## 6. Anhang

6.1. Biochemische Bestimmung der Enzymaktivität von Pim-1 nach Substratbehandlung

In diesem Experiment wurde die Inhibition der Pim-1-WT-GST Enzymaktivität durch verschiedene Substanzen untersucht. Es wurden fünf unterschiedliche, potentielle Pim-1 Inhibitoren in einem HTRF-Assay (homogeneous time resolved fluoreszenz) getestet (Informationen zum HTRF-Methode siehe: www.htrf-assays.com/technology/htrftheory/htrf_chemistry/).

Die Phosphorylierung eines Substratpeptids diente als Maß für die Enzymaktivität von Pim-1 und reziprok für die Wirkung des Inhibitors. Die Substratphosphorylierung korrelierte indirekt zur Intensität des Fluoreszenzsignals. Es wurde ein Antikörper verwendet, der das phosphorylierte Epitop auf dem Substratpeptid erkannte. An diesem Primärantikörper war ein Donorfluorophor, Europium-Kryptat, (CisBio) gekoppelt. Ein Sekundärantikörper, der den Primärantikörper erkannte, trug das entsprechende Akzeptorfluorophor XL665 (CisBio). Nach Fluoreszenzanregung emittiert das Europium-Kryptat (Donor) eine lang anhaltende Fluoreszenz bei 620 nm, während der Akzeptor XL665 ein kurzlebiges Signal bei 665 nm produziert. Das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen sich, so dass ein Energietransfer zwischen beiden stattfinden kann, wenn sie sich in direkter räumlicher Nähe zueinander befinden (phosphoryliertes Substratpeptid/Primärantikörper/Sekundärantikörper-Komplex). Als Folge des Energietransfers emittiert der Akzeptor XL665 ebenfalls eine lang anhaltende Fluoreszenz von 665 nm. Das Verhältnis zwischen der kurzlebigen und der lang anhaltenden Fluoreszenz des Akzeptors (665nm zu 620nm) kann mit einem Fluoreszenzmeßgerät ermittelt werden und dient indirekt als Maß für die Substratphosphorylierung.

Die Experimente zur biochemischen Bestimmung der Enzymaktivität von Pim-1-WT-GST nach Substratbehandlung wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. M. Husemann, Abteilung AD-HTS, Schering AG, Berlin durchgeführt.
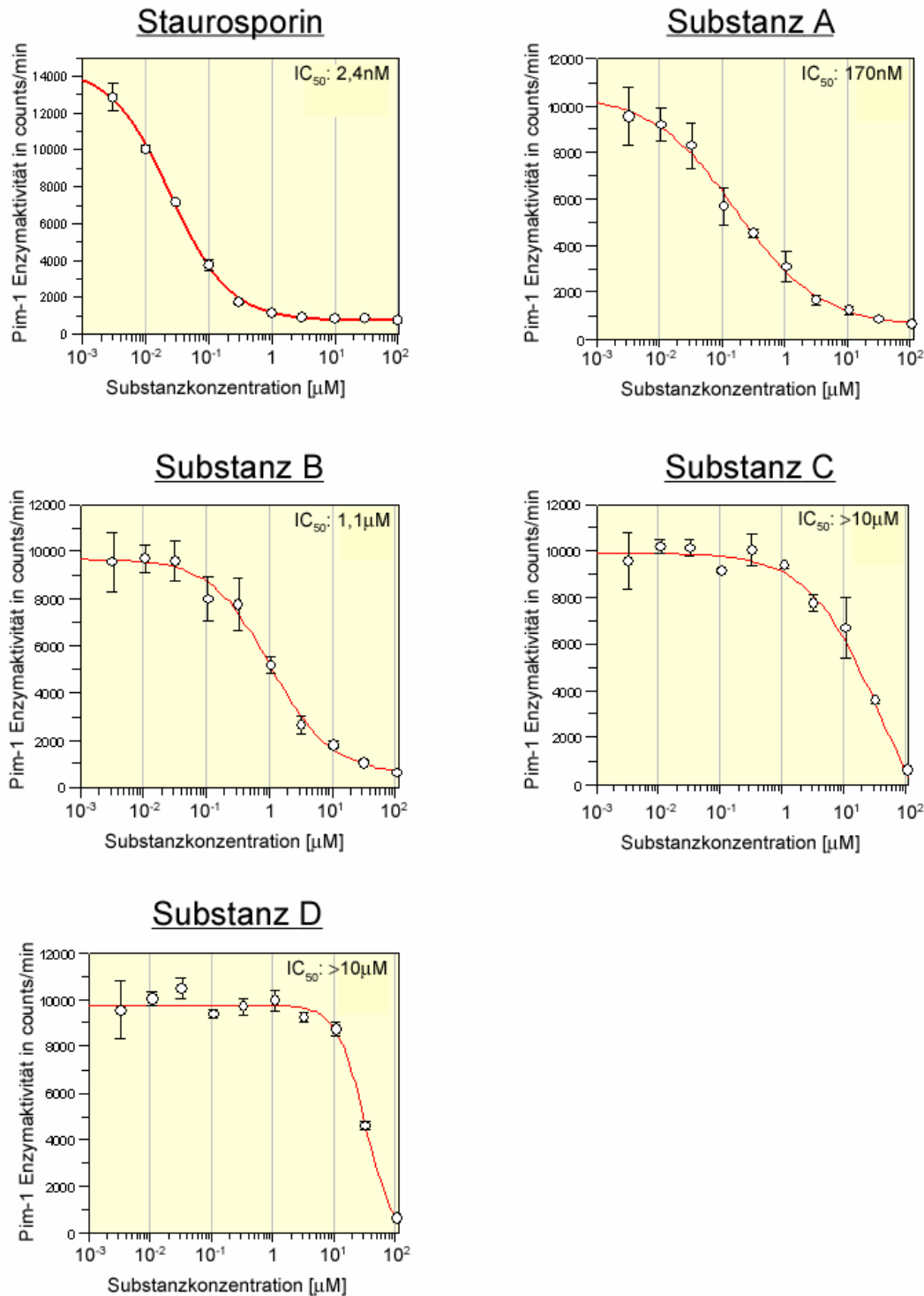
Abb. 52 Test von potentiellen Pim-1 Inhibitoren im HTRF-Assay
In einem HTRF-Assay wurden die Wirkungen von fünf ausgewählten Substanzen auf die Pim-1-GST Enzymaktivität untersucht. Als Maß für die Enzymaktivität diente die Phosphorylierung des Substratpeptids. Der bekannte Kinaseinhibitor Staurosporin zeigte eine starke Inhibition der Enzymaktivität von Pim-1-GST. Es wurde ein IC_{50}-Wert von 2,4nM ermittelt. Die Substanz A ergab einen IC_{50}-Wert von 170nM und war damit der wirksamste der vier getesteten, potentiellen Pim-1 Inhibitoren. Bei der Substanz B konnte noch ein IC_{50}-Wert von 1,1µM ermittelt werden. Die Substanzen C und D zeigten keine inhibitorische Wirkung im eingesetzten Konzentrationsbereich. Für beide konnten keine IC_{50}-Werte bestimmt werden.

