

**ENDOGENOUS WNT/ β -CATENIN SIGNALING IN MÜLLER
CELLS PROTECTS RETINAL GANGLION CELLS FROM
EXCITOTOXIC DAMAGE**



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Durchgeführt am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Fabian Raphael Bösl

aus Nürnberg

im Jahr 2020

**ENDOGENOUS WNT/ β -CATENIN SIGNALING IN MÜLLER
CELLS PROTECTS RETINAL GANGLION CELLS FROM
EXCITOTOXIC DAMAGE**



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Durchgeführt am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Fabian Raphael Bösl

aus Nürnberg

im Jahr 2020

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 19.11.2020

Die Arbeit wurde angeleitet von:
PD Dr. med. Andreas Ohlmann

Fabian Raphael Bösl

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
2. Material und Methoden.....	7
2.1. Versuchstiere.....	7
2.2. NMDA-Schadensmodell	9
2.3. Lichtmikroskopie.....	10
2.4. Histologische Färbungen.....	10
2.4.1. X-Gal histochemische Färbung.....	10
2.4.2. Immunhistochemischer Nachweis von Sox9	11
2.4.3. TUNEL-Färbung	11
2.5. Expressionsanalysen.....	12
2.6. Proteinbiochemische Techniken.....	13
2.7. Statistik.....	14
3. Ergebnisse.....	15
3.1. Tamoxifen-induzierte β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen.....	15
3.1.1. Verifizierung der Expression der Cre-Rekombinase in Müllerzellen	15
3.1.2. Verifizierung der konditionalen β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen	16
3.1.3. Auswirkung der β -Catenin Defizienz auf Müllerzellen.....	16
3.2. Einfluss der Wnt/ β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen auf den NMDA- vermittelten exzitotoxischen Schaden in RGC.....	18
3.2.1. Analyse der Sehnervenschädigung	18
3.2.2. Morphologische Untersuchung der Retina.....	20
3.2.3. Untersuchung der NMDA-induzierten Apoptose.....	23
3.3. Akuter retinaler Ganglienzell-Schaden induziert den Wnt/ β -Catenin- Signalweg in Müllerzellen	25
3.4. Untersuchung der Gliosereaktion	26
3.5. Expressionsanalysen protektiver Faktoren	27

4. Diskussion	28
5. Zusammenfassung	32
6. Anhang	34
6.1. Literaturverzeichnis.....	34
6.2. Abkürzungsverzeichnis.....	40
6.3. Abbildungsverzeichnis.....	42
6.4. Tabellenverzeichnis.....	43
6.5. Originalpublikation	44
6.6. Danksagung	59
6.7. Erklärung	60

1. Einleitung

Der *wingless*- (Wnt-) Signalweg ist an zahlreichen Prozessen wie der embryonalen Entwicklung, der Aufrechterhaltung der Homöostase in Erwachsenen und der Tumorentstehung beteiligt. Die Mitglieder der Wnt-Familie sind sezernierte Lipoglykoproteine, welche mit hoher Affinität an *frizzled*-Rezeptoren binden. β -Catenin ist das zentrale Signalmolekül des kanonischen Wnt-Signalweges und wird in den meisten Zellen fortlaufend exprimiert. In Abwesenheit der Wnt-Proteine wird β -Catenin kontinuierlich durch seinen Abbaukomplex degradiert. Nachdem Wnt-Proteine an ihren *frizzled*-Rezeptor binden, wird ein Komplex mit dem Co-Rezeptor *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) 5 oder 6 gebildet. Dieser Komplex inaktiviert den β -Catenin-Abbaukomplex durch Bindung desselbigen an die Zellmembran. Nach der Anreicherung von β -Catenin im Zytoplasma transloziert β -Catenin in den Zellkern und induziert die Expression von Wnt-spezifischen Zielgenen (1).

In der Retina ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg an der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Gefäßsystems und der Homöostase der Neurone beteiligt. Das sezernierte Protein Norrin ist der Hauptmediator des retinalen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und wird spezifisch von Müller-Zellen exprimiert (2). Norrin aktiviert durch Bindung an *frizzled* 4 oder den *leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor* (LGR) 4 den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Gegenwart seines Co-Rezeptors LRP 5 oder 6 (3–5).

Während der Entwicklung des retinalen Gefäßsystems ist der Norrin-vermittelte Wnt/ β -Catenin-Signalweg essenziell für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der inneren Blut-Retina-Schranke, für die Bildung des intraretinalen Gefäßplexus sowie das Gefäßwachstum von der inneren retinalen Oberfläche zur *Ora serrata* (6–8). In einem Mausmodell der Frühgeborenen-Retinopathie fördert Norrin zusätzlich zu seiner Funktion in der retinalen Gefäßentwicklung das Wachstum von Gefäßen in ischämische Areale (9).

Mehrere Studien belegen einen neuroprotektiven Effekt von Norrin auf retinale Neurone. Während Mäuse mit einem Norrinmangel neben Gefäßveränderungen auch einen kontinuierlichen Verlust retinaler Ganglienzellen (RGC) erleiden, zeigen Mäuse mit einer Überexpression an Norrin während der Entwicklung eine verstärkte Proliferation der retinalen Vorläuferzellen (6,7). Norrin schützt im Tiermodell RGC nach akutem Schaden durch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), sowie Photorezeptoren nach

akutem Lichtschaden vor der Apoptose (10,11). In beiden Tiermodellen wurde eine Wnt/ β -Catenin-abhängige Induktion neuroprotektiver Faktoren, unter anderem des *leukemia inhibitory factor* (Lif), des Endothelin (Edn)-2, des *brain-derived neurotrophic factor*, des *ciliary neurotrophic factor* (Cntf) und des *fibroblast growth factor* (Fgf)-2, beobachtet. In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass Norrin seinen protektiven Effekt auf RGC nach der Injektion von NMDA in den Glaskörper durch die Induktion von Lif vermittelt (12). In DBA/2J Mäusen, welche einen erhöhten intraokulären Druck und eine chronische Degeneration der RGC aufweisen, schützt Norrin die Zellen durch eine Wnt/ β -Catenin-vermittelte Induktion des *insulin-like growth factor-1* (13). Müllerzellen besitzen über die verstärkte Expression neuroprotektiver Faktoren die Fähigkeit, schützende Effekte auf geschädigte retinale Neurone zu vermitteln (14). Deshalb stellten wir die Hypothese auf, dass die Aktivierung des endogenen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen einen protektiven Effekt auf RGC ausübt, nachdem diese einen akuten exzitotoxischen Schaden erlitten haben. Aus diesem Grund generierten wir ein Mausmodell mit einem Tamoxifen- (Tx-) abhängigen, konditionalen β -Catenin-Defizienz spezifisch in Müllerzellen. Nach der Induktion der β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen wurde durch intravitreale Injektion von NMDA experimentell ein exzitotoxischer Schaden in RGC induziert und dieser untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Haltung und Behandlung der Versuchstiere entsprach den Bestimmungen des „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“. Zudem lagen für die durchgeführten Tierversuche genehmigte Tierversuchsanträge der Regierung der Oberpfalz, Bayern, vor (Aktenzeichen: 54-2532.1-06/14). Die Versuchstiere wurden in der Tierhaltung der naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg unter Standardbedingungen (Temperatur 23 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit $55 \pm 5\%$, Futter und Wasser ad libitum) mit 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Für alle Untersuchungen wurden sowohl männliche als auch weibliche Versuchstiere verwendet.

Als Versuchstiere wurden transgene Mäuse mit einem Tx-abhängigen, konditionalen β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen (Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}) verwendet. Für den

konditionalen Knockout wurde das aus dem Bakteriophagen P1 stammende Cre/loxP-System genutzt. Hierbei wird das zu inaktivierende Gen mit zwei loxP-Sequenzen flankiert, welche von der Cre-Rekombinase erkannt werden. Das Cre-Protein katalysiert die Rekombination zwischen den beiden loxP-Sequenzen und deletiert so die intervenierende DNA-Sequenz (15). Um eine zeitliche, Tx-abhängige Induktion der Rekombination zu ermöglichen, wurde die Cre^{ERT}-Variante verwendet. Hier liegt die Cre-Rekombinase als Fusionsprotein mit der modifizierten, Tx-selektiven Liganden-Bindedomäne des Östrogen-Rezeptors vor und wird komplexiert mit Hitzeschockproteinen im Zytoplasma zurückgehalten. Durch Bindung des synthetischen Liganden Tamoxifen an die Liganden-Bindedomäne des Östrogen-Rezeptors dissoziiert der Komplex, das Cre-Fusionsprotein transloziert in den Zellkern und induziert dort die Rekombination des mit den loxP-Erkennungssequenzen flankierten Zielgens, in dem vorliegenden Fall die Exone 2 bis 6 des β -Catenin-Gens (*Ctnnb1*). Zusätzlich zur zeitlichen Induzierbarkeit durch Tx-Gabe wurde eine räumliche, zellspezifische Expression der Cre^{ERT}-Rekombinase in Müllerzellen erzielt, indem die Transkription der Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des Müllerzell-spezifischen Promotors Slc1a3 gestellt wurde (Slc1a3-Cre^{ERT}).

Zur Generierung der Slc1a3-Cre^{ERT}/*Ctnnb1*^{fl/fl}-Mäuse wurden *Ctnnb1*^{fl/fl}-Mäuse (Herkunft: Prof. Dr. Rolf Kemler, Universität Freiburg, (16)) mit Slc1a3-Cre^{ERT}-Mäusen (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) gekreuzt. Beide Mauslinien wurden im C57BL/6J Hintergrund gezüchtet. Um die selektive Expression und Aktivität der Cre-Rekombinase in den Retinae der Slc1a3-Cre^{ERT}-Mäuse zu überprüfen, wurden diese mit transgenen Rosa26-LacZ-Reportermausen verpaart (17). Diese Reportermause exprimieren unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven Rosa26-Promotors β -Galaktosidase. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Deletion einer durch zwei loxP-Erkennungssequenzen flankierten Neomycin-Kassette mit Poly-A-Signal, welche als Stopp-Kassette den Promotor vom LacZ-Gen trennt, durch die aktivierte Cre-Rekombinase. Nach der Deletion kann die gebildete β -Galaktosidase das Substrat X-Gal spalten und führt zu einer spezifischen Blaufärbung.

Zur Identifikation transgener Mäuse wurden PCR Genotypisierungen unter Verwendung der in Tabelle 1 aufgeführten Oligonukleotidprimer durchgeführt.

Tabelle 1: Oligonukleotidprimer für Genotypisierungen

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'	Produktgröße
Ctnnb1^{fl/fl}	<i>Mus musculus</i>	forward	aaggtagagtgatgaaagttggt	221 bp (WT)
		reverse	caccatgtcctctgtctattc	324 bp (TG)
LacZ	<i>Mus musculus</i>	forward	atcctctgcatggtcaggtc	~ 300 bp
		reverse	cgtggcctgattcattcc	
Slc1a3-Cre	<i>Mus musculus</i>	forward	acaatctggcctgctaccaagc	~ 600 bp
		reverse	ccagtgaacacagcattgctgtc	

Die Amplifikation der jeweiligen DNA-Abschnitte erfolgte mittels des Thermocyclers Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) mit dem Programm Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 60°C für 30 s und Extension bei 72°C für 45 s über 35 Zyklen. Alle Primer wurden von Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen.

