG
 5101 ATCACCAAGG TATTTTCATTC TATGATACCT CTGAGCCATT TTTCTCTTCG
 5151 TTTGGTCTTT AGGGCTTCTC TCAGGTTGGA GAGCAAATAG GAAAACCCTG
 5201 TAAGTAACT AAAACTCCCT ACTCTCCCCT CCCTATCTAG GTATGCCTCC
 5251 AGACATTAGA CATCTTAGAA GTATGTGATT ATCAATTAAA GATGGAGAGA
 5301 GAGACAGAGA GAAAGCAATC CCCAGCCCCT CACAGGTGCT ACACATCATT
 5351 TAACAGATAA AACAGGTTTT TTTTTTATTT ATTTTCAGTGC AACATTTATT
 5401 GAGTTCCTTT TTCCTTCTCT CTCCAGCCCC TTTTCGCTCCA GCCCAGAGAT
 5451 TTATTTATTT ATTATATGTA AGTACACTGT AGCTGTCTTC AGACACACCA

5501 GAATCAGAGG GCATCAGATC CCATTACAGA TGGTTGTGAC CCACCATGTG
5551 GTTGCTGGGA TTTGAACTCA GGACCTCTGG AAGAGCAGTC AGTGCGCTTA
5601 ACCGCTGAGC CATCTCTCCA GCCCCCCATT TATTGAGTTT CTATATGCCT
5651 GTGAATAGAA AAAGAGGAAA GAAATGCTTC TTGTTCTCCT AAATTTTATT

EcoRV

5701 TTATACAAGT CAACACATCA GTTGATTCTT TCAATATGGA GGATGGAGTG
5751 ATATCAAATC TATACATAAG GGGTCATGAG AGCAAGAAGC TACACCTTTG
5801 GCCAGCCTGG AAGTTCAGGC AAGGCTTCTC AGATAAAACA GAACCTAAGT
5851 GGAACTCAGA AATTAGGATC AGCAATATAA CGACTGTTTT TGTTGTTGTT
5901 GTTGTTGTTT TTTGTTGTTG TTGTTGTTTT TTTTGTTTTT TGTTTTTGTT
5951 CAGGAAAAAT TAGAGGTCGT TCAGGATGAA CAAAAC TGAA GATGAAGACA
6001 AATCAGGGCA CTCAGTACAA TGCACAGAGG TAGGATAATA GTTGAACGTT
6051 TAGGGCCAGC CAAAACCAGA GAGCTACAGA GCAAGACTCT ATTGAAGGGG
6101 GGATTGGAAG TTCAGGTCCT GAAGATCAAA TATGCCACAT TAGGAAACTT
6151 TGACTTTCTC CTGAAGGCAG TAAAGAGAAC TATCGTGCTT TAAAAATTGA
6201 TACGTATGCT TAGATTCATC TTTGGAGCAT ACTGCACGGG GCTTAAGGAC
6251 TCTCAGGGG ACTAAGTAAC CCGCCTGTCA TACTCCTTGG ACACCTGTCC
6301 TGTCCCTTGC AAACACTTAA TCCAAAAACG CCAACGCTAC CCTTACCCAC
6351 AGGACCAAAT CTGTTGTCGT GGGAAACACG ACACGGCTGA GGCCAGGAAA

PstI

6401 GCACAGCCCA GGCAAATTGA TAACTGCAGC GTGAGAGGCC GAGTGCTCAC
6451 ACCTTTGAAG CACACAAGGC CAGACAGCCA CTGGAAGCCA GGGAGGCATC
6501 GTTGTTACTT GTCCAAGGTC AGTGAGTGAG GGAAGATGCT GCTGTATAAC
6551 ACTTTGATTT CTCTCGTTCC AAATCCTGCT TTCTCCAAGT TATCTTCTTT
6601 AGGGGAGAAA AAAAAAATA GAGATAGCTA AGGAGAGAAA GATAGGATGG
6651 AAAGGAGGGG TGGTCTTTAA AAAAGAAAGC CTTTCGAAGT GATAGAGTAG
6701 GGAGCAAAGC GGTGGTCAGA AGAAAAAGG AAGGCGCACG AGGACTGGAA
6751 TAGAGACAAA AGAGTGAAAA GACAGACAGC GACAAGTGGA GAAAATCGGC
6801 GAAACGAGCG GCAGCAAAGT GTGGGAGCTG AGACCCGACA GCCGGGTTCT