6.2. Sequenzen

6.2.1. p21-WT-Sequenz des pOTB7 Expressionsvektors

+1	Met	Ser	Glu	Pro	Ala	Gly	Asp	Val	Arg	Gln	Asn	Pro	Cys	Gly	Ser	Lys
1	ATG	TCA	GAA	CCG	GCT	GGG	GAT	GTC	CGT	CAG	AAC	CCA	TGC	GGC	AGC	AAG
+1	Ala	Cys	Arg	Arg	Leu	Phe	Gly	Pro	Val	Asp	Ser	Glu	Gln	Leu	Arg	Arg
49	GCC	TGC	CGC	CGC	CTC	TTC	GGC	CCA	GTG	GAC	AGC	GAG	CAG	CTG	AGA	CGC
+1	Asp	Cys	Asp	Ala	Leu	Met	Ala	Gly	Cys	Ile	Gln	Glu	Ala	Arg	Glu	Arg
97	GAC	TGT	GAT	GCG	CTA	ATG	GCG	GGC	TGC	ATC	CAG	GAG	GCC	CGT	GAG	CGA
+1	Trp	Asn	Phe	Asp	Phe	Val	Thr	Glu	Thr	Pro	Leu	Glu	Gly	Asp	Phe	Ala
145	TGG	AAC	TTC	GAC	TTT	GTC	ACC	GAG	ACA	CCA	CTG	GAG	GGT	GAC	TTC	GCC
+1	Trp	Glu	Arg	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	Leu	Pro	Lys	Leu	Tyr	Leu	Pro	Thr
193	TGG	GAG	CGT	GTG	CGG	GGC	CTT	GGC	CTG	CCC	AAG	CTC	TAC	CTT	CCC	ACG
+1	Gly	Pro	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Glu	Leu	Gly	Gly	Gly	Arg	Arg	Pro	Gly
241	GGG	CCC	CGG	CGA	GGC	CGG	GAT	GAG	TTG	GGA	GGA	GGC	AGG	CGG	CCT	GGC
+1	Thr	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr	Ala	Glu	Glu	Asp	His	Val	Asp
289	ACC	TCA	CCT	GCT	CTG	CTG	CAG	GGG	ACA	GCA	GAG	GAA	GAC	CAT	GTG	GAC
+1	Leu	Ser	Leu	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Pro	Arg	Ser	Gly	Glu	Gln	Ala	Glu
337	CTG	TCA	CTG	TCT	TGT	ACC	CTT	GTG	CCT	CGC	TCA	GGG	GAG	CAG	GCT	GAA
+1	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Asp	Ser	Gln	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Gln
385	GGG	TCC	CCA	GGT	GGA	CCT	GGA	GAC	TCT	CAG	GGT	CGA	AAA	CGG	CGG	CAG
+1	Thr	Ser	Met	Thr	Asp	Phe	Tyr	His	Ser	Lys	Arg	Arg	Leu	Ile	Phe	Ser
433	ACC	AGC	ATG	ACA	GAT	TTC	TAC	CAC	TCC	AAA	CGC	CGG	CTG	ATC	TTC	TCC
+1	Lys	Arg	Lys	Pro	***											
481	AAG	AGG	AAG	CCC	TAA											

Abb. 53 p21-WT-Sequenz des pOTB7 Expressionsvektors
In dieser Abb. ist die p21-WT-Sequenz des pOTB7 Expressionsvektors dargestellt
(Ausgangssequenz siehe 2.1.1.).

6.2.2. c-Myc-Pim-1-WT-Sequenz des pCMV-tag3 Expressionsvektors

+1	Ala	Ala	Met	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Ala	Arg	Ala
1	GCC	GCC	ATG	GAG	CAG	AAA	CTC	ATC	TCT	GAA	GAG	GAT	CTG	GCC	CGG	GCG
+1	Asp	Pro	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Cys	Arg	Asn
49	GAT	CCC	GAG	CAG	AAA	CTC	ATC	TCT	GAA	GAG	GAT	CTG	GGC	TGC	AGG	AAT
+1	Ser	Met	Leu	Leu	Ser	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Ala	His	Leu	Arg	Ala	Ala
97	TCG	ATG	CTC	TTG	TCC	AAA	ATC	AAC	TCG	CTT	GCC	CAC	CTG	CGC	GCC	GCG
+1	Pro	Cys	Asn	Asp	Leu	His	Ala	Thr	Lys	Leu	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Lys
145	CCC	TGC	AAC	GAC	CTG	CAC	GCC	ACC	AAG	CTG	GCG	CCC	GGC	AAG	GAG	AAG
+1	Glu	Pro	Leu	Glu	Ser	Gln	Tyr	Gln	Val	Gly	Pro	Leu	Leu	Gly	Ser	Gly
193	GAG	CCC	CTG	GAG	TCG	CAG	TAC	CAG	GTG	GGC	CCG	CTA	CTG	GGC	AGC	GGC
+1	Gly	Phe	Gly	Ser	Val	Tyr	Ser	Gly	Ile	Arg	Val	Ser	Asp	Asn	Leu	Pro
241	GGC	TTC	GGC	TCG	GTC	TAC	TCA	GGC	ATC	CGC	GTC	TCC	GAC	AAC	TTG	CCG
+1	Val	Ala	Ile	Lys	His	Val	Glu	Lys	Asp	Arg	Ile	Ser	Asp	Trp	Gly	Glu
289	GTG	GCC	ATC	AAA	CAC	GTG	GAG	AAG	GAC	CGG	ATT	TCC	GAC	TGG	GGA	GAG
+1	Leu	Pro	Asn	Gly	Thr	Arg	Val	Pro	Met	Glu	Val	Val	Leu	Leu	Lys	Lys
337	CTG	CCT	AAT	GGC	ACT	CGA	GTG	CCC	ATG	GAA	GTG	GTC	CTG	CTG	AAG	AAG
+1	Val	Ser	Ser	Gly	Phe	Ser	Gly	Val	Ile	Arg	Leu	Leu	Asp	Trp	Phe	Glu
385	GTG	AGC	TCG	GGT	TTC	TCC	GGC	GTC	ATT	AGG	CTC	CTG	GAC	TGG	TTC	GAG
+1	Arg	Pro	Asp	Ser	Phe	Val	Leu	Ile	Leu	Glu	Arg	Pro	Glu	Pro	Val	Gln
433	AGG	CCC	GAC	AGT	TTC	GTC	CTG	ATC	CTG	GAG	AGG	CCC	GAG	CCG	GTG	CAA
+1	Asp	Leu	Phe	Asp	Phe	Ile	Thr	Glu	Arg	Gly	Ala	Leu	Gln	Glu	Glu	Leu
481	GAT	CTC	TTC	GAC	TTC	ATC	ACG	GAA	AGG	GGA	GCC	CTG	CAA	GAG	GAG	CTG
+1	Ala	Arg	Ser	Phe	Phe	Trp	Gln	Val	Leu	Glu	Ala	Val	Arg	His	Cys	His
529	GCC	CGC	AGC	TTC	TTC	TGG	CAG	GTG	CTG	GAG	GCC	GTG	CGG	CAC	TGC	CAC
+1	Asn	Cys	Gly	Val	Leu	His	Arg	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asn	Ile	Leu	Ile
577	AAC	TGC	GGG	GTG	CTC	CAC	CGC	GAC	ATC	AAG	GAC	GAA	AAC	ATC	CTT	ATC
+1	Asp	Leu	Asn	Arg	Gly	Glu	Leu	Lys	Leu	Ile	Asp	Phe	Gly	Ser	Gly	Ala
625	GAC	CTC	AAT	CGC	GGC	GAG	CTC	AAG	CTC	ATC	GAC	TTC	GGG	TCG	GGG	GCG
+1	Leu	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Tyr	Thr	Asp	Phe	Asp	Gly	Thr	Arg	Val	Tyr
673	CTG	CTC	AAG	GAC	ACC	GTC	TAC	ACG	GAC	TTC	GAT	GGG	ACC	CGA	GTG	TAT
+1	Ser	Pro	Pro	Glu	Trp	Ile	Arg	Tyr	His	Arg	Tyr	His	Gly	Arg	Ser	Ala
721	AGC	CCT	CCA	GAG	TGG	ATC	CGC	TAC	CAT	CGC	TAC	CAT	GGC	AGG	TCG	GCG
+1	Ala	Val	Trp	Ser	Leu	Gly	Ile	Leu	Leu	Tyr	Asp	Met	Val	Cys	Gly	Asp
769	GCA	GTC	TGG	TCC	CTG	GGG	ATC	CTG	CTG	TAT	GAT	ATG	GTG	TGT	GGA	GAT
+1	Ile	Pro	Phe	Glu	His	Asp	Glu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Gln	Val	Phe	Phe
817	ATT	CCT	TTC	GAG	CAT	GAC	GAA	GAG	ATC	ATC	AGG	GGC	CAG	GTT	TTC	TTC
+1	Arg	Gln	Arg	Val	Ser	Ser	Glu	Cys	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Trp	Cys	Leu
865	AGG	CAG	AGG	GTC	TCT	TCA	GAA	TGT	CAG	CAT	CTC	ATT	AGA	TGG	TGC	TTG
+1	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Arg	Pro	Thr	Phe	Glu	Glu	Ile	Gln	Asn	His
913	GCC	CTG	AGA	CCA	TCA	GAT	AGG	CCA	ACC	TTC	GAA	GAA	ATC	CAG	AAC	CAT
+1	Pro	Trp	Met	Gln	Asp	Val	Leu	Leu	Pro	Gln	Glu	Thr	Ala	Glu	Ile	His
961	CCA	TGG	ATG	CAA	GAT	GTT	CTC	CTG	CCC	CAG	GAA	ACT	GCT	GAG	ATC	CAC
+1	Leu	His	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	***	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg
1009	CTC	CAC	AGC	CTG	TCG	CCG	GGG	CCC	AGC	AAA	TAG	CCG	TCG	ACC	TCG	AGG
+1	Gly	Gly	Pro	Val	Pro	***	Leu									
1057	GGG	GGC	CCG	GTA	CCT	TAA	TTA	AT								