Zur Induktion der Cre-vermittelten Rekombination erhielten 6 Wochen alte Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse und Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ-Mäuse sowie Rosa26-LacZ- und Ctnnb1^{fl/fl}-Kontrolltiere ohne Cre-Transgen für einen Zeitraum von 5 Tagen zweimal täglich eine intraperitoneale (i.p.) Injektion mit je 50 µl Tx (20mg/ml) nach Anästhesie mit Isofluran.

2.2. NMDA-Schadensmodell

NMDA ist ein synthetisches Glutamat-Analogon, das nach Bindung an NMDA-Typ-Glutamat-Rezeptoren zu einer Hyperaktivierung der Neurone führt und dadurch exzitotoxischen Schaden verursacht. Die Exzitotoxizität ist bedingt durch einen starken Einstrom von Kalzium-Ionen in das Zytoplasma der Neurone, welcher zur Aktivierung proapoptotischer Signalkaskaden führt (18).

Um einen exzitotoxischen Schaden in der Retina zu verursachen, wurden 8 Wochen alte Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse und Ctnnb1^{fl/fl}-Kontrolltiere durch Inhalation von Isofluran anästhesiert. Anschließend wurden ihnen 3 µl NMDA (Konz. 10 mM, gelöst in PBS) in den Glaskörper eines Auges injiziert, während in das kontralaterale Auge 3 µl PBS als Kontrolllösung injiziert wurden (10). Die Augen, Sehnerven und Retinae der Tiere wurden zu den genannten Zeitpunkten entnommen.

2.3. Lichtmikroskopie

Im Anschluss an die Tx-Behandlung und 2 Wochen nach der NMDA-Injektion wurden die Augen und *Nn. optici* der *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse und *Ctnnb1^{fl/fl}*-Kontrolltiere enukleiert und über Nacht in Cacodylatpuffer (10,7 g Cacodylsäure in 0,5 l H₂O, pH 7,2) mit 2,5% Paraformaldehyd (PFA) und 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden sie mit Cacodylatpuffer gewaschen und mit 1% Osmiumtetroxid nachfixiert. Nach der Dehydrierung wurden die Augen und Sehnerven nach Standardprotokoll in Epon (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet. Meridionale Semidünnschnitte (1 µm) der Augen wurden mit Fuchsin/Methylenblau, Semidünnschnitte (1 µm) der Sehnerven mit Paraphenyldiamin gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert (Axiovision Mikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die Quantifizierung der Axone in den Sehnerven erfolgte anhand einer von Anderson *et al.* entwickelten Methode (19). Hierzu wurde ein Raster mit einem zentralen und 4 peripheren Quadraten (jeweils 40 x 40 µm), welche mehr als 10% der Gesamtfläche der Sehnerven bedecken, über die Sehnerven gelegt. Die Anzahl der Axone innerhalb der Quadrate wurde mithilfe der Software ImageJ ausgezählt und die Gesamtzahl der Axone über die Gesamtfläche der Sehnerven extrapoliert.

Die Vermessung der retinalen Schichten erfolgte gemäß dem von Forkwa *et al.* in unserer Arbeitsgruppe etablierten Protokoll (20). In meridionalen Semidünnschnitten der Retinae wurde die Strecke zwischen der *Ora serrata* und dem Sehnervenkopf (ONH) mit der Software ImageJ in Zehntel geteilt und zwischen den Zehnteln die Gesamtdicke der Retina, die Dicke der inneren Körnerschicht (INL) und der äußeren Körnerschicht (ONL), sowie die Dicke der inneren plexiformen Schicht (IPL) und der äußeren plexiformen Schicht (OPL) mit der Axiovision Software 4.8 (Carl Zeiss) bestimmt.

2.4. Histologische Färbungen

2.4.1. X-Gal histochemische Färbung

Zwei Wochen nach der Tx-Behandlung wurden die Augen der *Slc1a3-Cre^{ERT}/RosaLacZ* Mäuse und *RosaLacZ*-Kontrolltiere präpariert und 1 h bei 4 °C in 2% PFA und 0,2% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) fixiert. Die Augen wurden dreimal für je 30 min mit 0,01% Natriumdeoxycholat, 0,02% NP-40, 2 mM

MgCl₂, 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,3) gewaschen und über Nacht mit LacZ Färbelösung (0,1 M Phosphatpuffer mit pH 7,3, 3 mM MgCl₂, 0,01% Natriumdeoxycholat, 0,02% NP-40, 5 mM K₄Fe(CN)₆·3H₂O, 5 mM K₃Fe(CN)₆, und 1 mg/ml X-Gal) bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Augen nach Standardprotokoll in Paraffin eingebettet und als 6 µm dicke Meridionalschnitte fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Axio Observer 7 Fluoreszenzmikroskop, Carl Zeiss).

2.4.2. Immunhistochemischer Nachweis von Sox9

Für den immunhistochemischen Nachweis des Transkriptionsfaktors Sox9 wurden die Augen der Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse und ihrer Ctnnb1^{fl/fl}-Kontrolltiere 2 Wochen nach Tx-Behandlung entnommen und für 4 h in 4% PFA fixiert. Anschließend wurden sie nach Standardprotokoll in Paraffin fixiert und Meridionalschnitte (6 µm) gefertigt. Für die Sox9-Färbung wurden die Schnitte in einer Alkoholreihe entparaffiniert, anschließend 20 min bei 100 °C mit 1x Target Retrieval Solution (Dako North America, Carpinteria, Kalifornien, USA) behandelt, für 5 min mit 1x PBS bei Raumtemperatur (RT) gewaschen und dann für weitere 10 min mit 0,25% Triton X-100 in 1x PBS bei RT inkubiert. Nachdem die Schnitte für 60 min mit 3% bovinem Serumalbumin (BSA) und 0,1% Triton X-100 in 1x PBS blockiert wurden, erfolgte über Nacht die Inkubation mit Rabbit anti-Mouse Sox9 Antikörpern (1:50, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0,2% BSA und 0,01% Triton X-100 in 1x PBS bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS für je 10 Minuten, wurden die Proben 60 min mit den sekundären, mit dem Fluorophor Cy3-konjugierten Goat anti-Rabbit Antikörpern (1:1000; Thermo Fisher) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x PBS für je 10 Minuten wurden die Schnitte mit *Fluorescent Mounting Medium* (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA), welches 1:50 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) als Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA enthält, eingedeckelt. Die Schnitte wurden fluoreszenzmikroskopisch mit einem Axio Observer 7 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss) analysiert.

2.4.3. TUNEL-Färbung

Zur Ermittlung der Anzahl apoptotischer Zellen in den Retinae wurden TUNEL- (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated biotinylated UTP nick end labeling*)

Färbungen angefertigt. Die Darstellung apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay erfolgt durch die Markierung der Enden von DNA-Fragmenten, welche beim programmierten Zelltod entstehen, mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Durch Doppelstrangbrüche entstehen an den einzelnen DNA-Abschnitten freie Hydroxylgruppen, die durch eine terminale Deoxynukleotidyl-Transferase mit Fluoreszein-12-gekoppelten UTPs versehen werden (21). Für die Färbung wurden die Augen der *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse und der *Ctnnb1^{fl/fl}*-Kontrolltiere 24 h nach NMDA Injektion und 2 Wochen nach Tx-Behandlung entnommen und für 4 h in 4% PFA fixiert. Anschließend wurden sie nach Standardprotokoll in Paraffin fixiert und Meridionalschnitte (6 µm) angefertigt.

Nach Entparaffinierung über eine Alkoholreihe wurden die Schnitte mit dem *Deadend Fluorometric TUNEL system* (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) nach Anweisung des Herstellers gefärbt. Die Schnitte wurden mit dem Axio Observer 7 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss) analysiert und die Anzahl apoptotischer Zellen quantifiziert.

2.5. Expressionsanalysen

Für die Expressionsanalysen verschiedener retinaler Faktoren wurden quantitative real-time RT-PCR-Analysen durchgeführt. Zur Isolation der benötigten RNA wurden die Augen der *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse und der *Ctnnb1^{fl/fl}*-Kontrolltiere 2 Wochen nach Tx-Behandlung (für den Sox9 Nachweis) bzw. 7 h nach intravitrealer Injektion von NMDA und PBS (*Lif*, *Edn2*, *Fgf 2*, *glial fibrillary acidic protein* [*Gfap*]) enukleiert und die Retinae präpariert. Anschließend wurden die Retinae in *peqGOLD TriFast* (Peqlab, Erlangen, Deutschland) homogenisiert und die Gesamt-RNA nach Anweisung des Herstellers isoliert. Die RNA-Konzentration und der OD₂₆₀/OD₂₈₀-Quotient wurden mit dem *NanoDrop Spectrophotometer ND-2000c* (Peqlab) gemessen. Nur RNA mit einem 260/280-Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 wurden für die Synthese von komplementärer cDNA mit dem *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) eingesetzt. Die quantitativen real-time RT-PCR-Analysen wurden mit einem *Bio-Rad iQ5 Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) durchgeführt. Die PCRs wurden mit der *HotStart Taq DNA Polymerase* (Qiagen, Hilde, Deutschland) entsprechend der Herstellerempfehlung durchgeführt. Für die PCRs wurde ein Reaktionsansatz von 15 µl verwendet, welcher 1,5 µl 10x PCR Puffer

(Qiagen), 0,6 µl 25 mM MgCl₂ (Qiagen), 0,12 µl dNTPs (jeweils 25 mM, Qiagen), 0,06 µl HotStart Taq (5 U/µl, Qiagen), 0,16 µl Primer Mix (jeweils 1 µM, Thermo Fisher) und 0,39 µl 1x SYBR Green I Lösung (Qiagen) beinhaltet. Als PCR-Programm wurde das folgende Temperaturprofil verwendet: 40 Zyklen mit 20 s Denaturierung bei 95 °C, 10 s Annealing bei 60 °C und 20 s Extension bei 70°C. Als Negativkontrolle wurde RNA verwendet, die nicht mittels reverser Transkriptase in cDNA transkribiert wurde. Alle Primerpaare (Tabelle 2) wurden von Thermo Fisher bezogen und so konzipiert, dass eine Exon-Intron-Grenze amplifiziert wurde. Um die relative Expression der untersuchten Faktoren zu quantifizieren, wurde die Expression dieser Faktoren ins Verhältnis zur Expression des Referenzgens Gnb2l1 gesetzt. Die Ergebnisse wurden mit der *iQ5 optical system software* (Version 2.1) ausgewertet.