PstI

6851 CTGTCCCGCC TGACGGTCCT GCAGCCGTCT CCCC GG CAC TGCTTCTCGT

StuI

6901 GACTCCGGGG AGAGCCCAAG GCCTCAATTA GCCACAGTTC GGGCTGGACT

6951 CAGGGGCGAC ACGGACCACC GTACTTTTGC TAGCTTTGCC GAACCCGAGA

7001 GTCCCAGCTG GAGCGCAGTC CGGGCCACGT GGGGAGGGGG CGTTGCTCAG

7051 TGGATGGCAA ACGCTTCTGA TTGGCCATAG GGGCGGAGTT CTTGGCTGCC

7101 GGGTGGCAGG ACCCCTCCCA CTAAGGTGGG GCCTAAAGGT TCACAGCTGG

7151 AAAGGGAGGA GCAAGGGCGG CGCATCTGGA AAGGGGCGGG CCTGGGGCGC

SphI

7201 GCGGCATGCT GCGGCGGGCT GGGGGCGCCC TGGGTTGCCA TAAAGTGAAT

7251 GGGCGCCGGC GGGGGGTGGC ACTGCACTGT GAGACTCACT CTCTCCTCCG

NotI

7301 CTAGCCTGGG AGAGCCCAGC GGAGCGGCCG CCCCAGAGCA GGGGGGCGGC

7351 CCCACCCCG CAGGGTGCCT GGCCCTGGC CCCTGCCTGC GCTCCAGAAC

7401 GCCGCCGCCA CAGCCACCAC CCGGAGTCTG CCTGCTGCGG GACGCACTGT

SacI SpeI NotI

7451 GAGTACTTGA CCATGCAGGC CCCCTCGACG AGCTCACTAG TCGGCGGCCG

7501 CCGCCACCAT GAGCAAGGGC GAGGAACTGT TCACTGGCGT GGTCCCAATT

7551 CTCGTGGAAC TGGATGGCGA TGTGAATGGG CACAAATTTT CTGTCAGCGG

7601 AGAGGGTGAA GGTGATGCCA CATA CGGAAA GCTCACCTG AAATTCATCT

NcoI

7651 GCACCACTGG AAAGCTCCCT GTGCCATGGC CAACACTGGT CACTACCTTC

NdeI

7701 ACCTATGGCG TGCAGTGCTT TTCCAGATAC CCAGACCATA TGAAGCAGCA

7751 TGACTTTTTT C AAGAGCGCCA TGCCCGAGGG CTATGTGCAG GAGAGAACCA

7801 TCTTTTTTCAA AGATGACGGG AACTACAAGA CCCGCGCTGA AGTCAAGTTC

7851 GAAGGTGACA CCCTGGTGAA TAGAATCGAG TTGAAGGGCA TTGACTTTAA

7901 GGAAGATGGA AACATTCTCG GCCACAAGCT GGAATACAAC TATAACTCCC

7951 ACAATGTGTA CATCATGGCC GACAAGCAAA AGAATGGCAT CAAGGTCAAC

BamHI

8001 TTCAAGATCA GACACAACAT TGAGGATGGA TCCGTGCAGC TGGCCGACCA

8051 TTATCAACAG AACACTCCAA TCGGCGACGG CCCTGTGCTC CTCCAGACA

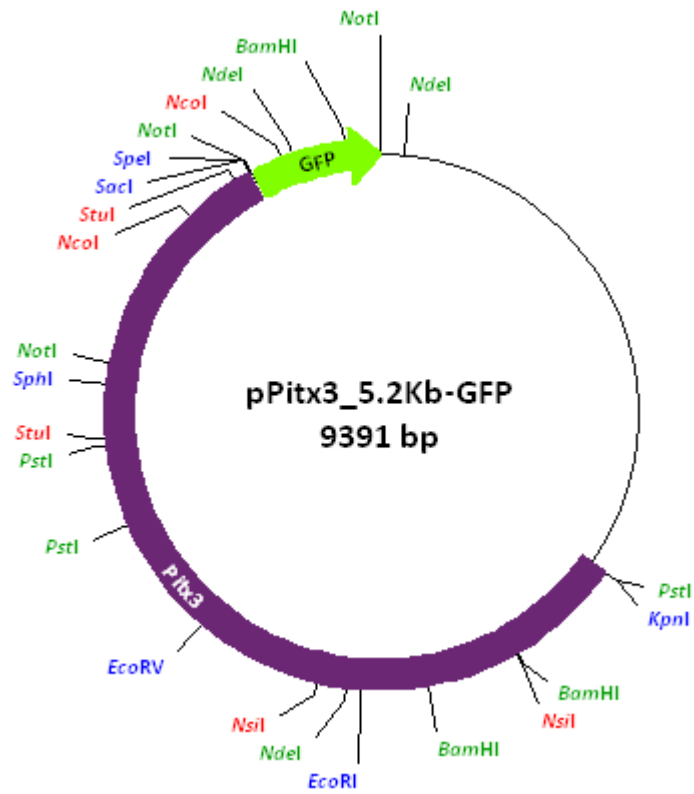
8101 ACCATTACCT GTCCACCCAG TCTGCCCTGT CTAAAGATCC CAACGAAAAG

8151 AGAGACCACA TGGTCCTGCT GGAGTTTGTG ACCGCTGCTG GGATCACACA

NotI

8201 TGGCATGGAC GAGCTGTACA AGTGAGC

Anexo 3



pPitx3_5.2Kb-GFP

1 GGCCGCTCTA GCTTGGGATC TTTGTGAAGG AACCTTACTT CTGTGGTGTG
51 ACATAATTGG ACAAACTACC TACAGAGATT TAAAGCTCTA AGGTAAATAT
101 AAAATTTTTA AGTGTATAAT GTGTTAAACT AGCTGCATAT GCTTGCTGCT
151 TGAGAGTTTT GCTTACTGAG TATGATTTAT GAAAATATTA TACACAGGAG
201 CTAGTGATTC TAATTGTTTG TGTATTTTAG ATTCACAGTC CCAAGGCTCA
251 TTTCAGGCC CTCAGTCCTC ACAGTCTGTT CATGATCATA ATCAGCCATA
301 CCACATTTGT AGAGGTTTTA CTTGCTTTAA AAAACCTCCC ACACCTCCCC
351 CTGAACCTGA AACATAAAAT GAATGCAATT GTTGTGTTA ACTTGTTTAT
401 TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTTACAAA
451 ATAAAGCATT TTTTTCCTG CATTCTAGTT GTGGTTTGTC CAAACTCATC
501 AATGTATCTT ATCATGTCTG GATCGATCCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC
551 GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG CGTATTGGCT GGCCTAATAG CGAAGAGGCC
601 CGCACCGATC GCCCTTCCCA ACAGTTGCGC AGCCTGAATG GCGAATGGAC
651 GCGCCCTGTA GCGGCGCATT AAGCGCGGCG GGTGTGGTGG TTACGCGCAG
701 CGTGACCGCT ACACTTGCCA GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT TTCGCTTTCT
751 TCCCTTCCTT TCTCGCCACG TTCGCCGGCT TTCCCGTCA AGCTCTAAAT
801 CGGGGGCTCC CTTTAGGGTT CCGATTTAGT GCTTTACGGC ACCTCGACCC
851 CAAAAAATT GATTAGGGTG ATGGTTCACG TAGTGGGCCA TCGCCCTGAT
901 AGACGGTTTT TCGCCCTTTG ACGTTGGAGT CCACGTTCTT TAATAGTGGA
951 CTCTTGTTCC AAACCTGGAAC AACACTCAAC CCTATCTCGG TCTATTCTTT
1001 TGATTTATAA GGGATTTTGC CGATTTTCGGC CTATTGGTTA AAAAATGAGC
1051 TGATTTAACA AAAATTTAAC GCGAATTTTA ACAAATATT AACGTTTACA
1101 ATTTTCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT
1151 ATTTTTCTAA ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGCCA GGTCTTGGAC
1201 TGGTGAGAAC GGCTTGCTCG GCAGCTTCGA TGTGTGCTGG AGGGAGAATA
1251 AAGGTCTAAG ATGTGCGATA GAGGGAAGTC GCATTGAATT ATGTGCTGTG
1301 TAGGGATCGC TGGTATCAAA TATGTGTGCC CACCCCTGGC ATGAGACAAT