Abb. 54 c-Myc-Pim-1-WT-Sequenz des pCMV-tag3 Expressionsvektors
In dieser Abb. ist die Myc-Pim-1-WT-Sequenz des pCMV-tag3 Expressionsvektors (Ausgangsplasmid, siehe 2.1.1.) dargestellt. Violette Zeichen geben das Ausmaß der KOZAK-Sequenz an. Grüne Zeichen kennzeichnen das Ausmaß der zwei Myc-tags. Rote Zeichen geben das Ausmaß der Pim-1-WT-Sequenz an.

6.2.3. p21-WT-CFP-Sequenz

+1	Asp Leu Glu Leu Lys Leu Ala Met Ser Glu Pro Ala Gly Asp Val Arg Gln Asn Pro Cys
1	GATCTCGAGCTCAAGCTTGCCATGTCAGAACCGGCTGGGGATGTCCGTCAGAACCCATGC
+1	Gly Ser Lys Ala Cys Arg Arg Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Arg Arg Asp
61	GGCAGCAAGGCCTGCCGCCGCCTCTTCGGCCCAGTGGACAGCGAGCAGCTGAGACGCGAC
+1	Cys Asp Ala Leu Met Ala Gly Cys Ile Gln Glu Ala Arg Glu Arg Trp Asn Phe Asp Phe
121	TGTGATGCGCTAATGGCGGGCTGCATCCAGGAGGCCCGTGAGCGATGGAACTTCGACTTT
+1	Val Thr Glu Thr Pro Leu Glu Gly Asp Phe Ala Trp Glu Arg Val Arg Gly Leu Gly Leu
181	GTCACCGAGACACCACTGGAGGGTGACTTCGCCTGGGAGCGTGTGCGGGGCCTTGGCCTG
+1	Pro Lys Leu Tyr Leu Pro Thr Gly Pro Arg Arg Gly Arg Asp Glu Leu Gly Gly Gly Arg
241	CCCAAGCTCTACCTTCCCACGGGGCCCCGGCGAGGCCGGGATGAGTTGGGAGGAGGCAGG
+1	Arg Pro Gly Thr Ser Pro Ala Leu Leu Gln Gly Thr Ala Glu Glu Asp His Val Asp Leu
301	CGGCCTGGCACCTCACCTGCTCTGCTGCAGGGGACAGCAGAGGAAGACCATGTGGACCTG
+1	Ser Leu Ser Cys Thr Leu Val Pro Arg Ser Gly Glu Gln Ala Glu Gly Ser Pro Gly Gly
361	TCACTGTCTTGTACCCTTGTGCCTCGCTCAGGGGAGCAGGCTGAAGGGTCCCCAGGTGGA
+1	Pro Gly Asp Ser Gln Gly Arg Lys Arg Arg Gln Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser
421	CCTGGAGACTCTCAGGGTCGAAAACGGCGGCAGACCAGCATGACAGATTTCTACCACTCC
+1	Lys Arg Arg Leu Ile Phe Ser Lys Arg Lys Pro Lys Pro Ser Thr Val Pro Arg Ala Arg
481	AAACGCCGGCTGATCTTCTCCAAGAGGAAGCCCAAACCGTCGACGGTACCGCGGGCCCGG
+1	Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr
541	GATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC

Abb. 55 p21-WT-CFP-Sequenz

In dieser Abb. ist die p21-WT-CFP-Sequenz dargestellt. Das Start- und das modifizierte „Stopkodon" des p21-WT-Gens ist durch rote Buchstaben gekennzeichnet. Blaue Zeichen geben das Startkodon des CFP-Gens an.

6.2.4. p21-WT-YFP-Sequenz

+1	Asp Leu Glu Leu Lys Leu Ala Met Ser Glu Pro Ala Gly Asp Val Arg Gln Asn Pro Cys
1	GATCTCGAGCTCAAGCTTGCCATGTCAGAACCGGCTGGGGATGTCCGTCAGAACCCATGC
+1	Gly Ser Lys Ala Cys Arg Arg Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Arg Arg Asp
61	GGCAGCAAGGCCTGCCGCCGCCTCTTCGGCCCAGTGGACAGCGAGCAGCTGAGACGCGAC
+1	Cys Asp Ala Leu Met Ala Gly Cys Ile Gln Glu Ala Arg Glu Arg Trp Asn Phe Asp Phe
121	TGTGATGCGCTAATGGCGGGCTGCATCCAGGAGGCCCGTGAGCGATGGAACTTCGACTTT
+1	Val Thr Glu Thr Pro Leu Glu Gly Asp Phe Ala Trp Glu Arg Val Arg Gly Leu Gly Leu
181	GTCACCGAGACACCACTGGAGGGTGACTTCGCCTGGGAGCGTGTGCGGGGCCTTGGCCTG
+1	Pro Lys Leu Tyr Leu Pro Thr Gly Pro Arg Arg Gly Arg Asp Glu Leu Gly Gly Gly Arg
241	CCCAAGCTCTACCTTCCCACGGGGCCCCGGCGAGGCCGGGATGAGTTGGGAGGAGGCAGG
+1	Arg Pro Gly Thr Ser Pro Ala Leu Leu Gln Gly Thr Ala Glu Glu Asp His Val Asp Leu
301	CGGCCTGGCACCTCACCTGCTCTGCTGCAGGGGACAGCAGAGGAAGACCATGTGGACCTG
+1	Ser Leu Ser Cys Thr Leu Val Pro Arg Ser Gly Glu Gln Ala Glu Gly Ser Pro Gly Gly
361	TCACTGTCTTGTACCCTTGTGCCTCGCTCAGGGGAGCAGGCTGAAGGGTCCCCAGGTGGA
+1	Pro Gly Asp Ser Gln Gly Arg Lys Arg Arg Gln Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser
421	CCTGGAGACTCTCAGGGTCGAAAACGGCGGCAGACCAGCATGACAGATTTCTACCACTCC
+1	Lys Arg Arg Leu Ile Phe Ser Lys Arg Lys Pro Lys Pro Ser Thr Val Pro Arg Ala Arg
481	AAACGCCGGCTGATCTTCTCCAAGAGGAAGCCCAAACCGTCGACGGTACCGCGGGCCCGG
+1	Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr
541	GATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC

Abb. 56 p21-WT-YFP-Sequenz

In dieser Abb. ist die p21-WT-YFP-Sequenz dargestellt. Das Start- und das modifizierte „Stopkodon" des p21-WT-Gens ist durch rote Buchstaben gekennzeichnet. Blaue Zeichen geben das Startkodon des YFP-Gens an.

6.2.5. p21-T145A-CFP-DNA-Sequenz

+1	Asp	Leu	Glu	Leu	Lys	Leu	Ala	Met	Ser	Glu	Pro	Ala	Gly	Asp	Val	Arg	Gln	Asn	Pro	Cys
1	GATCTCGAGCTCAAGCTTGCC**ATG**TCAGAACCGGCTGGGGATGTCCGTCAGAACCCATGC																			
+1	Gly	Ser	Lys	Ala	Cys	Arg	Arg	Leu	Phe	Gly	Pro	Val	Asp	Ser	Glu	Gln	Leu	Arg	Arg	Asp
61	GGCAGCAAGGCCTGCCGCCGCCTCTTCGGCCCAGTGGACAGCGAGCAGCTGAGACGCGAC																			
+1	Cys	Asp	Ala	Leu	Met	Ala	Gly	Cys	Ile	Gln	Glu	Ala	Arg	Glu	Arg	Trp	Asn	Phe	Asp	Phe
121	TGTGATGCGCTAATGGCGGGCTGCATCCAGGAGGCCCGTGAGCGATGGAACTTCGACTTT																			
+1	Val	Thr	Glu	Thr	Pro	Leu	Glu	Gly	Asp	Phe	Ala	Trp	Glu	Arg	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	Leu
181	GTCACCGAGACACCACTGGAGGGTGACTTCGCCTGGGAGCGTGTGCGGGGCCTTGGCCTG																			
+1	Pro	Lys	Leu	Tyr	Leu	Pro	Thr	Gly	Pro	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Glu	Leu	Gly	Gly	Gly	Arg
241	CCCAAGCTCTACCTTCCCACGGGGCCCCGGCGAGGCCGGGATGAGTTGGGAGGAGGCAGG																			
+1	Arg	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr	Ala	Glu	Glu	Asp	His	Val	Asp	Leu
301	CGGCCTGGCACCTCACCTGCTCTGCTGCAGGGGACAGCAGAGGAAGACCATGTGGACCTG																			
+1	Ser	Leu	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Pro	Arg	Ser	Gly	Glu	Gln	Ala	Glu	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly
361	TCACTGTCTTGTACCCTTGTGCCTCGCTCAGGGGAGCAGGCTGAAGGGTCCCCAGGTGGA																			
+1	Pro	Gly	Asp	Ser	Gln	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Gln	Ala	Ser	Met	Thr	Asp	Phe	Tyr	His	Ser
421	CCTGGAGACTCTCAGGGTCGAAAACGGCGGCAG**GCC**AGCATGACAGATTTCTACCACTCC																			
+1	Lys	Arg	Arg	Leu	Ile	Phe	Ser	Lys	Arg	Lys	Pro	Lys	Pro	Ser	Thr	Val	Pro	Arg	Ala	Arg
481	AAACGCCGGCTGATCTTCTCCAAGAGGAAGCCC**AAA**CCGTCGACGGTACCGCGGGCCCGG																			
+1	Asp	Pro	Pro	Val	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr				
541	GATCCACCGGTCGCCACC**ATG**GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC																			

Abb. 57 p21-T145A-CFP-Sequenz
In dieser Abb. ist die p21-T145A-CFP-Sequenz dargestellt. Das Start- und das modifizierte „Stopkodon" des p21-WT-Gens ist durch rote Buchstaben und die Mutation T145A durch grüne Buchstaben gekennzeichnet. Blaue Zeichen geben das Startkodon des YFP-Gens an.

6.2.6. Pim-1-WT-CFP-Sequenz

+1	Asp Leu Glu Leu Lys Leu Ala Ala Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ala
1	GATCTCGAGCTCAAGCTTGCCGCCATGGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGCC

+1	Arg Ala Asp Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Cys Arg Asn Ser Met
61	CGGGCGGATCCCGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGGCTGCAGGAATTCGATG

+1	Leu Leu Ser Lys Ile Asn Ser Leu Ala His Leu Arg Ala Ala Pro Cys Asn Asp Leu His
121	CTCTTGTCCAAAATCAACTCGCTTGCCCACCTGCGCGCCGCGCCCTGCAACGACCTGCAC

+1	Ala Thr Lys Leu Ala Pro Gly Lys Glu Lys Glu Pro Leu Glu Ser Gln Tyr Gln Val Gly
181	GCCACCAAGCTGGCGCCCGGCAAGGAGAAGGAGCCCCTGGAGTCGCAGTACCAGGTGGGC

+1	Pro Leu Leu Gly Ser Gly Gly Phe Gly Ser Val Tyr Ser Gly Ile Arg Val Ser Asp Asn
241	CCGCTACTGGGCAGCGGCGGCTTCGGCTCGGTCTACTCAGGCATCCGCGTCTCCGACAAC

+1	Leu Pro Val Ala Ile Lys His Val Glu Lys Asp Arg Ile Ser Asp Trp Gly Glu Leu Pro
301	TTGCCGGTGGCCATCAAACACGTGGAGAAGGACCGGATTTCCGACTGGGGAGAGCTGCCT

+1	Asn Gly Thr Arg Val Pro Met Glu Val Val Leu Leu Lys Lys Val Ser Ser Gly Phe Ser
361	AATGGCACTCGAGTGCCCATGGAAGTGGTCCTGCTGAAGAAGGTGAGCTCGGGTTTCTCC

+1	Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg Pro Asp Ser Phe Val Leu Ile Leu Glu
421	GGCGTCATTAGGCTCCTGGACTGGTTCGAGAGGCCCGACAGTTTCGTCCTGATCCTGGAG

+1	Arg Pro Glu Pro Val Gln Asp Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Gln Glu
481	AGGCCCGAGCCGGTGCAAGATCTCTTCGACTTCATCACGGAAAGGGGGAGCCCTGCAAGAG

+1	Glu Leu Ala Arg Ser Phe Phe Trp Gln Val Leu Glu Ala Val Arg His Cys His Asn Cys
541	GAGCTGGCCCGCAGCTTCTTCTGGCAGGTGCTGGAGGCCGTGCGGCACTGCCACAACTGC