Tabelle 2: Oligonukleotidprimer für real-time RT-PCR

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'	Produktgröße
Edn2	<i>Mus musculus</i>	forward	acctcctccgaaagctgag	76 bp
		reverse	tttctgtcacctctggctgta	
Fgf2	<i>Mus musculus</i>	forward	cggctctactgcaagaacg	108 bp
		reverse	tgcttgagttgtagttgacg	
Gfap	<i>Mus musculus</i>	forward	tcgagatcgccacctacag	67 bp
		reverse	gtctgtacaggaatggatgatgc	
Gnb2l1	<i>Mus musculus</i>	forward	tctgcaagtacacggccag	89 bp
		reverse	acgatgataggggtgctgct	
Lif	<i>Mus musculus</i>	forward	cgccaatgctctcttcattt	80 bp
		reverse	taggcgcacatagctttcc	
Sox9	<i>Mus musculus</i>	forward	gtacccgcatctgcacaac	94 bp
		reverse	ctcctccacgaagggtctct	

2.6. Proteinbiochemische Techniken

Zur Untersuchung der retinalen β-Catenin Expression wurden die Retinae sowohl von 8 Wochen alten Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse und der Ctnnb1^{fl/fl}-Kontrolltiere nach intravitrealer NMDA- und PBS-Injektion als auch von 8 Wochen alten Tieren ohne entsprechende intravitreale Injektion präpariert und in peqGOLD TriFast

Extraktionspuffer (Peglab) homogenisiert. Im Anschluss wurden die retinalen Proteine nach Anweisung des Herstellers isoliert. Die Proteinkonzentration wurde mittels des Bicinchoninsäure- (BCA) Assays (Interchim, Wörgl, Österreich) bestimmt. Bis zu 25 µg des Gesamtproteins wurden auf ein 10% Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Dann wurden die aufgetrennten Proteine mittels Semidry-Blotting auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roche, Rotkreuz, Schweiz) übertragen. Nachdem die Membranen mit 5% BSA in *Tris-buffered saline and Tween 20* (TBST) geblockt wurden, erfolgte die Inkubation mit *Rabbit anti-Mouse-β-catenin* Antikörpern (1:1000; Cell Signaling, Cambridge, Vereinigtes Königreich) in TBST mit 0,5% BSA über Nacht. Als sekundäre Antikörper wurden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte *anti-Rabbit* Antikörper (Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA) verwendet. Die Darstellung der Antikörpermarkierten Proteinbanden erfolgte über das *Immobilon HRP substrate* (Millipore, Darmstadt, Deutschland). Mit dem *LAS 3000 Imager* (Fujifilm, Tokyo, Japan) wurde das resultierende Chemolumineszenz-Signal aufgenommen und in Graustufen umgesetzt. Als Ladungskontrolle wurden HRP-gekoppelte anti-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Antikörper (Cell Signaling) verwendet. Die Auswertung der Western Blot Analysen erfolgte mittels Densitometrie mithilfe der Software *Aida Advanced 208 Image Data Analyzer v.4.06* (Raytest, Straubenhardt, Deutschland).

2.7. Statistik

Alle Werte werden als Mittelwerte zusammen mit ihrem Standardfehler (SEM) angegeben. Für die statistischen Untersuchungen wurde zunächst mittels ANOVA die Verteilung der Varianzen ermittelt. Bei homogener Verteilung der Varianzen wurde zur Untersuchung auf statistisch signifikante Unterschiede der Games-Howell-Test, bei inhomogener Verteilung der Varianzen der *Fishers Least Significant Difference* (LSD)-Test genutzt. Bei p-Werten („Probability“) < 0,05 (*) wurden die Unterschiede als signifikant, bei $p < 0,01$ (***) als hoch signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Tamoxifen-induzierte β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen

3.1.1. Verifizierung der Expression der Cre-Rekombinase in Müllerzellen

Zur Verifizierung der Expression der Cre-Rekombinase in Müllerzellen der Slc1a3-Cre^{ERT}-Mäuse, wurden Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ-Mäuse gezüchtet, die nach Cre-vermittelter Rekombination LacZ exprimieren. 2 Wochen nach Tx-Behandlung wurde an meridionalen Paraffinschnitten der Augen von 8 Wochen alten Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ-Mäusen X-Gal-Färbungen durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Rosa26-LacZ-Tiere ohne Expression einer Cre-Rekombinase. Die Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ-Tiere zeigten eine Blaufärbung in der mittleren INL, welche mit einer zytoplasmatischen Färbung von Müllerzellen vereinbar ist. Von den gefärbten Zellen ausgehend waren radiäre Ausläufer zu der *Membrana limitans externa* und *interna* zu erkennen, welche *bona fide* den Fortsätzen der Müllerzellen entsprechen (Abb. 1B). In den Rosa26-LacZ-Tieren ohne Expression einer Cre-Rekombinase war kein Hinweis auf eine Aktivität von β -Galaktosidase zu erkennen (Abb. 1A).

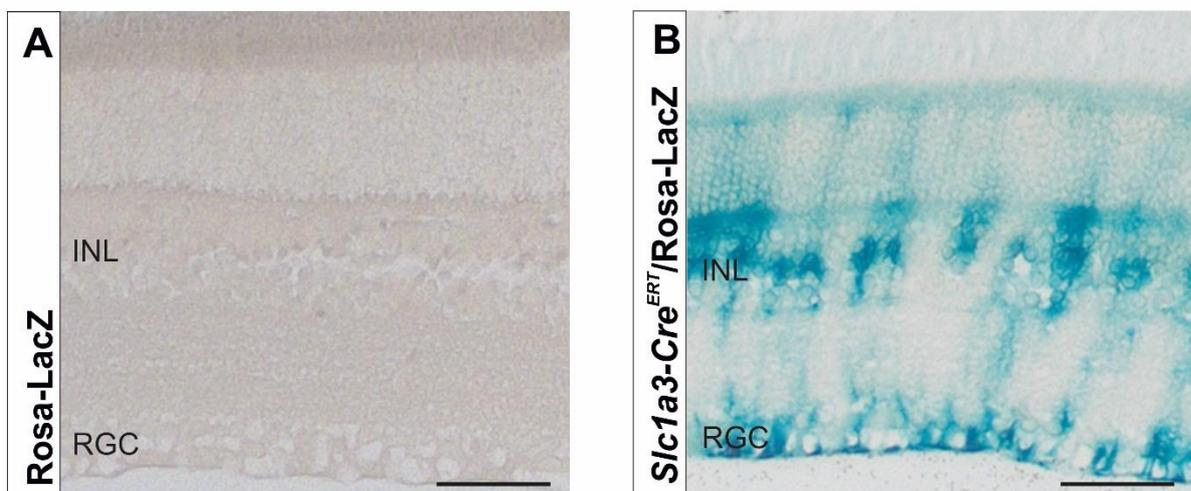


Abb. 1: Verifizierung der spezifischen Expression der Tx-abhängigen Cre-Rekombinase in Slc1a3-Cre^{ERT}/ROSA26-LacZ-Tieren

A, B: X-Gal Färbung meridionaler Paraffinschnitte von Augen 8 Wochen alter Rosa26-LacZ-Reporterermäusen mit oder ohne zusätzliche Expression einer Cre-Rekombinase in Müllerzellen (Slc1a3-Cre^{ERT}) nach Behandlung mit Tx (50 μ l Tx [20 mg/ml] i.p. zweimal täglich für 5 Tage). In den Retinae von Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ-Mäusen ist eine radiäre Blaufärbung zwischen der Membrana limitans externa und interna nachweisbar. Die Zellkerne der gefärbten Zellen befinden sich in der INL (**B**). In Mäusen ohne Expression einer Cre-Rekombinase zeigt sich keine Aktivität von β -Galaktosidase (**A**). Maßstabsbalken = 50 μ m. RGC: Retinale Ganglienzellen, INL: Innere Körnerschicht, ONL: Äußere Körnerschicht.

3.1.2. Verifizierung der konditionalen β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen

Um nachzuweisen, dass die Tx-Behandlung zu einer retinalen β -Catenin-Defizienz der $Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}$ -Mäuse führt, wurden die retinalen Proteine mittels Western Blot untersucht. In den retinalen Proteinextrakten von Tx-behandelten $Ctnnb1^{fl/fl}$ -Mäusen ließ sich ein starkes β -Catenin-Signal nachweisen, wohingegen sich bei den Tx-behandelten $Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}$ -Mäusen mit induzierter Cre-Aktivität nur ein schwaches Signal für β -Catenin zeigte (Abb. 2A). Die Quantifizierung mittels Densitometrie mehrerer Experimente belegte einen statistisch signifikanten Abfall der β -Catenin-Spiegel in $Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}$ -Mäuse von über 35% im Vergleich zu $Ctnnb1^{fl/fl}$ -Tieren ($p < 0,05$; Abb. 2B). Die Ergebnisse legen daher nahe, dass die Tx-Behandlung der $Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}$ -Mäuse zu einer wesentlichen Reduktion der retinalen β -Catenin-Expression führt.

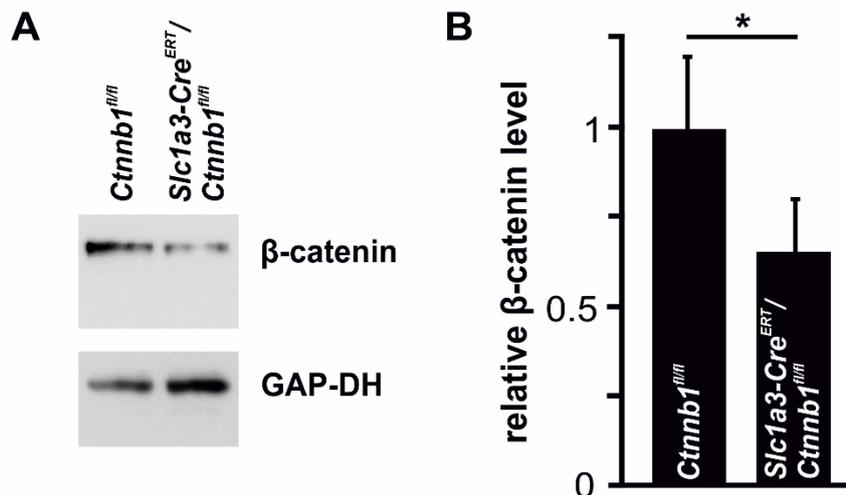


Abb. 2: Verifizierung der konditionalen β -Catenin-Defizienz auf Proteinebene

A, B: Repräsentative Western Blot Analyse (**A**) und Densitometrie (**B**) der β -Catenin-Spiegel in retinalem Gesamtprotein 8 Wochen alter $Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}$ -Mäusen und $Ctnnb1^{fl/fl}$ -Kontrollen 2 Wochen nach Tx Behandlung. Als Ladungskontrolle wurde der Blot mit anti-GAPDH Antikörpern hybridisiert (Mittelwert \pm SEM; $n = 8$; * $p < 0,05$).

3.1.3. Auswirkung der β -Catenin Defizienz auf Müllerzellen

Um auszuschließen, dass die induzierte β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen zu deren Untergang führt, wurden immunhistochemische Nachweise von Sox9, einem Gliamarker für Müllerzellen und Astrozyten (22), und real-time RT-PCRs für Sox9 mRNA durchgeführt. In meridionalen Paraffinschnitten der Retinae von 8 Wochen alten, Tx-behandelten $Ctnnb1^{fl/fl}$ -Mäusen und $Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}$ -Tieren ließ sich Sox9 überwiegend in den Zellkernen der INL und in geringerem Ausmaß in der RGC-

Schicht nachweisen (Abb. 3 B,C). Es zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl und Verteilung Sox9-positiver Zellkerne in der INL zwischen beiden Gruppen. Weiterhin ließ sich 2 Wochen nach der Tx-Behandlung eine vergleichbare Expression von Sox9 mRNA mittels real-time RT-PCR in den retinalen RNA-Extraktionen beider Genotypen nachweisen (Abb. 3A). Der Nachweis von Sox9 als Marker für Müllerzellen unabhängig vom β -Catenin-Genotyp bestätigt, dass der Tx-induzierte Verlust des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen nicht zum zeitnahen Untergang dieser Zellen führt.