1351 AACCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT
1401 CAACATTTCC GTGTCGCCCT TATTCCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC
1451 TGTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC
1501 AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG
1551 ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT
1601 TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTATTGAC GCCGGGCAAG
1651 AGCAACTCGG TCGCCGATA CACTATTCTC AGAATGACTT GGTTGAGTAC
1701 TCACCAGTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT
1751 ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC
1801 TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG
1851 GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC
1901 CATACCAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGTAGCA ATGGCAACAA
1951 CGTTGCGCAA ACTATTAAct GGCGAACTAC TTRACTTAGC TTCCCGCAA
2001 CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG
2051 CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGTATTATGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG
2101 AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC
2151 TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA
2201 ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT
2251 AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAAActT
2301 CATTTTTAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT
2351 GCCATAActT CGTATAATGT ATGCTATACG AAGTTATGGC ATGACCAAAA
2401 TCCCTTAACG TGAGTTTTCG TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG
2451 ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT
2501 GCAAACAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTGTTGTTG CCGGATCAAG
2551 AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAActG GCTTCAGCAG AGCGCAGATA
2601 CCAAATACTG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA
2651 CTCTGTAGCA CCGCTACAT ACCTCGCTCT GCTAATCCTG TTACCAGTGG
2701 CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA
2751 TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC TGAACGGGGG GTTCGTGCAC

2801 ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC
 2851 GTGAGCATTG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GGCGGACAGG
 2901 TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC
 2951 AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT
 3001 GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG
 3051 AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC
 3101 TTTTGCTCAC ATGCTCGTTT AGTGAACCGT CAGATCGCCT GGAGACGCCA
 3151 TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA TCCAGCCTCC
 3201 GGACTCTAGC CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT ATTTAGGTGA CACTATAGAA

PstI KpnI

3251 GGTACGCCTG CAGGTACCGC TCAGCCAATC AGAGCGTGGC ACTCTGAAAA
 3301 GTGGCATTCC GACTATCCAA TCGAAGAAAG AAATTAGCTC TGGGAGGCGT
 3351 GCAATGCCCA AAGAGACCAG ATTACAAGGG AAAGAAGAGT AGGTAGGGGA
 3401 CAGCCAACGG ATACGAGGAT TCTCTGACTG ACAGTTACAG AAGCCAATAA
 3451 ACAATGAAAA ATTGTGCTGG GCGGTTGAAG AGGTGGGGTC AGATAGGGTT
 3501 CGGTTGCAGT GCGCTGTTTA GCAGTGGCTG CTGGGCATCC TGGGCAGGAA
 3551 GGCTATGATT TGCTGGAAAG GGGGCGGGGT CCGTTTTGAG AGCTTGAGCG
 3601 GGGGACCCTA CTCCCCAACT TCATCCTACC AAAGTCACCT GGGCTTTACT
 3651 ACTTTAGGGA TCGCTCTCTT TCCAGGCAGG TCTGGGGTTG AAACGCGTTC
 3701 CTAAATTCGG CCCGTGCAAT CTTGCCTACG CCCTCCTGTC TTCTGTGCCC
 3751 CACTTGGGTA TATGTGCCTG TCTCATCCTA ACTCTGATTT TTGCATTTTC
 3801 TACTCCATTC CTACCATCCA GAAATAGAGA AAATGGTAGC AGAAATCTTG
 3851 GATACCTAAT TAGAGTATCC TCATTTTCCA GACGTGGAAA GAGTTCTACC

BamHI NsiI

3901 GAGGAAAGCT GGATCCATGC ATAGCAGAGA AAAACATACA CCTACCCCAG
 3951 CCAATTCGGT GCGGAGAGTA AGGGGCATGG GGGTACTTAA TACTTCTTTT
 4001 TAAAAAGAAA GAATTTGTCT ATTTTAAGAT AATGCTCTTA GCCACTAAAC
 4051 CATCTCTCCA GCCTCCCTCA ATACTTGGTA TACCTTACTC CATAGGGCTA
 4101 TATGACTCTC AGTTCAGCCC TTCCTATTAA GCCTTGGACA AATCTTAATG

4151 AACGATTGGT GGAGGTGTAT GAGGATCAAG TCTGAGGGCC TAATCTCACA
4201 CCATTAGTCC ACATCGTTAA CAAAAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA
4251 GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGATGAT GATGATGATT TCCCATTTTC
4301 CTTCGAAATG CGGACAGGTG ARACTGGAAA GGAAGCTTAG CAGTTAAGTG
4351 TGCTTGCTGC TCTTCCAGAA GACCTGAGTT CAGTTCCCAG GATGTACATA

4401 GCACTATCTA CTGTAACTCC AGCTCCAGAG GGATCCAACA CTTTGGGCAC

4451 ATACTCACAC AGAGACACGC GCGCTCTCGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT
4501 GTGTGTGTGT GAGAGAGAGA GAGAGGGGGG GGGAGAGAGA GAGAGAGAGA
4551 GAGAGAGAGA GAGAGAGAGA GAGAGAGAGA GAGAGATCTT TCTGTAACCC
4601 TGGCTACTGA CTGTCCTTGA AGCACAGGCT GGCTTCAACC TCACAGAGAT
4651 CTACCTGCCA CTGCCTCCCA AATGCTGCAC CACTATGCCA GGCACAGACA
4701 CATACATTTT AAATAATAAA AAATAAATCT TTTGTTTGT TGTTTTTCAA

4751 AACAGAGTTT CTCTGGGTAA CAGCCCTGGC TGCCCCTGGC TGCCCCTGGAA

4801 TTCACTTTGT AGACCAGGCT GGCCTCGAAC TCAGGTCTGT CTGCCTGCCT

4851 CTGCCTCTCA AGTGCTGGGA TTAAAGTCAT ATGCTACCAT GTCCAGCAAA

4901 GCAAACCTTT TCTAAGGCCA TTGGAATGTG GCCTTGAAAC AGGCACCCAA
4951 GGCATCCATA GGTTATGATC CTCTAATTTA AAAAACCATC AGAGCCAAAT

5001 CCAATATGAA GAATCCCCCA ACAACTCCCT GTGTCTATGC ATTGGTCTTG

5051 GTCTCTAGGT CCAGCTAGGA ACCTAAAGGA AGTCAGATGA AGATGATACG
5101 ATCACCAAGG TATTTTCATTC TATGATACCT CTGAGCCATT TTTCTCTTCG
5151 TTTGGTCTTT AGGGCTTCTC TCAGGTTGGA GAGCAAATAG GAAAACCCTG
5201 TAAGTAACT AAAACTCCCT ACTCTCCCT CCCTATCTAG GTATGCCTCC
5251 AGACATTAGA CATCTTAGAA GTATGTGATT ATCAATTAAA GATGGAGAGA
5301 GAGACAGAGA GAAAGCAATC CCCAGCCCCT CACAGGTGCT ACACATCATT
5351 TAACAGATAA AACAGGTTTT TTTTTTATTT ATTTTCAGTGC AACATTTATT
5401 GAGTTCCTTT TTCCTTCTCT CTCCAGCCCC TTTGCTCCA GCCCAGAGAT
5451 TTATTTATTT ATTATATGTA AGTACACTGT AGCTGTCTTC AGACACACCA