+1	Gly Val Leu His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp Leu Asn Arg Gly Glu
601	GGGGTGCTCCACCGCGACATCAAGGACGAAAACATCCTTATCGACCTCAATCGCGGCGAG

+1	Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe
661	CTCAAGCTCATCGACTTCGGGTCGGGGGCGCTGCTCAAGGACACCGTCTACACGGACTTC

+1	Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg
721	GATGGGACCCGAGTGTATAGCCCTCCAGAGTGGATCCGCTACCATCGCTACCATGGCAGG

+1	Ser Ala Ala Val Trp Ser Leu Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro
781	TCGGCGGCAGTCTGGTCCCTGGGGATCCTGCTGTATGATATGGTGTGTGGAGATATTCCT

+1	Phe Glu His Asp Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gln Val Phe Phe Arg Gln Arg Val Ser Ser
841	TTCGAGCATGACGAAGAGATCATCAGGGGCCAGGTTTTCTTCAGGCAGAGGGTCTCTTCA

+1	Glu Cys Gln His Leu Ile Arg Trp Cys Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Arg Pro Thr Phe
901	GAATGTCAGCATCTCATTAGATGGTGCTTGGCCCTGAGACCATCAGATAGGCCAACCTTC

+1	Glu Glu Ile Gln Asn His Pro Trp Met Gln Asp Val Leu Leu Pro Gln Glu Thr Ala Glu
961	GAAGAAATCCAGAACCATCCATGGATGCAAGATGTTCTCCTGCCCCAGGAAACTGCTGAG

+1	Ile His Leu His Ser Leu Ser Pro Gly Pro Ser Lys Lys Pro Ser Thr Val Pro Arg Ala
1021	ATCCACCTCCACAGCCTGTCGCCGGGGCCCAGCAAAAAGCCGTCGACGGTACCGCGGGCC

+1	Arg Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr
1081	CGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC

Abb. 58 Pim-1-WT-CFP-Sequenz
In dieser Abb. ist die Pim-1-WT-CFP-Sequenz dargestellt. Das Start- und das modifizierte „Stopkodon" des Pim-1-WT-Gens ist durch rote Buchstaben gekennzeichnet. Blaue Zeichen geben das Startkodon des CFP-Gens an.

6.2.7. Pim-1-WT-GFP-Sequenz

```
  +1   Asp Leu Glu Leu Lys Pro Ala Ala Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ala
   1   GATCTCGAGCTCAAGCCTGCCGCCATGGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGCC

  +1   Arg Ala Asp Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Cys Arg Asn Ser Met
  61   CGGGCGGATCCCGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGGCTGCAGGAATTCGATG

  +1   Leu Leu Ser Lys Ile Asn Ser Leu Ala His Leu Arg Ala Ala Pro Cys Asn Asp Leu His
 121   CTCTTGTCCAAAATCAACTCGCTTGCCCACCTGCGCGCCGCGCCCTGCAACGACCTGCAC

  +1   Ala Thr Lys Leu Ala Pro Gly Lys Glu Lys Glu Pro Leu Glu Ser Gln Tyr Gln Val Gly
 181   GCCACCAAGCTGGCGCCCGGCAAGGAGAAGGAGCCCCTGGAGTCGCAGTACCAGGTGGGC

  +1   Pro Leu Leu Gly Ser Gly Gly Phe Gly Ser Val Tyr Ser Gly Ile Arg Val Ser Asp Asn
 241   CCGCTACTGGGCAGCGGCGGCTTCGGCTCGGTCTACTCAGGCATCCGCGTCTCCGACAAC

  +1   Leu Pro Val Ala Ile Lys His Val Glu Lys Asp Arg Ile Ser Asp Trp Gly Glu Leu Pro
 301   TTGCCGGTGGCCATCAAACACGTGGAGAAGGACCGGATTTCCGACTGGGGAGAGCTGCCT

  +1   Asn Gly Thr Arg Val Pro Met Glu Val Val Leu Leu Lys Lys Val Ser Ser Gly Phe Ser
 361   AATGGCACTCGAGTGCCCATGGAAGTGGTCCTGCTGAAGAAGGTGAGCTCGGGTTTCTCC

  +1   Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg Pro Asp Ser Phe Val Leu Ile Leu Glu
 421   GGCGTCATTAGGCTCCTGGACTGGTTCGAGAGGCCCGACAGTTTCGTCCTGATCCTGGAG

  +1   Arg Pro Glu Pro Val Gln Asp Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Gln Glu
 481   AGGCCCGAGCCGGTGCAAGATCTCTTCGACTTCATCACGGAAAGGGGAGCCCTGCAAGAG

  +1   Glu Leu Ala Arg Ser Phe Phe Trp Gln Val Leu Glu Ala Val Arg His Cys His Asn Cys
 541   GAGCTGGCCCGCAGCTTCTTCTGGCAGGTGCTGGAGGCCGTGCGGCACTGCCACAACTGC

  +1   Gly Val Leu His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp Leu Asn Arg Gly Glu
 601   GGGGTGCTCCACCGCGACATCAAGGACGAAAACATCCTTATCGACCTCAATCGCGGCGAG

  +1   Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe
 661   CTCAAGCTCATCGACTTCGGGTCGGGGGCGCTGCTCAAGGACACCGTCTACACGGACTTC

  +1   Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg
 721   GATGGGACCCGAGTGTATAGCCCTCCAGAGTGGATCCGCTACCATCGCTACCATGGCAGG

  +1   Ser Ala Ala Val Trp Ser Leu Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro
 781   TCGGCGGCAGTCTGGTCCCTGGGGATCCTGCTGTATGATATGGTGTGTGGAGATATTCCT

  +1   Phe Glu His Asp Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gln Val Phe Phe Arg Gln Arg Val Ser Ser
 841   TTCGAGCATGACGAAGAGATCATCAGGGGCCAGGTTTTCTTCAGGCAGAGGGTCTCTTCA

  +1   Glu Cys Gln His Leu Ile Arg Trp Cys Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Arg Pro Thr Phe
 901   GAATGTCAGCATCTCATTAGATGGTGCTTGGCCCTGAGACCATCAGATAGGCCAACCTTC

  +1   Glu Glu Ile Gln Asn His Pro Trp Met Gln Asp Val Leu Leu Pro Gln Glu Thr Ala Glu
 961   GAAGAAATCCAGAACCATCCATGGATGCAAGATGTTCTCCTGCCCCAGGAAACTGCTGAG

  +1   Ile His Leu His Ser Leu Ser Pro Gly Pro Ser Lys Lys Pro Ser Thr Val Pro Arg Ala
1021   ATCCACCTCCACAGCCTGTCGCCGGGGCCCAGCAAAAAGCCGTCGACGGTACCGCGGGCC

  +1   Arg Asp Pro
1081   CGGGATCCACC
```

Abb. 59 Pim-1-WT-GFP-Sequenz
In dieser Abb. ist die Pim-1-WT-GFP-Sequenz dargestellt. Das Start- und das modifizierte „Stopkodon" des Pim-1-WT-Gens ist durch rote Buchstaben gekennzeichnet. Blaue Zeichen geben das Startkodon des GFP-Gens an.