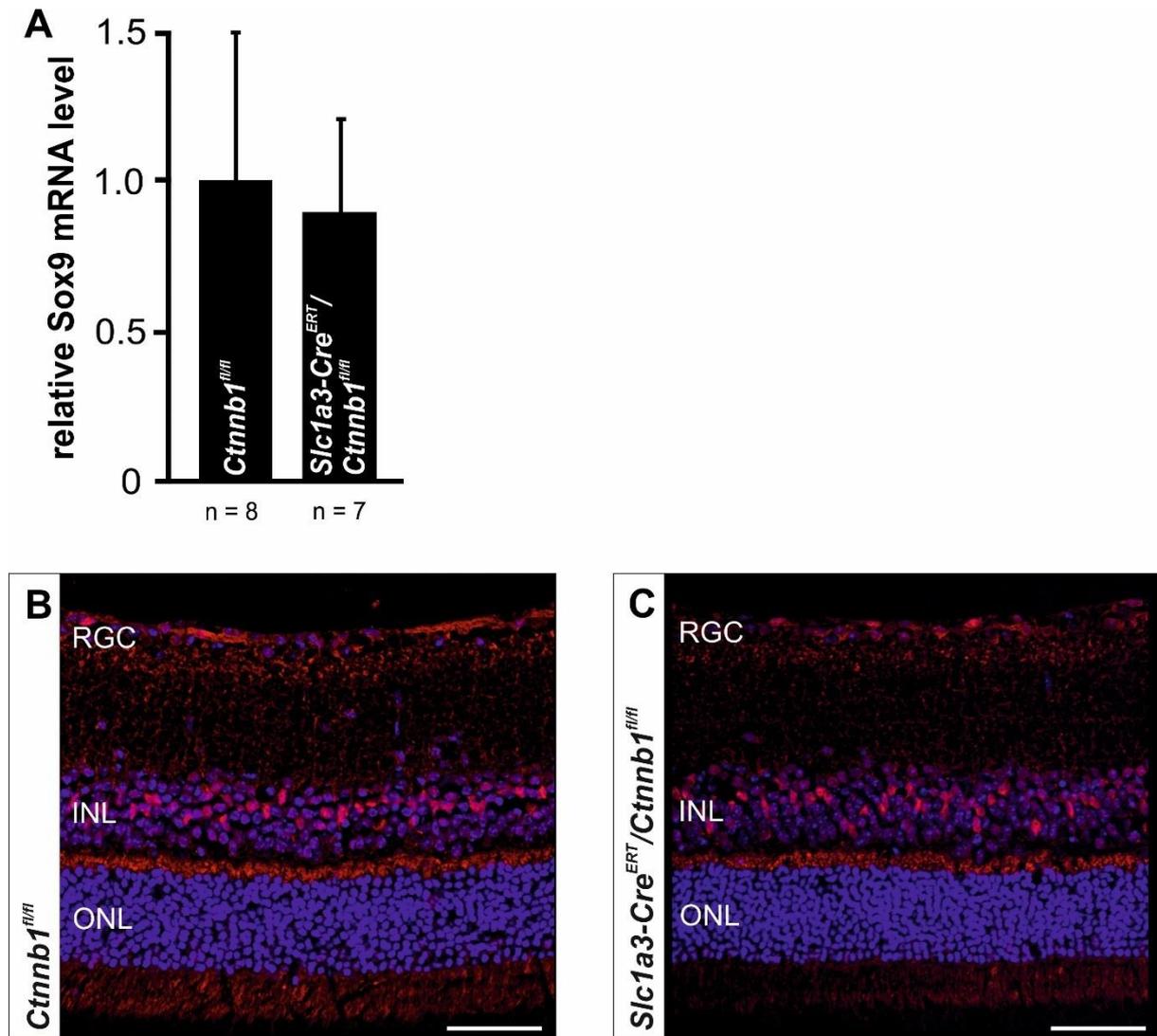


Abb. 3: Konditionale β -Catenin Defizienz in Müllerzellen führt nicht zum zeitnahen Untergang der Müllerzellen

A-C: Quantitative real-time RT-PCR für Sox9 (**A**) und immunohistochemische Sox9-Färbung (**B, C**) 8 Wochen alter *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäusen und *Ctnnb1^{fl/fl}*-Kontrollen 2 Wochen nach Tx Behandlung. Es zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl und Verteilung Sox9-positiver Zellkerne (rot) in der INL von *Ctnnb1^{fl/fl}*- (**B**) und *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäusen (**C**). Maßstabsbalken = 50 μ m. Blau: 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) Färbung; RGC: Retinale Ganglienzellen, INL: Innere Körnerschicht, ONL: Äußere Körnerschicht.

3.2. Einfluss der Wnt/ β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen auf den NMDA-vermittelten exzitotoxischen Schaden in RGC

3.2.1. Analyse der Sehnervenschädigung

Um die Arbeitshypothese zu untersuchen, dass der endogene Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen RGC vor NMDA-vermittelten exzitotoxischen Schaden schützt, wurden die Sehnerven von 10 Wochen alten Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen und Ctnnb1^{fl/fl}-Kontrollen 4 Wochen nach ihrer Tx-Behandlung und 2 Wochen nach der intravitrealen Injektion mit NMDA oder PBS als Mock-Behandlung analysiert. Nach Injektion von PBS zeigten sich in den Semidünnschnitten der Sehnerven beider Genotypen nur wenige dunkel gefärbte, degenerierende Myelinscheiden (Abb. 4 A-D), wohingegen nach NMDA-Injektion ein offensichtlicher Axonverlust mit zahlreichen dunkel gefärbten Myelinscheiden und ausgeprägten glialen Vernarbungen zu erkennen ist (Abb. 4 E-H). Der axonale Schaden war in den Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen deutlich ausgeprägter als in den Ctnnb1^{fl/fl}-Tieren (Abb. 4 E-H). Die Quantifizierung des Schadens der RGC durch Zählung ihrer Axone ergab bei beiden Genotypen einen deutlichen Untergang der Axone nach Injektion von NMDA auf $17029 \pm 870,00$ in Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen und $13677 \pm 775,00$ in Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen im Vergleich zu den PBS-injizierten Kontrollaugen ($32856 \pm 961,00$ in Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen; $32451 \pm 1646,0$ in Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen). Dieser Unterschied ist für beide Genotypen hochsignifikant ($p < 0,001$; Abb. 4I). Beim Vergleich der Axon-Zahl der NMDA-behandelten Augen zwischen Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen mit β -Catenin-Defizienz und Ctnnb1^{fl/fl}-Kontrolltieren zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) von beinahe 25% mehr Axonen in den Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen ohne β -Catenin-Defizienz. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl an Axonen in den Sehnerven der PBS-injizierten Augen beider Genotypen. Hier war die Anzahl der Axone nahezu identisch. Zusammenfassend zeigen die axonalen Analysen, dass das Fehlen des endogenen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen den Schaden durch NMDA-vermittelte Toxizität an RGC verstärkt.

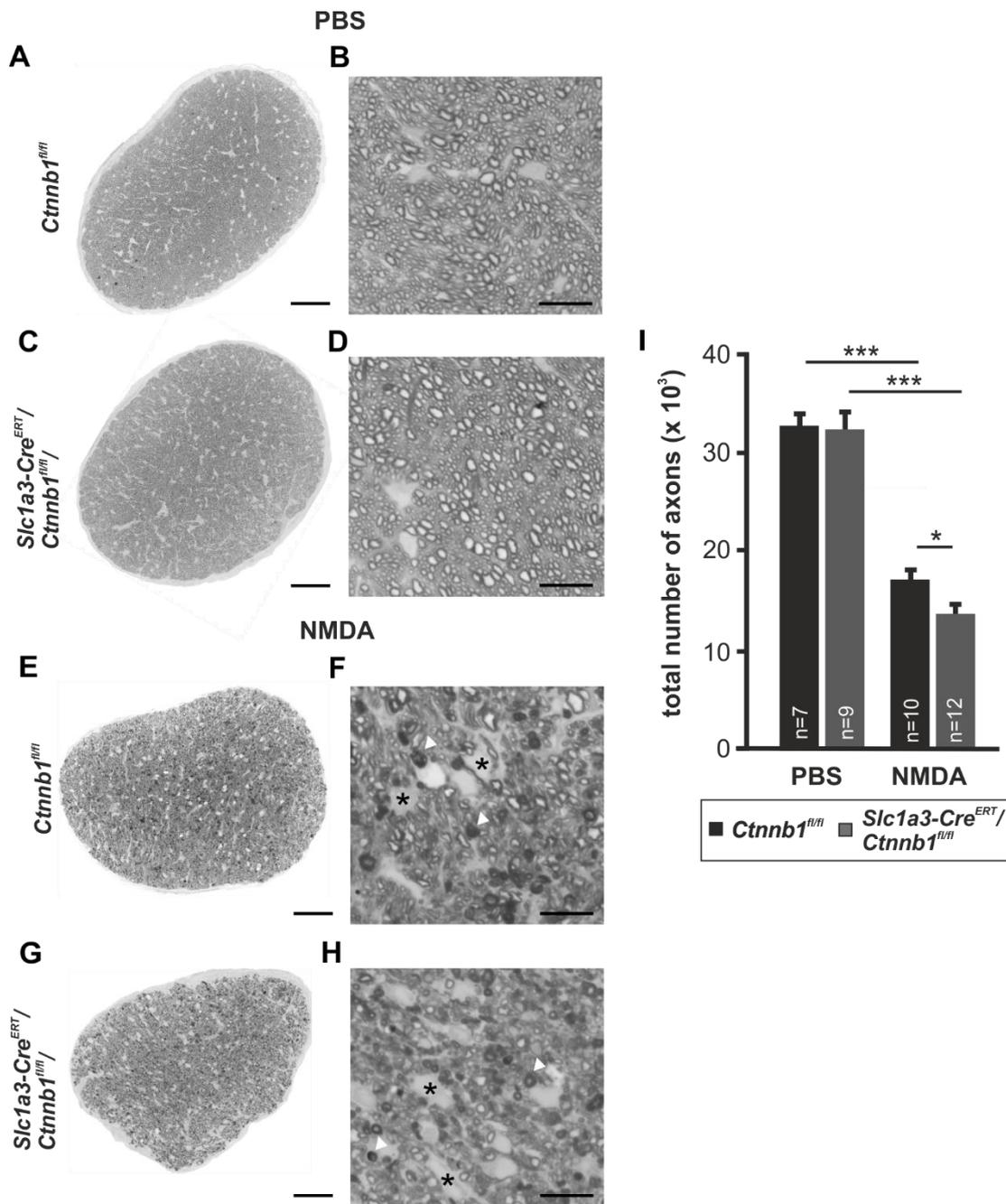


Abb. 4: Wnt/β-Catenin-Defizienz in Müllerzellen erhöht den Verlust an Axonen in Sehnerven nach akutem exzitotoxischem Schaden der RGC.