BamHI

EcoRI

NdeI

NsiI

5501 GAATCAGAGG GCATCAGATC CCATTACAGA TGGTTGTGAC CCACCATGTG
5551 GTTGCTGGGA TTTGAACTCA GGACCTCTGG AAGAGCAGTC AGTGCGCTTA
5601 ACCGCTGAGC CATCTCTCCA GCCCCCCATT TATTGAGTTT CTATATGCCT
5651 GTGAATAGAA AAAGAGGAAA GAAATGCTTC TTGTTCTCCT AAATTTTATT

EcoRV

5701 TTATACAAGT CAACACATCA GTTGATTCTT TCAATATGGA GGATGGAGTG
5751 ATATCAAATC TATACATAAG GGGTCATGAG AGCAAGAAGC TACACCTTTG
5801 GCCAGCCTGG AAGTTCAGGC AAGGCTTCTC AGATAAAACA GAACCTAAGT
5851 GGAACTCAGA AATTAGGATC AGCAATATAA CGACTGTTTT TGTTGTTGTT
5901 GTTGTGTTTT TTTGTTGTTG TTGTTGTTTT TTTTGTTTTT TGTTTTTGTT
5951 CAGGAAAAAT TAGAGGTCGT TCAGGATGAA CAAAACGAA GATGAAGACA
6001 AATCAGGGCA CTCAGTACAA TGCACAGAGG TAGGATAATA GTTGAACGTT
6051 TAGGGCCAGC CAAAACCAGA GAGCTACAGA GCAAGACTCT ATTGAAGGGG
6101 GGATTGGAAG TTCAGGTCCT GAAGATCAAA TATGCCACAT TAGGAAACTT
6151 TGACTTTCTC CTGAAGGCAG TAAAGAGAAC TATCGTGCTT TAAAAATTGA
6201 TACGTATGCT TAGATTCATC TTTGGAGCAT ACTGCACGGG GCTTAAGGAC
6251 TCTCAGGGG ACTAAGTAAC CCGCCTGTCA TACTCCTTGG ACACCTGTCC
6301 TGTCCTTGC AAACACTTAA TCCAAAAACG CCAACGCTAC CCTTACCCAC
6351 AGGACCAAAT CTGTTGTCGT GGGAAACACG ACACGGCTGA GGCCAGGAAA

PstI

6401 GCACAGCCCA GGCAAATTGA TAACTGCAGC GTGAGAGGCC GAGTGCTCAC
6451 ACCTTTGAAG CACACAAGGC CAGACAGCCA CTGGAAGCCA GGGAGGCATC
6501 GTTGTACTTT GTCCAAGGTC AGTGAGTGAG GGAAGATGCT GCTGTATAACC
6551 ACTTTGATTT CTCTCGTTCC AAATCCTGCT TTCTCCAAGT TATCTTCTTT
6601 AGGGGAGAAA AAAAAAATA GAGATAGCTA AGGAGAGAAA GATAGGATGG
6651 AAAGGAGGGG TGGTCTTTAA AAAAGAAAGC CTTTCGAAGT GATAGAGTAG
6701 GGAGCAAAGC GGTGGTCAGA AGAAAAAAGG AAGGCGCACG AGGACTGGAA
6751 TAGAGACAAA AGAGTGAAAA GACAGACAGC GACAAGTGGA GAAAATCGGC
6801 GAAACGAGCG GCAGCAAAGT GTGGGAGCTG AGACCCGACA GCCGGGTTCT