6.2.8. Pim-1-K67M-GFP-Sequenz

+1	Asp Pro Leu Ala Leu Pro Asp Ser Asp Leu Glu Leu Lys Leu Ala Ala Met Glu Gln Lys
1	GATCCGCTAGCGCTCCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTGCCGCCATGGAGCAGAAA
+1	Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ala Arg Ala Asp Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
61	CTCATCTCTGAAGAGGATCTGGCCCGGGCGGATCCCGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAG
+1	Asp Leu Gly Cys Arg Asn Ser Met Leu Leu Ser Lys Ile Asn Ser Leu Ala His Leu Arg
121	GATCTGGGCTGCAGGAATTCGATGCTCTTGTCCAAAATCAACTCGCTTGCCCACCTGCGC
+1	Ala Ala Pro Cys Asn Asp Leu His Ala Thr Lys Leu Ala Pro Gly Lys Glu Lys Glu Pro
181	GCCGCGCCCTGCAACGACCTGCACGCCACCAAGCTGGCGCCCGGCAAGGAGAAGGAGCCC
+1	Leu Glu Ser Gln Tyr Gln Val Gly Pro Leu Leu Gly Ser Gly Gly Phe Gly Ser Val Tyr
241	CTGGAGTCGCAGTACCAGGTGGGCCCGCTACTGGGCAGCGGCGGCTTCGGCTCGGTCTAC
+1	Ser Gly Ile Arg Val Ser Asp Asn Leu Pro Val Ala Ile Met His Val Glu Lys Asp Arg
301	TCAGGCATCCGCGTCTCCGACAACTTGCCGGTGGCCATCATGCACGTGGAGAAGGACCGG
+1	Ile Ser Asp Trp Gly Glu Leu Pro Asn Gly Thr Arg Val Pro Met Glu Val Val Leu Leu
361	ATTTCCGACTGGGGAGAGCTGCCTAATGGCACTCGAGTGCCCATGGAAGTGGTCCTGCTG
+1	Lys Lys Val Ser Ser Gly Phe Ser Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg Pro
421	AAGAAGGTGAGCTCGGGTTTCTCCGGCGTCATTAGGCTCCTGGACTGGTTCGAGAGGCCC
+1	Asp Ser Phe Val Leu Ile Leu Glu Arg Pro Glu Pro Val Gln Asp Leu Phe Asp Phe Ile
481	GACAGTTTCGTCCTGATCCTGGAGAGGCCCGAGCCGGTGCAAGATCTCTTCGACTTCATC
+1	Thr Glu Arg Gly Ala Leu Gln Glu Glu Leu Ala Arg Ser Phe Phe Trp Gln Val Leu Glu
541	ACGGAAAGGGGAGCCCTGCAAGAGGAGCTGGCCCGCAGCTTCTTCTGGCAGGTGCTGGAG
+1	Ala Val Arg His Cys His Asn Cys Gly Val Leu His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile
601	GCCGTGCGGCACTGCCACAACTGCGGGGTGCTCCACCGCGACATCAAGGACGAAAACATC
+1	Leu Ile Asp Leu Asn Arg Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu
661	CTTATCGACCTCAATCGCGGCGAGCTCAAGCTCATCGACTTCGGGTCGGGGGCGCTGCTC
+1	Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp Ile
721	AAGGACACCGTCTACACGGACTTCGATGGGACCCGAGTGTATAGCCCTCCAGAGTGGATC
+1	Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg Ser Ala Ala Val Trp Ser Leu Gly Ile Leu Leu Tyr
781	CGCTACCATCGCTACCATGGCAGGTCGGCGGCAGTCTGGTCCCTGGGGATCCTGCTGTAT
+1	Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro Phe Glu His Asp Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gln Val
841	GATATGGTGTGTGGAGATATTCCTTTCGAGCATGACGAAGAGATCATCAGGGGCCAGGTT
+1	Phe Phe Arg Gln Arg Val Ser Ser Glu Cys Gln His Leu Ile Arg Trp Cys Leu Ala Leu
901	TTCTTCAGGCAGAGGGTCTCTTCAGAATGTCAGCATCTCATTAGATGGTGCTTGGCCCTG
+1	Arg Pro Ser Asp Arg Pro Thr Phe Glu Glu Ile Gln Asn His Pro Trp Met Gln Asp Val
961	AGACCATCAGATAGGCCAACCTTCGAAGAAATCCAGAACCATCCATGGATGCAAGATGTT
+1	Leu Leu Pro Gln Glu Thr Ala Glu Ile His Leu His Ser Leu Ser Pro Gly Pro Ser Lys
1021	CTCCTGCCCCAGGAAACTGCTGAGATCCACCTCCACAGCCTGTCGCCGGGGCCCAGCAAA
+1	Lys Pro Ser Thr Val Pro Arg Ala Arg Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly
1081	AAGCCGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGA
+1	Lys Glu Leu Phe Thr
1141	AAGGAGCTGTTCACC

Abb. 60 Pim-1-K67M-GFP-Sequenz
In dieser Abb. ist die Pim-1-K67M-GFP-Sequenz dargestellt. Das Start- und das modifizierte „Stopkodon" des Pim-1-K67M-Gens ist durch rote Buchstaben und die Mutation K67M durch grüne Buchstaben gekennzeichnet

6.2.9. Pim-1-WT-YFP-Sequenz

+1	Asp Pro Leu Ala Leu Pro Asp Ser Asp Leu Glu Leu Lys Leu Ala Ala Met Glu Gln Lys
1	GATCCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTGCCGCCATGGAGCAGAAA

+1	Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ala Arg Ala Asp Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
61	CTCATCTCTGAAGAGGATCTGGCCCGGGCGGATCCCGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAG

+1	Asp Leu Gly Cys Arg Asn Ser Met Leu Leu Ser Lys Ile Asn Ser Leu Ala His Leu Arg
121	GATCTGGGCTGCAGGAATTCGATGCTCTTGTCCAAAATCAACTCGCTTGCCCACCTGCGC

+1	Ala Ala Pro Cys Asn Asp Leu His Ala Thr Lys Leu Ala Pro Gly Lys Glu Lys Glu Pro
181	GCCGCGCCCTGCAACGACCTGCACGCCACCAAGCTGGCGCCCGGCAAGGAGAAGGAGCCC

+1	Leu Glu Ser Gln Tyr Gln Val Gly Pro Leu Leu Gly Ser Gly Gly Phe Gly Ser Val Tyr
241	CTGGAGTCGCAGTACCAGGTGGGCCCGCTACTGGGCAGCGGCGGCTTCGGCTCGGTCTAC

+1	Ser Gly Ile Arg Val Ser Asp Asn Leu Pro Val Ala Ile Lys His Val Glu Lys Asp Arg
301	TCAGGCATCCGCGTCTCCGACAACTTGCCGGTGGCCATCAAACACGTGGAGAAGGACCGG

+1	Ile Ser Asp Trp Gly Glu Leu Pro Asn Gly Thr Arg Val Pro Met Glu Val Val Leu Leu
361	ATTTCCGACTGGGGAGAGCTGCCTAATGGCACTCGAGTGCCCATGGAAGTGGTCCTGCTG

+1	Lys Lys Val Ser Ser Gly Phe Ser Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg Pro
421	AAGAAGGTGAGCTCGGGTTTCTCCGGCGTCATTAGGCTCCTGGACTGGTTCGAGAGGCCC

+1	Asp Ser Phe Val Leu Ile Leu Glu Arg Pro Glu Pro Val Gln Asp Leu Phe Asp Phe Ile
481	GACAGTTTCGTCCTGATCCTGGAGAGGCCCGAGCCGGTGCAAGATCTCTTCGACTTCATC

+1	Thr Glu Arg Gly Ala Leu Gln Glu Glu Leu Ala Arg Ser Phe Phe Trp Gln Val Leu Glu
541	ACGGAAAGGGGAGCCCTGCAAGAGGAGCTGGCCCGCAGCTTCTTCTGGCAGGTGCTGGAG