A-H: Repräsentative meridionale Semidünnschnitte von Sehnerven 10 Wochen alter Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}- und Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen 2 Wochen nach Injektion von 3 µl NMDA [10 mM] oder PBS und Behandlung mit Tx im Alter von 6 Wochen (50 µl Tx [20 mg/ml] i.p. zweimal täglich für 5 Tage). Die Sehnerven der NMDA-injizierten Augen weisen einen deutlichen Verlust an Axonen, weite gliale Vernarbungen (Stern) und dunkel gefärbte Myelinscheiden (Pfeilkopf) auf (**E-H**). In den mit PBS behandelten Augen fanden sich nur vereinzelte degenerierende Myelinscheiden (**A-D**). In Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen war der axonale Schaden nach NMDA Injektion im Vergleich zu den Ctnnb1^{fl/fl}-Kontrollen ausgeprägter (**E-H**). Maßstabsbalken: A, C, E, G = 50 µm; B, D, F, H = 10 µm. **I:** Quantifikation der Gesamtzahl der Axone in den Sehnerven der Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}- und Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse (Mittelwerte ± SEM, *p<0,05; ***p<0,001).

3.2.2. Morphologische Untersuchung der Retina

Zur genaueren Beschreibung des NMDA-vermittelten exzitotoxischen Schadens an retinalen Neuronen von Mäusen mit einer β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen wurde die Morphologie der Retinae der $Slc1a3\text{-Cre}^{\text{ERT}}/\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$ - und $\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$ -Mäusen untersucht. Hierzu wurden meridionale Semidünnschnitte der Augen beider Genotypen 2 Wochen nach NMDA- oder PBS-Injektion und 4 Wochen nach Tx-Behandlung analysiert. Die Distanz zwischen der *Ora serrata* und dem ONH wurde in Zehntel geteilt und die Dicke der Gesamtretina, IPL, INL, OPL und ONL zwischen den Zehnteln gemessen. Nach Injektion von PBS war die Dicke der Gesamtretina, INL und OPL der $Slc1a3\text{-Cre}^{\text{ERT}}/\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$ -Mäuse im Vergleich zu den $\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$ -Kontrollen um etwa 6%, 10% und 15% reduziert. Dies lässt vermuten, dass das Fehlen des endogenen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zu einem geringen neuronalen Untergang in der zentralen Retina führt (Abb. 5, Abb. 6 A, C, D). Weiterhin erwies sich die Dicke der zentralen ONL und OPL nach Behandlung von NMDA in beiden Genotypen statistisch signifikant höher als in den PBS-behandelten Kontrollaugen (Abb. 6 D, E). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass der NMDA-vermittelte Schaden in der inneren Retina protektive Mechanismen aktiviert, die auch in der äußeren Retina einen schützenden Effekt vermitteln (vgl. Diskussion). Jedoch führte die Behandlung mit NMDA bei beiden Genotypen zu einer deutlichen und statistisch signifikanten Reduktion der Dicke der Gesamtretina (bis zu 15%), der IPL (bis zu 50%) und der INL (bis zu 30%) im Vergleich zu den PBS-injizierten Augen (Abb. 5, Abb. 6 A-C). Die Dicke der IPL und der Gesamtretina zeigte sich im Vergleich von $Slc1a3\text{-Cre}^{\text{ERT}}/\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$ -Mäusen mit $\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$ -Kontrollen nach NMDA-Injektion zwar nur leicht, aber doch stellenweise statistisch signifikant vermindert (Abb. 5, Abb. 6 A, B). Der Unterschied zwischen beiden Genotypen nach NMDA-Injektion war in der INL am ausgeprägtesten. Die $Slc1a3\text{-Cre}^{\text{ERT}}/\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$ -Mäuse zeigten in dieser retinalen Schicht eine uniforme und statistisch signifikante Reduktion der Dicke um 12% im Vergleich zur $\text{Ctnnb1}^{\text{fl/fl}}$ -Gruppe (Abb. 5, Abb. 6 C). Auch die morphologischen Daten unterstützen somit die Hypothese, dass der endogene Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen einen Effekt vermittelt, der retinale Neurone vor akutem exzitotoxischem Schaden schützt.

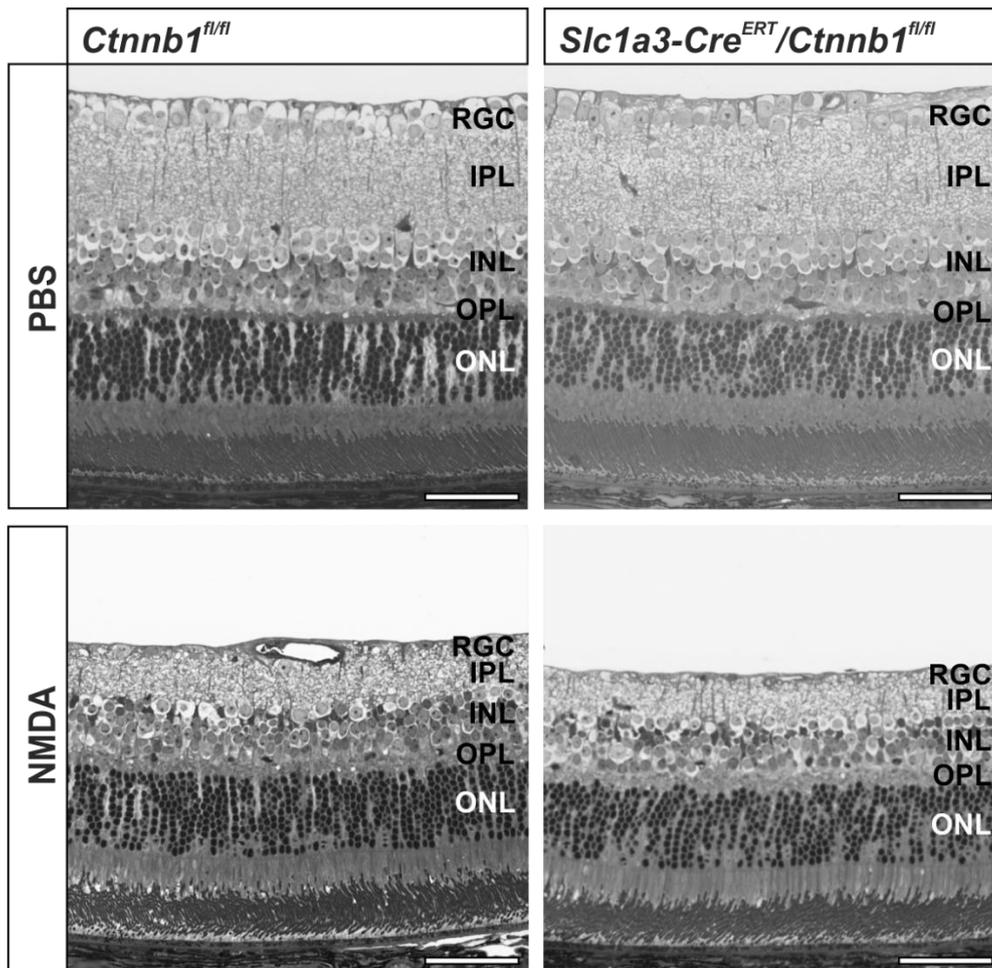


Abb.: 5: Morphologische Analyse adulter Retinae von $Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}$ und $Ctnnb1^{fl/fl}$ Mäusen

Repräsentative meridionale Semidünnschnitte von Retinae 10 Wochen alter $Ctnnb1^{fl/fl}$ - und $Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}$ -Mäuse 2 Wochen nach intravitrealer Injektion von 3 μ l [10 mM] NMDA oder 3 μ l PBS und Tx-Behandlung im Alter von 6 Wochen (50 μ l Tx [20 mg/ml] i.p. zweimal täglich für 5 Tage). RGC: Retinale Ganglienzellen, IPL: Innere plexiforme Schicht, INL: Innere Körnerschicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, ONL: Äußere Körnerschicht. Maßstabsbalken = 50 μ m.

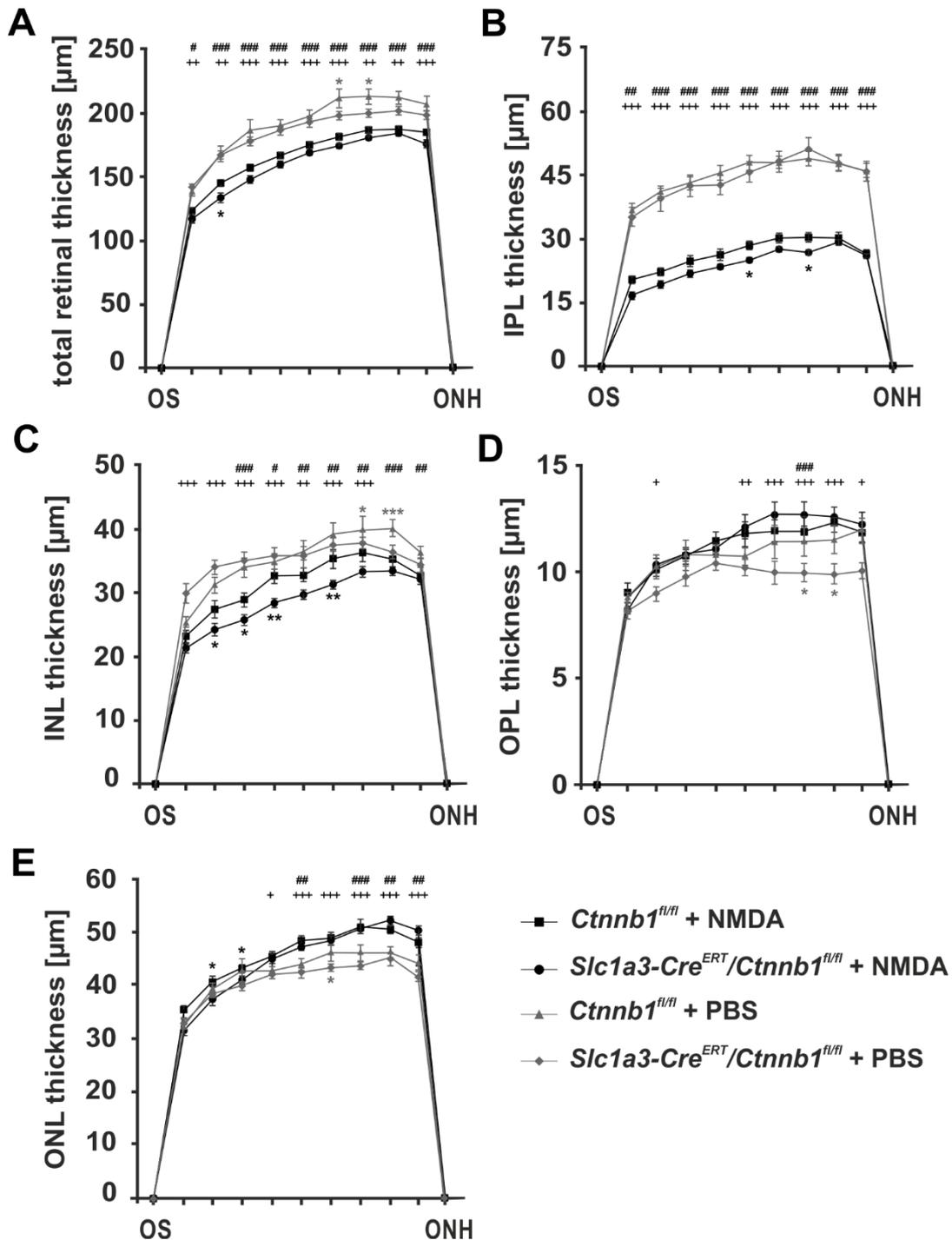


Abb. 6: β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen verstärkt die Degeneration der inneren Retina nach akutem Schaden an retinalen Neuronen

A–E: Zur quantitativen Analyse wurden die Dicke der Gesamtretina (A), IPL (B), INL (C), OPL (D) und ONL (E) 10 Wochen alter *Ctnnb1^{fl/fl}*- und *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse 2 Wochen nach intravitrealer Injektion von NMDA oder PBS und Tx-Behandlung im Alter von 6 Wochen zwischen jedem Zehntel zwischen *Ora serrata* und ONH gemessen und als Spider-Diagramm dargestellt. OS: *Ora serrata*, ONH: Sehnervenkopf, IPL: Innere plexiforme Schicht, INL: Innere Körnerschicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, ONL: Äußere Körnerschicht; Mittelwert \pm SEM; $n \geq 8$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; * markiert ein statistisch signifikantes Ergebnis zwischen zwei Genotypen mit der gleichen Behandlung, # (*Ctnnb1^{fl/fl}*) und + (*Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*) markiert statistisch signifikante Unterschiede zwischen NMDA- und PBS-injizierten Augen.