PstI

6851 CTGTCCCGCC TGACGGTCCT GCAGCCGTCT CCCC CGGCAC TGCTTCTCGT

StuI

6901 GACTCCGGGG AGAGCCCAAG GCCTCAATTA GCCACAGTTC GGGCTGGACT

6951 CAGGGGCGAC ACGGACCACC GTACTTTTGC TAGCTTTGCC GAACCCGAGA

7001 GTCCCAGCTG GAGCGCAGTC CGGGCCACGT GGGGAGGGGG CGTTGCTCAG

7051 TGGATGGCAA ACGCTTCTGA TTGGCCATAG GGGCGGAGTT CTTGGCTGCC

7101 GGGTGGCAGG ACCCCTCCCA CTAAGGTGGG GCCTAAAGGT TCACAGCTGG

7151 AAAGGGAGGA GCAAGGGCGG CGCATCTGGA AAGGGGCGGG CCTGGGGCGC

SphI

7201 GCGGCATGCT GCGGCGGGCT GGGGGCGCCC TGGGTTGCCA TAAAGTGAAT

7251 GGGCGCCGGC GGGGGGTGGC ACTGCACTGT GAGACTCACT CTCTCCTCCG

NotI

7301 CTAGCCTGGG AGAGCCCAGC GGAGCGGCCG CCCCAGAGCA GGGGGGCGGC

7351 CCCACCCCG CAGGGTGCCT GGCCCTGGC CCCTGCCTGC GCTCCAGAAC

7401 GCCGCCGCCA CAGCCACCAC CCGGAGTCTG CCTGCTGCGG GACGCACTGT

7451 GAGTACTTGA CCATGCAGGG AATAGGGGCT CAGGGGACCG AGGGACCAAG

7501 GCTGGTCTCG GGACTCCTAA AAGGAAACCT GGGGCGGTTG AACTCTGGTG

7551 TTTGGGGAAT CGGTCAAAAG GGAAAAGGCG TATAGTAGCC CCGGGGCTGG

7601 GACATGGGAG AAGGGAAACT CTGAGGAAGG ACGTGGGGGA CTGAGAAGAG

7651 ATTTAGGGGA CTCAGAGAGA AGCCGAAGAA CTGCACGAAC CACAGAGTGG

7701 GTAGTCTGGA AACCTTTACC AGAGAGCACC TTGAAATCTA GGGGCAAGCG

7751 GCAAGGGCCA GAAGGTGATA AGGGTAGCCA ACTGAGGAGA GGGCAGCGGT

7801 CGCTCAGCCT AAGGGCAACA GGCGGCTCGC AGCGCCACTT GGCCAGGCT

7851 TAGACAGACT CCAGCGTCTG GAAGTAGGGG TGCGCGTAGT AGCTCATGCT

7901 TTCCTTCCCA GCTGCTCCGC AGTTGGAATT GGAGCCCTGT TCGGAGAGTC

7951 GCTACTGGGT CAGATGGCCG CTGCGAGCTA CAGGGCCCAA GCTGCCAGCA

8001 CAACGCGACA CGACTGGCAG GTCTGTCTGT GGCCGTTTGG ATCTGGAAGG

8051 GTCCAGATCT GGAGCCTCCT CGGAATCGGA CAGAATGTCA GCGGCACGTG

8101 GGGTTTGGAA CGGATAGAAC GCTTGGGGCG GCAAAGTGGG TCTCTCTGGG

8151 GAGCAGACGA TGTGTCCAGC AGTGGTGAAC GGAATGTCCC TGGCCGACTG

NcoI

8201 GCATGTCCAC CTATCCGGCA GCGCCTGCCC AGCTGCGTTA TGTGCCATGG

8251 GGTGGGCTCG GTGGGTCCCC TGAAATCCCA GCTCCCAGTT TTCAAACCTG

8301 ATTTTGCCTC TCCTGCCCGT TTGGGCCTGA AAGGAGCTGG GAGAGTAAAG

8351 GGTGCAGCAC GGCCTTGGGG CAGGGTTCCT CTGCAAGACA ACCCCCGCTC

8401 CAGCTCAAAG AGATCAGGGC ATCAGTAGAC TTCCCAATC CAAACTGAGG

8451 AAAGACTAAG CCCTACAAAG GGAAGACTAA GCTACAGGGT GCAGCAGCCG

8501 CAGGCCACTC ACAAGCCTCC GAGGGGCTCA GTCCCCTCAC AAACCTCGAAG

StuI

8551 TCAACTGTTA GGCCTTCTTT CTTTCTTTCT AACCTAATT CCAGTACAAC

SacI SpeI

8601 TGACCGGATA CCCTCAAATT CCTAGTCTGG TTGTTAGCCC ACTGAGCTCA

NotI

8651 CTAGTCGGCG GCCGCCGCCA CCATGAGCAA GGGCGAGGAA CTGTTCACTG

8701 GCGTGGTCCC AATTCTCGTG GAACTGGATG GCGATGTGAA TGGGCACAAA

8751 TTTTCTGTCA GCGGAGAGGG TGAAGGTGAT GCCACATACG GAAAGCTCAC

NcoI

8801 CCTGAAATTC ATCTGCACCA CTGGAAAGCT CCCTGTGCCA TGGCCAACAC

8851 TGGTCACTAC CTTACCTAT GGCCTGCAGT GCTTTTCCAG ATACCCAGAC

NdeI

8901 CATATGAAGC AGCATGACTT TTTCAAGAGC GCCATGCCCC AGGGCTATGT

8951 GCAGGAGAGA ACCATCTTTT TCAAAGATGA CGGGAACACT AAGACCCGCG

9001 CTGAAGTCAA GTTCGAAGGT GACACCCTGG TGAATAGAAT CGAGTTGAAG

9051 GGCATTGACT TTAAGGAAGA TGGAACATT CTCGGCCACA AGCTGGAATA

9101 CAACTATAAC TCCCACAATG TGTACATCAT GGCCGACAAG CAAAAGAATG

BamHI

9151 GCATCAAGGT CAACTTCAAG ATCAGACACA ACATTGAGGA TGGATCCGTG

9201 CAGCTGGCCG ACCATTATCA ACAGAACACT CCAATCGGCG ACGGCCCTGT

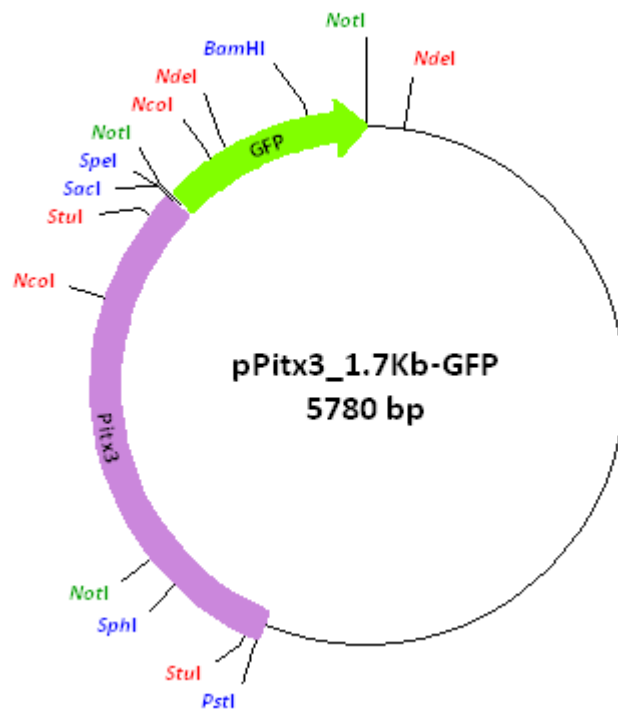
9251 GCTCCTCCCA GACAACCATT ACCTGTCCAC CCAGTCTGCC CTGTCTAAAG