+1	Ala Val Arg His Cys His Asn Cys Gly Val Leu His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile
601	GCCGTGCGGCACTGCCACAACTGCGGGGTGCTCCACCGCGACATCAAGGACGAAAACATC

+1	Leu Ile Asp Leu Asn Arg Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu
661	CTTATCGACCTCAATCGCGGCGAGCTCAAGCTCATCGACTTCGGGTCGGGGGCGCTGCTC

+1	Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp Ile
721	AAGGACACCGTCTACACGGACTTCGATGGGACCCGAGTGTATAGCCCTCCAGAGTGGATC

+1	Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg Ser Ala Ala Val Trp Ser Leu Gly Ile Leu Leu Tyr
781	CGCTACCATCGCTACCATGGCAGGTCGGCGGCAGTCTGGTCCCTGGGGATCCTGCTGTAT

+1	Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro Phe Glu His Asp Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gln Val
841	GATATGGTGTGTGGAGATATTCCTTTCGAGCATGACGAAGAGATCATCAGGGGCCAGGTT

+1	Phe Phe Arg Gln Arg Val Ser Ser Glu Cys Gln His Leu Ile Arg Trp Cys Leu Ala Leu
901	TTCTTCAGGCAGAGGGTCTCTTCAGAATGTCAGCATCTCATTAGATGGTGCTTGGCCCTG

+1	Arg Pro Ser Asp Arg Pro Thr Phe Glu Glu Ile Gln Asn His Pro Trp Met Gln Asp Val
961	AGACCATCAGATAGGCCAACCTTCGAAGAAATCCAGAACCATCCATGGATGCAAGATGTT

+1	Leu Leu Pro Gln Glu Thr Ala Glu Ile His Leu His Ser Leu Ser Pro Gly Pro Ser Lys
1021	CTCCTGCCCCAGGAAACTGCTGAGATCCACCTCCACAGCCTGTCGCCGGGGCCCAGCAAA

+1	Lys Pro Ser Thr Val Pro Arg Ala Arg Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly
1081	AAGCCGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGC

+1	Glu Glu Leu Phe Thr
1141	GAGGAGCTGTTCACC

Abb. 61 Pim-1-WT-YFP-Sequenz
In dieser Abb. ist die Pim-1-WT-YFP-Sequenz dargestellt. Das Start- und das modifizierte „Stopkodon" des Pim-1-WT-Gens ist durch rote Buchstaben gekennzeichnet. Blaue Zeichen geben das Startkodon des YFP-Gens an.

6.2.10. Pim-1-K67M-YFP-Sequenz

```
+1    Asp Leu Glu Leu Lys Leu Ala Ala Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ala
  1   GATCTCGAGCTCAAGCTTGCCGCCATGGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGCC

+1    Arg Ala Asp Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Cys Arg Asn Ser Met
 61   CGGGCGGATCCCGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGGCTGCAGGAATTCGATG

+1    Leu Leu Ser Lys Ile Asn Ser Leu Ala His Leu Arg Ala Ala Pro Cys Asn Asp Leu His
121   CTCTTGTCCAAAATCAACTCGCTTGCCCACCTGCGCGCCGCGCCCTGCAACGACCTGCAC

+1    Ala Thr Lys Leu Ala Pro Gly Lys Glu Lys Glu Pro Leu Glu Ser Gln Tyr Gln Val Gly
181   GCCACCAAGCTGGCGCCCGGCAAGGAGAAGGAGCCCCTGGAGTCGCAGTACCAGGTGGGC

+1    Pro Leu Leu Gly Ser Gly Gly Phe Gly Ser Val Tyr Ser Gly Ile Arg Val Ser Asp Asn
241   CCGCTACTGGGCAGCGGCGGCTTCGGCTCGGTCTACTCAGGCATCCGCGTCTCCGACAAC

+1    Leu Pro Val Ala Ile Met His Val Glu Lys Asp Arg Ile Ser Asp Trp Gly Glu Leu Pro
301   TTGCCGGTGGCCATCATGCACGTGGAGAAGGACCGGATTTCCGACTGGGGAGAGCTGCCT

+1    Asn Gly Thr Arg Val Pro Met Glu Val Val Leu Leu Lys Lys Val Ser Ser Gly Phe Ser
361   AATGGCACTCGAGTGCCCATGGAAGTGGTCCTGCTGAAGAAGGTGAGCTCGGGTTTCTCC

+1    Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg Pro Asp Ser Phe Val Leu Ile Leu Glu
421   GGCGTCATTAGGCTCCTGGACTGGTTCGAGAGGCCCGACAGTTTCGTCCTGATCCTGGAG

+1    Arg Pro Glu Pro Val Gln Asp Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Gln Glu
481   AGGCCCGAGCCGGTGCAAGATCTCTTCGACTTCATCACGGAAAGGGGAGCCCTGCAAGAG

+1    Glu Leu Ala Arg Ser Phe Phe Trp Gln Val Leu Glu Ala Val Arg His Cys His Asn Cys
541   GAGCTGGCCCGCAGCTTCTTCTGGCAGGTGCTGGAGGCCGTGCGGCACTGCCACAACTGC

+1    Gly Val Leu His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp Leu Asn Arg Gly Glu
601   GGGGTGCTCCACCGCGACATCAAGGACGAAAACATCCTTATCGACCTCAATCGCGGCGAG

+1    Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe
661   CTCAAGCTCATCGACTTCGGGTCGGGGGCGCTGCTCAAGGACACCGTCTACACGGACTTC

+1    Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Ile Ala Leu Gln Ser Gly Ser Ala Thr Ile Ala Thr
721   GATGGGACCCGAGTGTATAGCCCTATAGCCCTCCAGAGTGGATCCGCTACCATCGCTACC

+1    Met Ala Gly Arg Arg Gln Ser Gly Pro Trp Gly Ser *** Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly
781   ATGGCAGGTCGGCGGCAGTCTGGTCCCTGGGGATCCTAGCTGTATGATATGGTGTGTGGA

+1    Asp Ile Pro Phe Glu His Asp Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gln Val Phe Phe Arg Gln Arg
841   GATATTCCTTTCGAGCATGACGAAGAGATCATCAGGGGCCAGGTTTTCTTCAGGCAGAGG

+1    Val Ser Ser Glu Cys Gln His Leu Ile Arg Trp Cys Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Arg
901   GTCTCTTCAGAATGTCAGCATCTCATTAGATGGTGCTTGGCCCTGAGACCATCAGATAGG

+1    Pro Thr Phe Glu Glu Ile Gln Asn His Pro Trp Met Gln Asp Val Leu Leu Pro Gln Glu
961   CCAACCTTCGAAGAAATCCAGAACCATCCATGGATGCAAGATGTTCTCCTGCCCCAGGAA

+1    Thr Ala Glu Ile His Leu His Ser Leu Ser Pro Gly Pro Ser Lys Lys Pro Ser Thr Val
1021  ACTGCTGAGATCCACCTCCACAGCCTGTCGCCGGGGCCCAGCAAAAAGCCGTCGACGGTA

+1    Pro Arg Ala Arg Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr
1081  CCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC
```

Abb. 62 Pim-1-K67M-YFP-Sequenz
In dieser Abb. ist die Pim-1-K67M-YFP-DNA-Sequenz dargestellt. Das Start- und das modifizierte „Stopkodon" des Pim-1-K67M-Gens ist durch rote Buchstaben und die Mutation K67M durch grüne Buchstaben gekennzeichnet. Blaue Zeichen geben das Startkodon des YFP-Gens an.

