

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1 Definition	11
1.2 Entstehung des Augeninnendrucks und Morphologie des Kammerwinkels	11
1.3 Genetische Aspekte des primären Offenwinkelglaukoms (POWG)	13
1.3.1 Myocilin	14
1.3.2 Myocilin und seine Mutationen	19
1.4 Aufgabenstellung	20
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Molekularbiologische Methoden	23
2.1.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	23
2.1.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	23
2.1.3 DNA-Reinigung	23
2.1.4 Isolierung von DNA aus Mäuseschwänzen	23
2.1.5 DNA-Sequenzanalyse	24
2.1.6 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	24
2.1.7 Transformation von <i>E. coli</i>	24
2.1.8 Klonierung in TOPO-TA und TOPO-blunt	24
2.1.9 Western Blot	24
2.1.10 Dot Blot	25
2.1.11 RNA-Isolierung	26
2.1.12 Herstellung der cDNA (complementary DNA)	27
2.1.13 Amplifizierung von DNA-Fragmenten über Polymerase Ketten-Reaktion (PCR)	27
2.1.14 Herstellung der RNA-Sonden	28
2.1.15 Northern Blot	29
2.1.16 Southern Blot	31
2.2 Klonierung des Myocilin Überexpressionsplasmids	32
2.3 Klonierung des Myocilin mut Überexpressionsplasmids	33
2.4 Tiere und Tierhaltung	34

---

2.5	Kammerwasserentnahme und Präparation der Augen . . . . .	34
2.6	Messungen des intraokulären Druckes an Mäusen . . . . .	35
2.7	Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen . . . . .	36
2.7.1	Eponeinbettung . . . . .	36
2.7.2	Methacrylateinbettung mit Technovit 7100 . . . . .	36
2.7.3	Paraffineinbettung für die Immunhistochemie . . . . .	37
2.7.4	In situ Hybridisierung (ISH) . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Klonierung der Überexpressionsplasmide . . . . .	39
3.2	Untersuchung der Myocilin Überexpressionslinien . . . . .	39
3.2.1	Überprüfung der Integration des Myocilin Überexpressionskonstruktes . . . . .	39
3.2.2	Vergleich der Expressionsrate der transgenen Myocilin Konstrukte . . . . .	40
3.2.3	Western Blots zum Nachweis von Myocilin . . . . .	42
3.2.4	Immunhistochemischer Nachweis des überexprimierten Myocilins . . . . .	43
3.2.5	Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen . . . . .	45
3.2.6	Messungen des intraokulären Drucks . . . . .	48
3.3	Untersuchung der mMYOC-Mauslinien . . . . .	49
3.3.1	Überprüfung der Integration des mMYOC-Konstruktes . . . . .	49
3.3.2	Die RNA Expression von mMYOC . . . . .	49
3.3.3	Proteinanalyse von mMYOC . . . . .	51
3.3.4	Struktur der Linse von mMYOC-Mäusen . . . . .	52
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
4.1	Myocilin . . . . .	55
4.2	Mutiertes Myocilin . . . . .	58
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>

## Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung des Trabekelwerkes und des Kammerwasserabflußsystems des menschlichen Auges . . . . .	12
2	Aufbau von Myocilin mit möglichen funktionellen Motiven und den bekannten Mutationen . . . . .	15
3	In situ Hybridisierung von Myocilin im Trabekelwerk des Auges . . . . .	17
4	Konstrukt $\beta$ B1-MYOC-Maus . . . . .	33
5	Sequenzierung der eingeführten Punktmutation . . . . .	33
6	Konstrukt $\beta$ B1-mMYOC-Maus . . . . .	34
7	Überexpressionskonstrukte $\beta$ B1-MYOC und $\beta$ B1-mMYOC . . . . .	39
8	Southern Blot von DNA aus $\beta$ B1-MYOC-Mäusen . . . . .	40
9	Northern Blots, in situ Hybridisierung (ISH) und Western Blots zum Nachweis des überexprimierten Myocilins . . . . .	41
10	Vergleich der Proteinmenge von Myocilin im KW der transgenen Mäuse mit verschiedenen KW-Proben aus dem Menschen . . . . .	44
11	Immunhistochemische Darstellung von Myocilin im Auge normaler WT-Tiere und $\beta$ B1-MYOC transgener Tiere . . . . .	46
12	Licht- und elektronenmikroskopische Analyse der Gewebe des vorderen Auges . . . . .	47
13	Messung des IOD von $\beta$ B1-MYOC-Mäusen und WT-Tieren . . . . .	48
14	Southern Blot von DNA aus $\beta$ B1-mMYOC-Mäusen . . . . .	49
15	Northern und Western Blots zum Nachweis des transgen überexprimierten, mutierten Myocilins . . . . .	50
16	Licht-, elektronenmikroskopische und immunhistochemische Analyse der Linse von $\beta$ B1-mMYOC-Mäusen und WT-Tieren . . . . .	53
17	Auflichtmikroskopie des Auges einer transgenen $\beta$ B1-mMYOC-Maus mit Expression von mutiertem Myocilin und eines normalen WT-Tieres . . . . .	54

---

## Tabellenverzeichnis

1	Liste der identifizierten Genloci für das primäre Offenwinkelglaukom . . . .	14
2	Gesamtproteinmenge und normalisierte Werte von Myocilin im KW der transgenen Mäuse und in verschiedener KW-Proben aus dem Menschen im Dot Blot . . . . .	26
3	Liste der im Northern- und Southern Blot verwendeten Primer für Sonden .	29
4	Primer zur Klonierung der MYOC-Maus . . . . .	32
5	Liste der verwendeten Primärantikörper . . . . .	37
6	Liste der verwendeten Sekundärantikörper und Fluoreszenzfarbstoffe . . .	38