9301 ATCCCAACGA AAAGAGAGAC CACATGGTCC TGCTGGAGTT TGTGACCGCT

NotI

9351 GCTGGGATCA CACATGGCAT GGACGAGCTG TACAAGTGAG C

Anexo 4



pPitx3_1.7Kb-GFP

1 GGCCGCTCTA GCTTGGGATC TTTGTGAAGG AACCTTACTT CTGTGGTGTG
51 ACATAATTGG ACAAACTACC TACAGAGATT TAAAGCTCTA AGGTAAATAT
101 AAAATTTTTA AGTGTATAAT GTGTTAAACT AGCTGCATAT GCTTGCTGCT
151 TGAGAGTTTT GCTTACTGAG TATGATTTAT GAAAATATTA TACACAGGAG
201 CTAGTGATTG TAATTGTTTG TGTATTTTAG ATTCACAGTC CCAAGGCTCA
251 TTTCAGGCC CTGAGTCCTC ACAGTCTGTT CATGATCATA ATCAGCCATA
301 CCACATTTGT AGAGGTTTTA CTTGCTTTAA AAAACCTCCC ACACCTCCCC
351 CTGAACCTGA AACATAAAAT GAATGCAATT GTTGTGTTA ACTTGTTTTAT
401 TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTTCACAA
451 ATAAAGCATT TTTTTCCTG CATTCTAGTT GTGGTTTGTC CAAACTCATC
501 AATGTATCTT ATCATGTCTG GATCGATCCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC
551 GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG CGTATTGGCT GGCCTAATAG CGAAGAGGCC
601 CGCACCGATC GCCCTTCCCA ACAGTTGCGC AGCCTGAATG GCGAATGGAC
651 GCGCCCTGTA GCGGCGCATT AAGCGCGGCG GGTGTGGTGG TTACGCGCAG
701 CGTGACCGCT ACACTTGCCA GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT TTCGCTTTCT
751 TCCCTTCCTT TCTCGCCACG TTCGCCGGCT TTCCCCGTCA AGCTCTAAAT
801 CGGGGGCTCC CTTTAGGGTT CCGATTTAGT GCTTTACGGC ACCTCGACCC
851 CAAAAAATT GATTAGGGTG ATGGTTCACG TAGTGGGCCA TCGCCCTGAT
901 AGACGGTTTT TCGCCCTTTG ACGTTGGAGT CCACGTTCTT TAATAGTGGA
951 CTCTTGTTCC AAACCTGGAAC AACACTCAAC CCTATCTCGG TCTATTCTTT
1001 TGATTTATAA GGGATTTTGC CGATTTTCGGC CTATTGGTTA AAAAATGAGC
1051 TGATTTAACA AAAATTTAAC GCGAATTTTA ACAAATATT AACGTTTACA
1101 ATTTTCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT
1151 ATTTTTCTAA ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGCCA GGTCTTGGAC
1201 TGGTGAGAAC GGCTTGCTCG GCAGCTTCGA TGTGTGCTGG AGGGAGAATA
1251 AAGGTCTAAG ATGTGCGATA GAGGGAAGTC GCATTGAATT ATGTGCTGTG
1301 TAGGGATCGC TGGTATCAAA TATGTGTGCC CACCCCTGGC ATGAGACAAT

1351 AACCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT
1401 CAACATTTCC GTGTCGCCCT TATTCCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC
1451 TGTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC
1501 AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG
1551 ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT
1601 TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTATTGAC GCCGGGCAAG
1651 AGCAACTCGG TCGCCGATA CACTATTCTC AGAATGACTT GGTTGAGTAC
1701 TCACCAGTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT
1751 ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC
1801 TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG
1851 GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC
1901 CATACCAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGTAGCA ATGGCAACAA
1951 CGTTGCGCAA ACTATTAAct GGCGAACTAC TTAActTAGC TTCCCGCAA
2001 CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG
2051 CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGTATTATGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG
2101 AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC
2151 TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA
2201 ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCActGATT AAGCATTGGT
2251 AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAAACTT
2301 CATTTTTAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT
2351 GCCATAACTT CGTATAATGT ATGCTATACG AAGTTATGGC ATGACCAAAA
2401 TCCCTTAACG TGAGTTTTTCG TTCCActGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG
2451 ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTTT CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT
2501 GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTGTTTTG CCGGATCAAG
2551 AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAActG GCTTCAGCAG AGCGCAGATA
2601 CCAAActActG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA
2651 CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT GCTAATCCTG TTACCAGTGG
2701 CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA
2751 TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC TGAACGGGGG GTTCGTGCAC

2801 ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC
 2851 GTGAGCATTG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GGCGGACAGG
 2901 TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC
 2951 AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT
 3001 GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG
 3051 AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC
 3101 TTTTGCTCAC ATGCTCGTTT AGTGAACCGT CAGATCGCCT GGAGACGCCA
 3151 TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA TCCAGCCTCC
 3201 GGACTCTAGC CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT ATTTAGGTGA CACTATAGAA

 PstI
 3251 GGTACGCCTG CAGCCGTCTC CCCCGGCACT GCTTCTCGTG ACTCCGGGGA

 StuI
 3301 GAGCCCAAGG CCTCAATTAG CCACAGTTCG GGCTGGACTC AGGGGCGACA
 3351 CGGACCACCG TACTTTTGCT AGCTTTGCCG AACCCGAGAG TCCCAGCTGG
 3401 AGCGCAGTCC GGGCCACGTG GGGAGGGGGC GTTGCTCAGT GGATGGCAAA
 3451 CGCTTCTGAT TGGCCATAGG GCGGAGTTC TTGGCTGCCG GGTGGCAGGA
 3501 CCCCTCCCAC TAAGGTGGGG CCTAAAGGTT CACAGCTGGA AAGGGAGGAG

 SphI
 3551 CAAGGGCGGC GCATCTGGAA AGGGGCGGGC CTGGGGCGCG CGGCATGCTG
 3601 CGGCGGGCTG GGGGCGCCCT GGGTTGCCAT AAAGTGAATG GGCGCCGGCG
 3651 GGGGGTGGCA CTGCACTGTG AGACTCACTC TCTCTCCGC TAGCCTGGGA

 NotI
 3701 GAGCCCAGCG GAGCGGCCGC CCCAGAGCAG GGGGGCGGCC CCCACCCCGC
 3751 AGGGTGCCTG GCCCCTGGCC CCTGCCTGCG CTCCAGAACG CCGCCGCCAC
 3801 AGCCACCACC CGGAGTCTGC CTGCTGCGGG ACGCACTGTG AGTACTTGAC
 3851 CATGCAGGGA ATAGGGGCTC AGGGGACCGA GGGACCAAGG CTGGTCCTGG
 3901 GACTCCTAAA AGGAAACCTG GGGCGGTTGA ACTCTGGTGT TTGGGGAATC
 3951 GGTCAAAAGG GAAAAGGCGT ATAGTAGCCC CGGGGCTGGG ACATGGGAGA
 4001 AGGGAAACTC TGAGGAAGGA CGTGGGGGAC TGAGAAGAGA TTTAGGGGAC
 4051 TCAGAGAGAA GCCGAAGAAC TGCACGAACC ACAGAGTGGG TAGTCTGGAA

4101 ACCTTTACCA GAGAGCACCT TGAAATCTAG GGGCAAGCGG CAAGGGCCAG
4151 AAGGTGATAA GGGTAGCCAA CTGAGGAGAG GGCAGCGGTC GCTCAGCCTA
4201 AGGGCAACAG GCGGCTCGCA GCGCCACTTG GCCCAGGCTT AGACAGACTC
4251 CAGCGTCTGG AAGTAGGGGT GCGCGTAGTA GCTCATGCTT TCCTTCCCAG
4301 CTGCTCCGCA GTTGGAAATTG GAGCCCTGTT GCGAGAGTCG CTA CTACTGGGTC
4351 AGATGGCCGC TGCAGACTAC AGGGCCCAAG CTGCCAGCAC AACGCGACAC
4401 GACTGGCAGG TCTGTCTGTGG GCCGTTTGGG TCTGGAAGGG TCCAGATCTG
4451 GAGCCTCCTC GGAATCGGAC AGAATGTCAG CGGCACGTGG GGT TTTGGAAC
4501 GGATAGAACG CTTGGGGCGG CAAAGTGGGT CTCTCTGGGG AGCAGACGAT
4551 GTGTCCAGCA GTGGTGAACG GAATGTCCCT GGCCGACTGG CATGTCCACC