3.2.3. Untersuchung der NMDA-induzierten Apoptose

Der Tod von RGC nach NMDA-Behandlung wird durch Apoptose bedingt (23). Um das Ausmaß der NMDA-vermittelten Apoptose in Abhängigkeit von der β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen zu untersuchen, wurde ein TUNEL Assay mit meridionalen Paraffinschnitten von Retinae 8 Wochen alter Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}- und Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse 24h nach intravitrealer Injektion von NMDA oder PBS und 2 Wochen nach Tx-Behandlung durchgeführt. In PBS-injizierten Augen beider Genotypen wurden nur vereinzelte TUNEL-positive Zellen in der ONL beobachtet (Abb. 7A). Im Gegensatz dazu zeigten sich in den mit NMDA behandelten Augen der Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse und in geringerem Ausmaß auch der Ctnnb1^{fl/fl}-Kontrollen zahlreiche apoptotische Zellen in der RGC-Schicht und in dem inneren Teil der INL (Abb. 7A). Die Quantifizierung der apoptotischen Zellen in der RGC-Schicht nach NMDA-Injektion ergab für die Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse eine um etwa 40% und somit statistisch signifikant ($p = 0,023$) höhere Anzahl TUNEL-positiver Zellen ($56,0 \pm 4,60$ pro 1000 μm , Mittelwert \pm SEM) als in den Ctnnb1^{fl/fl}-Tieren ($39,8 \pm 4,70$ pro 1000 μm , Mittelwert \pm SEM). Allerdings konnte in der INL kein Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen beider Genotypen nach NMDA Injektion nachgewiesen werden.

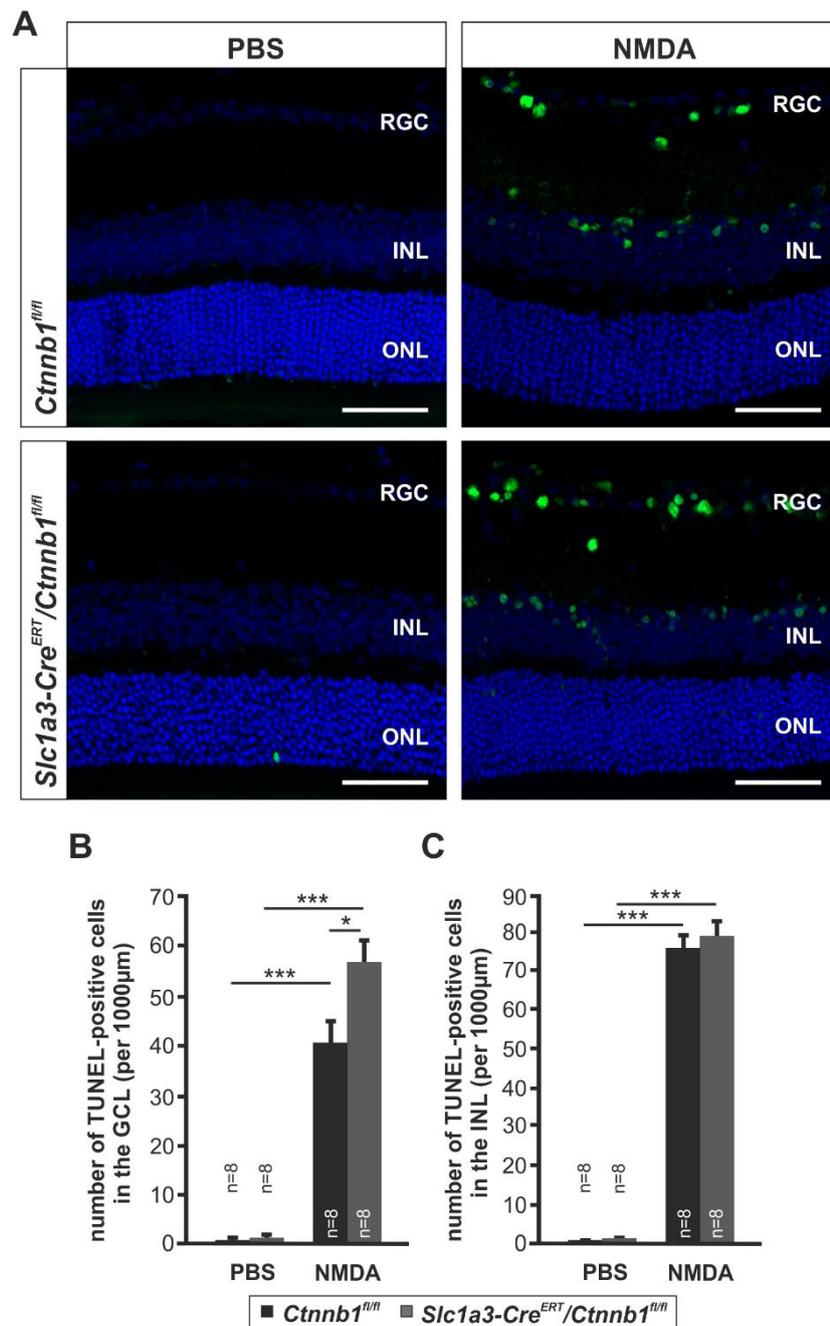


Abb. 7: Wnt/β-Catenin-Defizienz in Müllerzellen steigert die Apoptose von retinalen Neuronen

A: Repräsentative TUNEL-Färbung meridionaler Paraffinschnitte von Retinae 8 Wochen alter *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*- und *Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse 24h nach Injektion von 3 μl NMDA [10 mM] oder PBS und Behandlung mit Tx im Alter von 6 Wochen (50 μl Tx [20 mg/ml] i.p. zweimal täglich für 5 Tage). Maßstabsbalken = 50 μm. Grün: TUNEL-positive Zellen, blau: 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) Färbung, RGC: Retinale Ganglienzellen, INL: Innere Körnerschicht. ONL: Äußere Körnerschicht. **B, C:** Quantifizierung der Zellzahl TUNEL-positiver Zellen in der RGC-Schicht (**B**) und in der INL (**C**) bezogen auf die Länge der Retina. Retinae der *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse zeigten nach NMDA-Injektion eine statistisch signifikant höhere Anzahl TUNEL-positiver Zellen in der RGC-Schicht als in *Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäusen. In der INL zeigte sich nach NMDA-Injektion kein Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen beiden Genotypen. (Mittelwert ± SEM; *p<0,05; ***p<0,001)

3.3. Akuter retinaler Ganglienzell-Schaden induziert den Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen

Um zu überprüfen, ob ein exzitotoxischer Schaden von retinalen Neuronen zur Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen führt, wurden Western Blot Analysen von retinalen Proteine 8 Wochen alter Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse 24 h nach intravitrealer Injektion von NMDA oder PBS und entsprechend behandelte Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse, welche als Kontrolle für die β -Catenin-Expression dienten, durchgeführt. Sowohl in Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}- als auch in Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen ließ sich nach PBS Injektion ein moderates, spezifisches Signal für β -Catenin in den retinalen Proteinen nachweisen (Abb. 8A). Die Injektion von NMDA führte in den Ctnnb1^{fl/fl}-Kontrolltieren hingegen zu einem deutlichen Anstieg der retinalen β -Catenin-Spiegel im Vergleich zu den PBS-behandelten Augen (Abb. 8A). Im Gegensatz dazu ließ sich in den Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäusen kein Unterschied zwischen den retinalen β -Catenin-Spiegeln NMDA- und PBS-behandelter Augen erkennen (Abb. 8A). Die Quantifizierung mittels Densitometrie ergab einen statistisch signifikanten Anstieg von mehr als 85% der β -Catenin-Spiegel in den Retinae der Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse nach Behandlung mit NMDA im Vergleich zu den PBS-injizierten Augen ($1,87 \pm 0,31$; $p < 0,05$; Abb. 8B). In den Retinae der Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}-Mäuse ließ sich mittels Densitometrie kein statistisch signifikanter Unterschied der β -Catenin-Spiegel von PBS- ($1,24 \pm 0,21$) und NMDA- ($1,08 \pm 0,19$; Abb. 8B) injizierten Augen nachweisen. Die Western Blot Analysen legen nahe, dass der exzitotoxische Schaden an retinalen Neuronen zu einer deutlichen Induktion der β -Catenin-Expression in Müllerzellen führt.

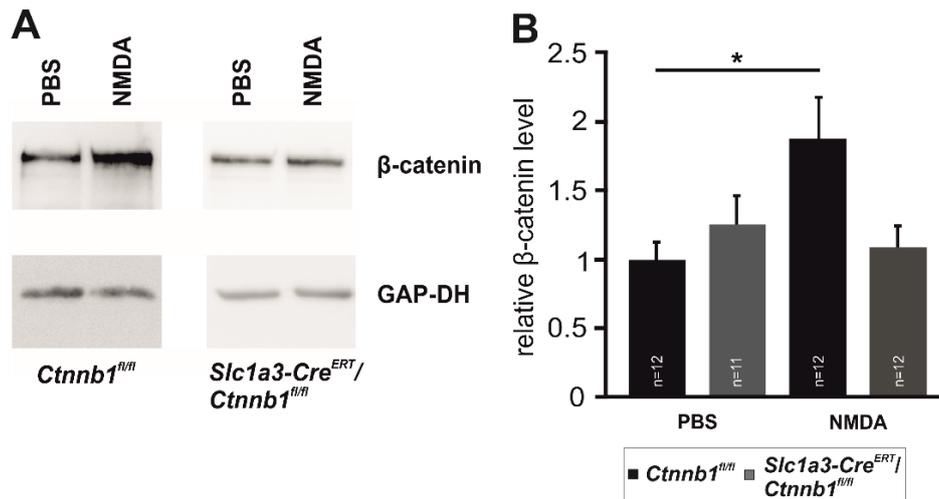


Abb. 8: Akuter Schaden an retinalen Neuronen verstärkt die β -Catenin-Expression in Müllerzellen

A, B: Repräsentative Western Blot Analyse (**A**) und Densitometrie (**B**) der β -Catenin-Spiegel in retinalem Gesamtprotein 8 Wochen alter *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*- und *Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse 24 h nach intravitrealer Injektion von 3 μ l [10 mM] NMDA oder 3 μ l PBS und Tx-Behandlung (50 μ l Tx [20 mg/ml] i.p. zweimal täglich für 5 Tage) im Alter von 6 Wochen. Als Ladungskontrolle wurde der Blot mit anti-GAPDH Antikörpern hybridisiert (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$).