6.3. Listen

6.3.1. Chemikalien und Reagenzien

Agarose-Beads	Becton Dickinson, Heidelberg
Agarose NA	Amersham/GE Healthcare, Braunschweig
ATP	Amersham/GE Healthcare, Braunschweig
$[\gamma^{33}]$-ATP	Perkin Elmer, Rodgau - Jügesheim
ATP	Sigma, Deisenhofen
Big Dye v1.1 Cycle Sequencing kit	Applied Biosystems, Darmstadt
biotinyliertes Histon-H3 Peptid	Upstate, Lake Placid (USA)
BSA	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Medium	Gibco, Eggenstein
EDTA	Sigma, Deisenhofen
EndoFree Plasmid Maxi kit	QIAGEN, Hilden
Ethanol	Merck, Darmstadt
fötales Kälberserum	PAA, Cölbe
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche, Penzberg
Geneticin	Gibco, Eggenstein
Glutamin	Gibco, Eggenstein
Ham's F12 Medium	PAA, Cölbe
Hepes, pH 7,0	Biochrom KG, Berlin
HindIII spezifischer Puffer B	Roche, Penzberg
Hoechst 33342	Invitrogen, Karlsruhe
Immunglobulin	Dianova, Hamburg
Insulin	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
MES-Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
$MnCl_2$	Sigma, Deisenhofen
$MgCl_2$	Sigma, Deisenhofen
Na-Orthovanadat	Sigma, Deisenhofen
NuPage LDS 4x Probenpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage 10x Reducing Agent	Invitrogen, Karlsruhe

Östradiol	Sigma, Deisenhofen
Opti-MEM-I Medium	Gibco, Eggenstein
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PBS	Gibco, Eggenstein
PCR SuperMix	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin und Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Pim-1-GST	Upstate, Lake Placid (USA)
Platinum Pfx DNA Polymerase kit	Invitrogen, Karlsruhe
Proteaseinhibitorcocktail Tablette (complete Mini, EDTA-free)	Roche, Penzberg
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma, Deisenhofen
Protein-G-Agarose-Beads	KPL, Gaithersburg (USA)
QIAquik extraction kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR purification kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep kit	QIAGEN, Hilden
QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis kit	Stratagene, La Jolla (USA)
Restriktionsenzym HindIII	Roche, Penzberg
Restriktionsenzym SalI	Roche, Penzberg
RIPA-Puffer	Upstate, Lake Placid (USA)
SalI spezifischer Puffer H	Roche, Penzberg
sequence reaction cleanup kit	Milipore, Eschborn
Staurosporin	Sigma, Deisenhofen
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Gibco, Eggenstein
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, Ipswich (USA)
T4 DNA-Ligase Puffer (10x)	New England BioLabs, Ipswich (USA)
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
WesternBreeze Immunodetection kit	Invitrogen
XL1-Blue superkompetente *E.coli* Zellen	Stratagene, La Jolla (USA)

6.3.2. Laborgeräte und Materialien

Axiovert-200 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Axiovert-25 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Brutschrank	Hereaus, Osterode
Discovery-1 (Fluoreszenzmikroskop)	Molecular Devices
Inkubationsschüttler	Ecotron, Bad Aibling
Mikrotiterplatte 384-Well	Greiner, Frickenhausen
Mikrotiterplatte 96-Well (µclear Platte)	Greiner, Frickenhausen
Mikrotiterplatten 96-Well (sensoplate)	Greiner, Frickenhausen
Mini submarine Elektrophorese unit Hoefer HE33	Amersham/GE Healthcare, Braunschweig
Nitrozellulosemembran	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage-Novex 4-12%-ige Bis-Tris Gradientengele	Invitrogen, Karlsruhe
PCR-Maschine „Mastercycler"	Eppendorf, Hamburg
Plastikröhrchen: 15ml, 50ml	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Plastikröhrchen: 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg
310 Genetic Analyser (Sequenziermaschine)	Applied Biosystems, Darmstadt
Streptavidin FlashPlate HTA-Plus	Perkin Elmer, Rodgau - Jügesheim
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge BioFuge-fresco	Heraeus, Osterode
TopCount-NXT	Perkin Elmer, Rodgau - Jügesheim
Wasserbad Julabo TW8	Julabo, Seelbach
XCell II Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
XCell SureLock Mini Cell Elektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Corning, Schiphol-Rijk (Niederlande)
Zentrifuge RC5C	Sorvall Instruments, Langenselbold

6.3.3. Antikörper

monoklonaler anti c-myc Antikörper Klon 9E10 aus der Maus

#M 4439, Sigma, Deisenhofen

monoklonaler anti-p21 Antikörpermix aus der Maus

                                    #05-345, Upstate, Lake Placid (USA)

monoklonaler anti-p21 Antikörpermix aus der Maus

                                    #05-345, Upstate, Lake Placid (USA)

polyklonaler anti-p-p21-Thr145 Antikörper aus dem Kaninchen

                                    #sc-20220-R, Santa Cruz Bio., Santa Cruz (USA)

polyklonaler anti-p-p21-Ser146 Antikörper aus der Ziege

                                    #sc-12902, Santa Cruz Bio., Santa Cruz (USA)

monoklonaler anti-c-myc Antikörper aus der Maus

                                    #4439, Sigma, Deisenhofen

monoklonaler anti-α-Tubulin Antikörper aus der Maus, FITC konjugiert

                                    #2168, Sigma, Deisenhofen

monoklonaler anti-γ-Tubulin Antikörper aus der Maus

                                    #6557, Sigma, Deisenhofen

polyklonaler anti-phospho-Histon-H3 (Ser10) Antikörper aus dem Kaninchen

                                    #06-570, Upstate, Lake Placid (USA)

Sekundär Antikörper Cy2, Cy3 oder Cy5 konjugiert

                                    Jackson ImmunResearch, Soham (England)

6.3.4. Expressionsplasmide

pECFP-N1(Klonierungsvektor)   Becton Dickinson, Heidelberg

pEGFP-N1(Klonierungsvektor)   Becton Dickinson, Heidelberg

pEYFP-N1(Klonierungsvektor)   Becton Dickinson, Heidelberg

c-Myc-Pim-1-WT-   Frau Dr. L. Toschi, Schering AG, Berlin
   Expressionsplasmid (pCMV-tag3)

p21-WT-Expressionsplasmid   RZPD, Berlin
   (pOTB7, Klon ID: IRALp962C169)

6.3.5. Computerprogramme

Vector NTI   Invitrogen, Karlsruhe

Excell   Microsoft, (USA)

Programms GraFit 5.0.6   Erithacus software Limited, Surrey (England)

Programms MetaMorph 6.2   Molecular Devices, Downingtown (USA)

6.3.6. Abkürzungen

AFP	autofluoreszierende Proteine
BSA	Rinderserumalbumin
CAK	CDK activating kinases
CDK	cyclin dependent kinase
CFP	blau (cyan) fluoreszierendes Proteinen
DMSO	Dimethylsulfoxid
GFP	grün fluoreszierendes Proteinen
Cpm	counts pro Minute
HCA	High Content Analysis
IP	Immunpräzipitation
MCS	multiple cloning site
MG	Molekulargewicht
NLS	nuclear localisation signal
NuMA	nuclear mitotic apparatus protein
PCNA	proliferting cell nuclear antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehydlösung
Pim-1	proviral integration site for murine leukemia virus
Rb	Retinoblastoma Protein
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STAT	signal transducers and activators of transcription
WT	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Proteinen

7. Verzeichnes der Abbildungen