4601 TATCCGGCAG CGCCTGCCCA GCTGCGTTAT GTGCCATGGG GTCGGCTCGG
4651 TGGGTCCCCT GAAATCCCAG CTCCCAGTTT TCAAAC TTGA TTTTGCCTCT
4701 CCTGCCCGTT TGGGCCTGAA AGGAGCTGGG AGAGTAAAGG GTGCAGCACG
4751 GCCTTGGGGC AGGGTTCTCT TGCAAGACAA CCCCCGCTCC AGCTCAAAGA
4801 GATCAGGGCA TCAGTAGACT TCCCCAATCC AA ACTGAGGA AAGACTAAGC
4851 CCTACAAAGG GAAGACTAAG CTACAGGGTG CAGCAGCCGC AGGCCACTCA

4901 CAAGCCTCCG AGGGGCTCAG TCCCCTCACA AACTCGAAGT CAACTGTTAG
4951 GCCTTCTTTC TTTCTTTCTA ACCCTAATTC CAGTACA ACT GACCGGATAC

5001 CCTCAAATTC CTAGTCTGGT TGTTAGCCCA CTGAGCTCAC TAGTCGGCGG
5051 CCGCCGCCAC CATGAGCAAG GCGGAGGAAC TGTTCACTGG CGTGGTCCCA
5101 ATTCTCGTGG AACTGGATGG CGATGTGAAT GGGCACAAAT TTTCTGTCAG
5151 CGGAGAGGGT GAAGGTGATG CCACATACGG AAAGCTCACC CTGAAATTCA

5201 TCTGCACCAC TGGAAAGCTC CCTGTGCCAT GGCCAACACT GGTCACTACC

5251 TTCACCTATG GCGTGCAGTG CTTTTCCAGA TACCCAGACC ATATGAAGCA
5301 GCATGACTTT TTCAAGAGCG CCATGCCCGA GGGCTATGTG CAGGAGAGAA
5351 CCATCTTTTT CAAAGATGAC GGGA ACTACA AGACCCGCGC TGAAGTCAAG

NcoI

StuI

SacI SpeI NotI

NcoI

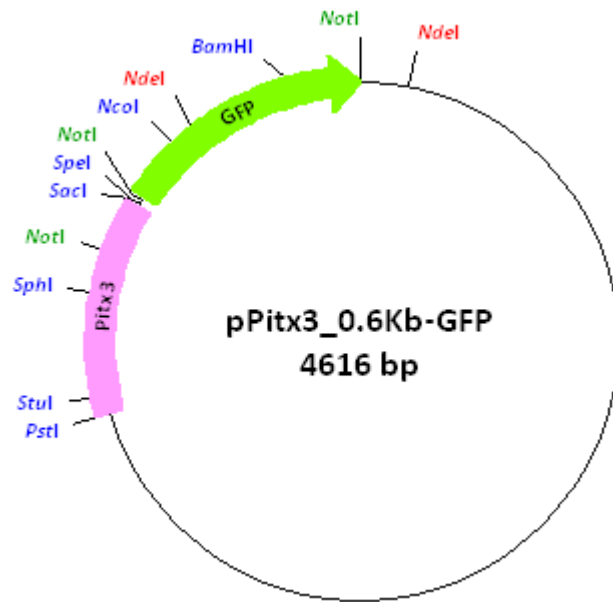
NdeI

5401 TTCGAAGGTG ACACCCTGGT GAATAGAATC GAGTTGAAGG GCATTGACTT
5451 TAAGGAAGAT GGAAACATTC TCGGCCACAA GCTGGAATAC AACTATAACT
5501 CCCACAATGT GTACATCATG GCCGACAAGC AAAAGAATGG CATCAAGGTC
5551 AACTTCAAGA TCAGACACAA CATTGAGGAT GGATCCGTGC AGCTGGCCGA
5601 CCATTATCAA CAGAACACTC CAATCGGCGA CGGCCCTGTG CTCCTCCCAG
5651 ACAACCATTA CCTGTCCACC CAGTCTGCCC TGTCTAAAGA TCCCAACGAA
5701 AAGAGAGACC ACATGGTCCT GCTGGAGTTT GTGACCGCTG CTGGGATCAC
5751 ACATGGCATG GACGAGCTGT ACAAGTGAGC

BamHI

NotI

Anexo 5



pPitx3_0.6Kb-GFP

1 GGCCGCTCTA GCTTGGGATC TTTGTGAAGG AACCTTACTT CTGTGGTGTG
51 ACATAATTGG ACAAACCTACC TACAGAGATT TAAAGCTCTA AGGTAAATAT
101 AAAATTTTTTA AGTGTATAAT GTGTTAAACT AGCTGCATAT GCTTGCTGCT
151 TGAGAGTTTT GCTTACTGAG TATGATTTAT GAAAATATTA TACACAGGAG
201 CTAGTGATTG TAATTGTTTG TGTATTTTAG ATTCACAGTC CCAAGGCTCA
251 TTTCAGGCC CTGAGTCCTC ACAGTCTGTT CATGATCATA ATCAGCCATA
301 CCACATTTGT AGAGGTTTTA CTTGCTTTAA AAAACCTCCC ACACCTCCCC
351 CTGAACCTGA AACATAAAAT GAATGCAATT GTTGTGTTA ACTTGTTTAT
401 TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTTCACAA
451 ATAAAGCATT TTTTTCCTG CATTCTAGTT GTGGTTTGTC CAAACTCATC
501 AATGTATCTT ATCATGTCTG GATCGATCCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC
551 GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG CGTATTGGCT GGCCTAATAG CGAAGAGGCC
601 CGCACCGATC GCCCTTCCCA ACAGTTGCGC AGCCTGAATG GCGAATGGAC
651 GCGCCCTGTA GCGGCGCATT AAGCGCGGCG GGTGTGGTGG TTACGCGCAG
701 CGTGACCGCT ACACTTGCCA GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT TTCGCTTTCT
751 TCCCTTCCTT TCTCGCCACG TTCGCCGGCT TTCCCCGTCA AGCTCTAAAT
801 CGGGGGCTCC CTTTAGGGTT CCGATTTAGT GCTTTACGGC ACCTCGACCC
851 CAAAAAATT GATTAGGGTG ATGGTTCACG TAGTGGGCCA TCGCCCTGAT
901 AGACGGTTTT TCGCCCTTTG ACGTTGGAGT CCACGTTCTT TAATAGTGGA
951 CTCTTGTTCC AAACCTGGAAC AACACTCAAC CCTATCTCGG TCTATTCTTT
1001 TGATTTATAA GGGATTTTGC CGATTTTCGGC CTATTGGTTA AAAAATGAGC
1051 TGATTTAACA AAAATTTAAC GCGAATTTTA ACAAATATT AACGTTTACA
1101 ATTTTCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT
1151 ATTTTTCTAA ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGCCA GGTCTTGGAC
1201 TGGTGAGAAC GGCTTGCTCG GCAGCTTCGA TGTGTGCTGG AGGGAGAATA
1251 AAGGTCTAAG ATGTGCGATA GAGGGAAGTC GCATTGAATT ATGTGCTGTG
1301 TAGGGATCGC TGGTATCAAA TATGTGTGCC CACCCCTGGC ATGAGACAAT