3.4. Untersuchung der Gliosereaktion

Gfap wird in aktivierten Müllerzellen vermehrt exprimiert und dient daher als Marker für die Gliosereaktion von Müllerzellen (24). Um zu überprüfen, ob die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen zur Gliose von Müllerzellen führt, wurden quantitative real-time RT-PCR für das *glial fibrillary acidic protein* (Gfap) in der retinalen RNA 8 Wochen alter *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*- und *Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse 7 h nach intravitrealer Injektion von NMDA oder PBS und 2 Wochen nach Tx-Behandlung durchgeführt. Nach NMDA Injektion kam es in den *Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäusen zu einem moderaten, aber statistisch signifikantem Anstieg ($1,7 \pm 0,3$; $p < 0,05$) der Gfap-mRNA-Spiegel im Vergleich zu den PBS-behandelten Augen (Abb. 9). Die Gfap-Spiegel waren in PBS-injizierten Augen der *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse im Vergleich zu den PBS behandelten Augen der *Ctnnb1^{fl/fl}*-Kontrollen signifikant erhöht ($2,5 \pm 0,6$; $p < 0,05$). Nach Behandlung mit NMDA kam es in den *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*-Tieren zu keinem weiteren Anstieg der Gfap-Spiegel. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass der endogene Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen für die Gliosereaktion nach akutem exzitotoxischem Schaden retinaler Neurone benötigt wird (vgl. Diskussion).

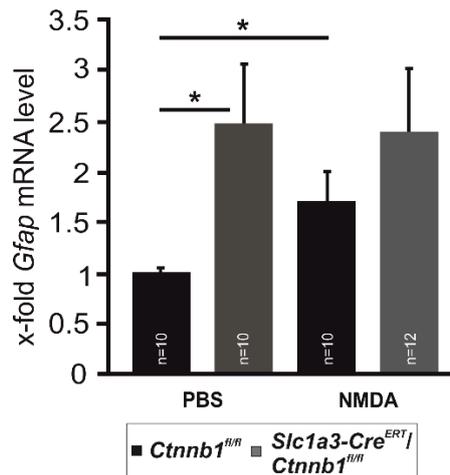


Abb. 9: Akuter Schaden an retinalen Neuronen verstärkt die Gliose-Reaktion über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen

Quantitative real-time RT-PCR für Gfap in der retinalen RNA 8 Wochen alter *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*- und *Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse 7 h nach intravitrealer Injektion von 3 μ l [10 mM] NMDA oder 3 μ l PBS und Tx-Behandlung (50 μ l Tx [20 mg/ml] i.p. zweimal täglich für 5 Tage) im Alter von 6 Wochen (Mittelwert \pm SEM; * p <0,05).

3.5. Expressionsanalysen protektiver Faktoren

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die intravitreale Injektion von NMDA zur vermehrten retinalen Expression neuroprotektiver Faktoren wie Lif führt (10,12). Um zu klären, ob diese Induktion protektiver Faktoren über die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen vermittelt wird, wurden quantitative real-time RT-PCR-Analysen mit retinaler RNA 8 Wochen alter *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*- und *Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse 7 h nach intravitrealer Injektion von NMDA oder PBS und 2 Wochen nach Tx-Behandlung durchgeführt. Nach der intravitrealen Injektion von NMDA in *Ctnnb1^{fl/fl}*-Tiere wurde eine statistisch signifikant erhöhte Expression der mRNA von Lif ($37,45 \pm 6,430$; p <0,001), Fgf2 ($2,22 \pm 0,290$; p <0,05) und Edn2 ($1,59 \pm 0,18$; p <0,05) im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren nachgewiesen (Abb. 7). Die Stärke der mRNA-Induktion war jedoch nicht gleichmäßig (Abb. 7). Die mRNA-Level für Lif in *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäusen nach NMDA-Injektion ($16,94 \pm 3,720$) waren im Vergleich zu den *Ctnnb1^{fl/fl}*-Kontrollen signifikant niedriger (p <0,05; Abb. 7). Die mRNA-Level von Fgf2 ($1,61 \pm 0,16$) und Edn2 ($1,39 \pm 0,18$) in *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäusen nach NMDA-Injektion tendierten zu niedrigeren Werten als in *Ctnnb1^{fl/fl}*-Tieren, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Abb. 7). Insgesamt weisen die mRNA Analysen stark darauf hin, dass ein exzitotoxischer Schaden an retinalen Neuronen zur Aktivierung von Müllerzellen führt

und dies in Abhängigkeit vom Wnt/ β -Catenin-Signalweg wiederum die Expression neuroprotektiver Faktoren wie Lif induziert. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten vorangegangener Studien unserer Arbeitsgruppe (10,12).

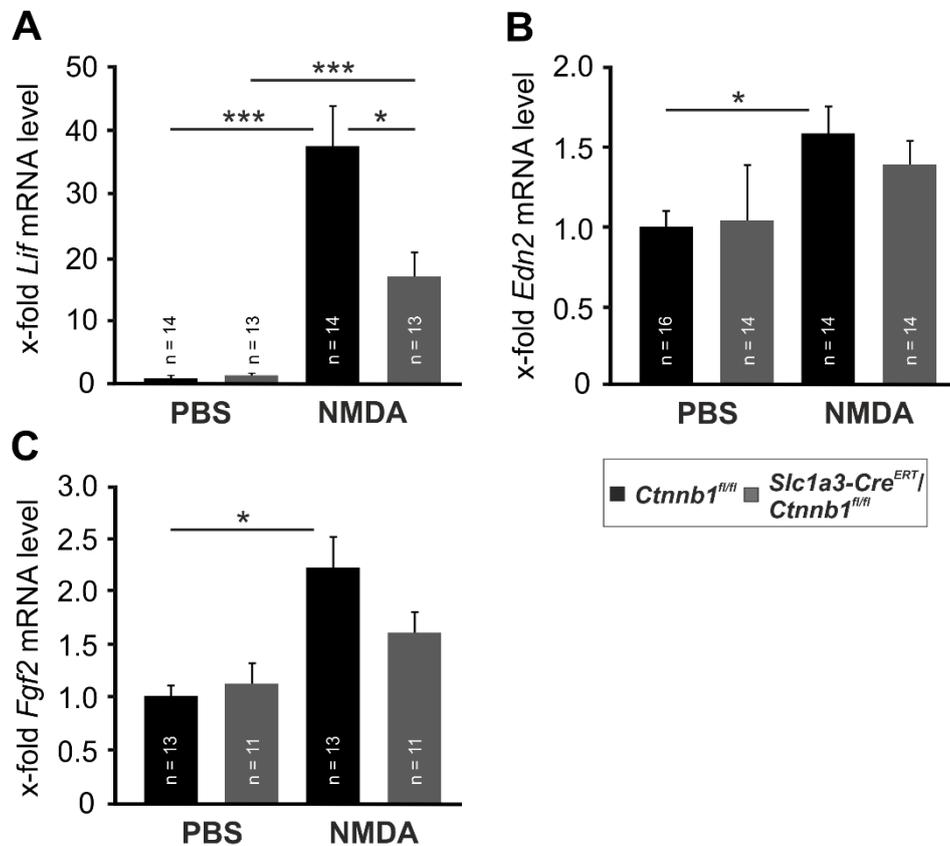


Abb. 10: Akuter Schaden an retinalen Neuronen induziert über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen die Expression von Lif

Quantitative real-time RT-PCR für Lif (**A**), Edn2 (**B**) und Fgf2 (**C**) in der retinalen RNA 8 Wochen alter *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*- und *Ctnnb1^{fl/fl}*-Mäuse 7 h nach intravitrealer Injektion von 3 μ l [10 mM] NMDA oder 3 μ l PBS und Tx-Behandlung (50 μ l Tx [20 mg/ml] i.p. zweimal täglich für 5 Tage) im Alter von 6 Wochen (Mittelwert \pm SEM; * p <0,05, *** p <0,001).

4. Diskussion

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass der endogene Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen die Fähigkeit besitzt, RGC vor exzitotoxischem Schaden zu schützen und dass dieser Effekt über die vermehrte Expression neuroprotektiver Faktoren vermittelt wird. Diese Folgerung liegt begründet in der Beobachtung, dass 1.) ein akuter exzitotoxischer Schaden den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert, 2.) Mäuse mit einer β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen nach akutem exzitotoxischem Schaden weniger Axone in den Sehnerven und mehr TUNEL-positive Zellen in der RGC-Schicht aufweisen als Kontrolltiere und 3.) die Expression neuroprotektiver Faktoren nach

akutem exzitotoxischem Schaden in Mäusen mit einer β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen deutlich verringert ist.

Die Rolle des endogenen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wurde in einem Mausmodell untersucht, welches eine Tx-abhängigen Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Slc1a3-Promotors exprimiert. Das Slc1a3-Gen kodiert für den hochaffinen Glutamat/Aspartat-Transporter GLAST. Durch immunhistochemische Methoden wurde nachgewiesen, dass dieser Transporter in der Retina in Müllerzellen und Astrozyten lokalisiert ist (25–27). Korrespondierend zu diesen Studien zeigten die Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ-Reportermausen radial angeordnete spezifische Blaufärbungen, welche von der *Membrana limitans interna* bis zur *Membrana limitans externa* der Retina reichen, sowie trianguläre Vorwölbungen in die Nervenfaserschicht, welche den Endfüßen der Müllerzellen entsprechen. In der RGC-Schicht, in der retinale Astrozyten lokalisiert sind, konnte jedoch keine spezifische Färbung für β -Galaktosidase nachgewiesen werden. Obgleich die Aktivierung der Cre-Rekombinase in vereinzelt Astrozyten nicht ausgeschlossen werden kann, belegen mehrere Studien klar die Expression der Cre-Rekombinase in Müllerzellen von Slc1a3-Cre^{ERT}-Mäusen (28–30). Die beobachtete Diskrepanz zwischen der endogenen und transgenen Aktivität des Slc1a3-Promotors könnte dadurch bedingt sein, dass in den Slc1a3-Cre^{ERT}-Mäusen ein Fragment des Slc1a3-Promotors aus einem *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) Klon verwendet wurde (31).

Die Western Blot Analysen der β -Catenin-Expression nach Aktivierung der Cre-Rekombinase in Müllerzellen zeigten eine signifikante Reduktion der β -Catenin-Spiegel in der gesamten Retina von über 35%. Die nur partielle Reduktion der β -Catenin Menge durch die Cre-abhängige Inaktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in den Müllerzellen lässt sich zum einen dadurch erklären, dass der Proteinextrakt nicht selektiv von den Müllerzellen gewonnen werden kann, sondern ein Gesamtextrakt der Retina darstellt und β -Catenin auch von anderen Zelltypen der Retina exprimiert wird (32). Außerdem haben frühere Studien gezeigt, dass die Behandlung mit Tx nur in etwa 80% der Müllerzellen zur Rekombination und somit zur β -Catenin-Defizienz führt (28).