1351 AACCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT
1401 CAACATTTCC GTGTCGCCCT TATTCCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC
1451 TGTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC
1501 AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG
1551 ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT
1601 TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTATTGAC GCCGGGCAAG
1651 AGCAACTCGG TCGCCGATA CACTATTCTC AGAATGACTT GGTTGAGTAC
1701 TCACCAGTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT
1751 ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC
1801 TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG
1851 GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC
1901 CATACCAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGTAGCA ATGGCAACAA
1951 CGTTGCGCAA ACTATTAAct GGCGAACTAC TTAGCTTAGC TTCCCGCAA
2001 CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG
2051 CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGTATTATGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG
2101 AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC
2151 TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA
2201 ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT
2251 AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAAActT
2301 CATTTTTAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT
2351 GCCATAActT CGTATAATGT ATGCTATACG AAGTTATGGC ATGACCAAAA
2401 TCCCTTAACG TGAGTTTTCG TTCCACTGAG CGTCAGACCC CGTAGAAAAG
2451 ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT
2501 GCAAACAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT GGTGTTTTG CCGGATCAAG
2551 AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAActG GCTTCAGCAG AGCGCAGATA
2601 CCAAATACTG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA
2651 CTCTGTAGCA CCGCTACAT ACCTCGCTCT GCTAATCCTG TTACCAGTGG
2701 CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA CCGGTTGGA CTCAAGACGA
2751 TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGC TGAACGGGG GTTCGTGCAC

2801 ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA TACCTACAGC
2851 GTGAGCATTG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GCGGACAGG
2901 TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC
2951 AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC TGTCGGGTTT CGCCACCTCT
3001 GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT CAGGGGGGCG GAGCCTATGG
3051 AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC
3101 TTTTGCTCAC ATGCTCGTTT AGTGAACCGT CAGATCGCCT GGAGACGCCA
3151 TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA TCCAGCCTCC
3201 GGACTCTAGC CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT ATTTAGGTGA CACTATAGAA

PstI
3251 GGTACGCCTG CAGCCGTCTC CCCCGGCACT GCTTCTCGTG ACTCCGGGGA

StuI
3301 GAGCCCAAGG CCTCAATTAG CCACAGTTCG GGCTGGACTC AGGGGCGACA
3351 CGGACCACCG TACTTTTGCT AGCTTTGCCG AACCCGAGAG TCCCAGCTGG
3401 AGCGCAGTCC GGGCCACGTG GGGAGGGGGC GTTGCTCAGT GGATGGCAAA
3451 CGCTTCTGAT TGGCCATAGG GCGGAGTTC TTGGCTGCCG GGTGGCAGGA
3501 CCCCTCCCAC TAAGGTGGGG CCTAAAGGTT CACAGCTGGA AAGGGAGGAG

SphI
3551 CAAGGGCGGC GCATCTGGAA AGGGGCGGGC CTGGGGCGCG CGGCATGCTG
3601 CGGCGGGCTG GGGGCGCCCT GGGTTGCCAT AAAGTGAATG GGCGCCGGCG
3651 GGGGGTGGCA CTGCACTGTG AGACTCACTC TCTCCTCCGC TAGCCTGGGA

NotI
3701 GAGCCCAGCG GAGCGGCCGC CCCAGAGCAG GGGGGCGGCC CCCACCCCGC
3751 AGGGTGCCTG GCCCCTGGCC CCTGCCTGCG CTCCAGAACG CCGCCGCCAC
3801 AGCCACCACC CGGAGTCTGC CTGCTGCGGG ACGCACTGTG AGTACTTGAC

SacI SpeI NotI
3851 CATGCAGGCC CCCTCGACGA GCTCACTAGT CGGCGGCCGC CGCCACCATG
3901 AGCAAGGGCG AGGAACTGTT CACTGGCGTG GTCCCAATTC TCGTGGA ACT
3951 GGATGGCGAT GTGAATGGGC ACAAATTTTC TGTCAGCGGA GAGGGTGAAG
4001 GTGATGCCAC ATACGGAAAG CTCACCCTGA AATTCATCTG CACCACTGGA

NcoI

4051 AAGCTCCCTG TGCCATGGCC AACACTGGTC ACTACCTTCA CCTATGGCGT

NdeI

4101 GCAGTGCTTT TCCAGATACC CAGACCATAT GAAGCAGCAT GACTTTTTTCA

4151 AGAGCGCCAT GCCCGAGGGC TATGTGCAGG AGAGAACCAT CTTTTTCAAA

4201 GATGACGGGA ACTACAAGAC CCGCGCTGAA GTCAAGTTCG AAGGTGACAC

4251 CCTGGTGAAT AGAATCGAGT TGAAGGGCAT TGACTTTAAG GAAGATGGAA

4301 ACATTCTCGG CCACAAGCTG GAATACAACCT ATAACCTCCA CAATGTGTAC

4351 ATCATGGCCG ACAAGCAAAA GAATGGCATC AAGGTCAACT TCAAGATCAG

BamHI

4401 ACACAACATT GAGGATGGAT CCGTGCAGCT GGCCGACCAT TATCAACAGA

4451 ACACTCCAAT CGGCGACGGC CCTGTGCTCC TCCCAGACAA CCATTACCTG

4501 TCCACCCAGT CTGCCCTGTC TAAAGATCCC AACGAAAAGA GAGACCACAT

4551 GGTCTGCTG GAGTTTGTGA CCGCTGCTGG GATCACACAT GGCATGGACG

NotI

4601 AGCTGTACAA GTGAGC