Der protektive Effekt des endogenen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in Müllerzellen wurde im Anschluss an akuten NMDA-vermittelten exzitotoxischen Schaden retinaler Neuronen untersucht. Nachdem NMDA an Glutamat-Rezeptoren vom NMDA-Typ bindet, kommt es über einen exzessiven Einstrom von Kalziumionen zur Aktivierung

der Apoptose (18). In der Retina werden Glutamat-Rezeptoren vom NMDA-Typ in RGC und amakrinen Zellen exprimiert, wodurch diese Zellen anfällig für exzitotoxischen Schaden sind (33). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der TUNEL-Analysen, welche apoptotische Zellen in der RGC-Schicht und der INL, in der amakrine Zellen überwiegend lokalisiert sind, detektierten.

Obwohl kein offensichtlicher Phänotyp oder ein Verlust an Müllerzellen in Mäusen mit einer Störung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in diesen Zellen nach Tx-Behandlung und intravitrealer Injektion von PBS nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in diesen Tieren in der zentralen Retina eine moderate, aber statistisch signifikante Reduktion der Dicke der Gesamtretina, der INL und der ONL im Vergleich zu den Kontrolltieren. Studien, welche die Degeneration der Retina durch Licht untersuchen, berichten von einem verstärkten Schaden der zentralen Retina-Abschnitte und erklären dies durch eine stärkere Fokussierung des Lichtes auf diesen Bereich des Auges durch die Linse (34–36). Der NMDA-vermittelte Schaden der Retina zeigte sich entweder gleichmäßig verteilt oder peripher betont, die verminderte Dicke in den Tieren mit einer β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen jedoch nur in den zentralen Retina-Abschnitten, sodass zu klären bleibt, ob der endogene Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen retinale Neurone vor Schaden durch das Umgebungslicht im Tierstall schützt. Weiterhin wies die ONL in den zentralen Retina-Abschnitten beider Genotypen nach Injektion von NMDA eine höhere Dicke auf als nach Injektion von PBS. Da die Expression protektiver Faktoren nach akutem Schaden durch NMDA erhöht ist, könnten diese Faktoren möglicherweise auch die Photorezeptoren der ONL vor Licht-vermitteltem Schaden schützen.

Für mehrere neurodegenerative Erkrankungen, unter anderem für die Alzheimer-Demenz und das idiopathische Parkinson-Syndrom, wurde eine Assoziation des Fortschreitens der Erkrankungen mit einer verminderten Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs belegt (37,38). Eine erhöhte Expression an Inhibitoren des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wurde in den Augen von Patienten mit Glaukom, *Retinopathia pigmentosa*, altersbedingter Makuladegeneration und diabetischer Makulopathie beobachtet, sodass diskutiert wird, ob eine Störung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs an der Degeneration der Retina beteiligt ist (39–43). In Übereinstimmung mit früheren Studien, welche belegen, dass eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs protektive Effekte auf retinale Neurone vermittelt, zeigen die durchgeführten Experimente, dass Mäuse mit einer β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen nach akutem

exzitotoxischem Schaden weniger Axone der RGC in den Sehnerven und mehr apoptotische Zellen in der RGC-Schicht aufweisen als ihre Kontrollen. Lichtmikroskopisch wurden in den Sehnerven beider Genotypen nach Injektion von PBS annähernd 32500 Axone ausgezählt, was eine deutlich geringere Anzahl ist als frühere elektronenmikroskopische Untersuchungen in verschiedenen Mauslinien (44). Diese Diskrepanz kann zum einen dadurch erklärt werden, dass Mäuse mit dem genetischen C57BL/6J Hintergrund verwendet wurden, die eine geringere Anzahl an RGC besitzen als andere Mauslinien, zum anderen durch die Verwendung eines Lichtmikroskops zur Auszählung, welches eine geringere Auflösung besitzt als ein Elektronenmikroskop.

In der INL, in der sich die amakrinen Zellen vorwiegend befinden, konnte kein Effekt des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf den NMDA-vermittelten Schaden nachgewiesen werden. Da für amakrine Zellen eine deutlich höhere Anfälligkeit für NMDA-vermittelten Schaden berichtet wurde als für RGC (45,46), kann vermutet werden, dass die in den durchgeführten Experimenten injizierte Dosis an NMDA zu hoch war und den potenziellen neuroprotektiven Effekt des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auf amakrine Zellen übersteigt.

Im Gegensatz dazu wurde 2 Wochen nach NMDA-Injektion lichtmikroskopisch eine moderate Reduktion der Dicke der IPL und INL in Tieren mit einer β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet. Es wurde bereits belegt, dass es 2 Wochen nach intravitrealer Injektion von NMDA nicht nur zu einem ausgeprägten Verlust an RGC und amakrinen Zellen kommt, sondern auch zu einem moderaten Untergang bipolarer Zellen (47). Eine akute Degeneration von RGC und amakrinen Zellen könnte somit zu einem sekundären Verlust an bipolaren Zellen führen. Da die Anzahl überlebender RGC in den Retinae mit intaktem Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen erhöht ist, besteht die Möglichkeit, dass dies auch einen schützenden Effekt auf retinale Neurone in der INL vermittelt.

Müllerzellen bilden in der Retina einen der wichtigsten Mediatoren potenzieller neuroprotektiver Effekte. Die wichtige Rolle von Müllerzellen in der Aufrechterhaltung der retinalen Homöostase wurde durch ein transgenes Mausmodell mit induzierbarer Ablation von Müllerzellen aufgezeigt. Nach der selektiven Ablation von Müllerzellen wurde eine Degeneration der Photorezeptoren und eine Aktivierung des retinalen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beobachtet (22,48). Passend zu diesen Beobachtungen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Verlust von β -Catenin in den Müllerzellen zu

einer verstärkten Expression von Gfap führt. Es ist davon auszugehen, dass der endogene Wnt/ β -Catenin-Signalweg in diesen Zellen für die normale Funktion der Retina erforderlich ist. Weiterhin zeigen die durchgeführten Experimente, dass es in den Retinae der Tiere mit einer gezielten Störung des endogenen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs nach Injektion von NMDA zu keiner gesteigerten Expression der mRNA von Gfap im Vergleich zu den Kontrolltieren kommt.

Der Einfluss des endogenen Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen auf geschädigte retinale Neurone, wurde bisher nicht erläutert. Schaden an RGC führt zur reaktiven Gliose der Müllerzellen. Dies ermöglicht es den Müllerzellen in Abhängigkeit der Art und Dauer des Schadens an den RGC einen protektiven oder aber schädlichen Effekt zu vermitteln. So wurde zum einen beschrieben, dass es im Anschluss an NMDA-vermittelten exzitotoxischen Schaden in RGC zu einer erhöhten NF κ B- (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) vermittelten Expression des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) kommt, welche durch den gesteigerten Einbau Ca²⁺-permeabler AMPA-Rezeptoren eine vermehrte Anfälligkeit der RGC für exzitotoxischen Schaden bedingt (49,50). Zum anderen wurde nach akutem Schaden an retinalen Neuronen in reaktiven Müllerzellen auch eine vermehrte Expression protektiver Faktoren wie Lif, Cntf und Edn2 belegt (10,51,52). Dies steht im Einklang mit den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, welche eine reduzierte Expression von Lif in Mäusen mit einem gestörten Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen aufzeigen. Weiterhin konnten Studien demonstrieren, dass es im Anschluss an retinalen Schaden durch Laser zu einer Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs kommt und dass die gesteigerte retinale Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit einer verstärkten Gliose-Reaktion der Müllerzellen assoziiert ist (10,53). Diese These steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Studie, die eine blockierte Induktion der Gfap mRNA nach der Behandlung von Mäusen mit einer β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen mit NMDA belegen.

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die durch akuten Schaden bedingte Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in der Retina vorwiegend in den Müllerzellen stattfindet und diese Aktivierung wiederum zu einer verstärkten Expression neuroprotektiver Faktoren führt. Weiterhin lässt sich

anhand der gewonnenen Daten der Schluss ziehen, dass der endogene Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen Teil eines retinalen neuroprotektiven Netzwerks ist, welches das Überleben der RGC nach akutem Schaden begünstigt und dass dieser Effekt die verstärkte Expression protektiver Faktoren beinhaltet.

6. Anhang

6.1. Literaturverzeichnis

References

1. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009;17(1):9–26. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016
2. Ye X, Smallwood P, Nathans J. Expression of the Norrie disease gene (Ndp) in developing and adult mouse eye, ear, and brain. *Gene Expr Patterns*. 2011;11(1-2):151–5. doi:10.1016/j.gep.2010.10.007
3. Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, Kelley MW, Jiang L, Tasman W, Zhang K, Nathans J. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*. 2004;116(6):883–95.
4. Ke J, Harikumar KG, Erice C, Chen C, Gu X, Wang L, Parker N, Cheng Z, Xu W, Williams BO, Melcher K, Miller LJ, Xu HE. Structure and function of Norrin in assembly and activation of a Frizzled 4-Lrp5/6 complex. *Genes Dev*. 2013;27(21):2305–19. doi:10.1101/gad.228544.113
5. Deng C, Reddy P, Cheng Y, Luo C-W, Hsiao C-L, Hsueh AJW. Multi-functional norrin is a ligand for the LGR4 receptor. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 9):2060–8. doi:10.1242/jcs.123471
6. Richter M, Gottanka J, May CA, Welge-Lüssen U, Berger W, Lütjen-Drecoll E. Retinal vasculature changes in Norrie disease mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(12):2450–7.
7. Ohlmann A, Scholz M, Goldwich A, Chauhan BK, Hudl K, Ohlmann AV, Zrenner E, Berger W, Cvekl A, Seeliger MW, Tamm ER. Ectopic norrin induces growth of ocular capillaries and restores normal retinal angiogenesis in Norrie disease mutant mice. *J Neurosci*. 2005;25(7):1701–10. doi:10.1523/JNEUROSCI.4756-04.2005
8. Wang Y, Rattner A, Zhou Y, Williams J, Smallwood PM, Nathans J. Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Cell*. 2012;151(6):1332–44. doi:10.1016/j.cell.2012.10.042

9. Ohlmann A, Seitz R, Braunger B, Seitz D, Bösl MR, Tamm ER. Norrin promotes vascular regrowth after oxygen-induced retinal vessel loss and suppresses retinopathy in mice. *J Neurosci*. 2010;30(1):183–93.
doi:10.1523/JNEUROSCI.3210-09.2010
10. Seitz R, Hackl S, Seibuchner T, Tamm ER, Ohlmann A. Norrin mediates neuroprotective effects on retinal ganglion cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway and the induction of neuroprotective growth factors in Muller cells. *J Neurosci*. 2010;30(17):5998–6010.
doi:10.1523/JNEUROSCI.0730-10.2010
11. Braunger BM, Ohlmann A, Koch M, Tanimoto N, Volz C, Yang Y, Bösl MR, Cvekl A, Jägle H, Seeliger MW, Tamm ER. Constitutive overexpression of Norrin activates Wnt/ β -catenin and endothelin-2 signaling to protect photoreceptors from light damage. *Neurobiol Dis*. 2013;501–12.
doi:10.1016/j.nbd.2012.09.008
12. Kassumeh S, Leopold S, Fuchshofer R, Thomas CN, Priglinger SG, Tamm ER, Ohlmann A. Norrin Protects Retinal Ganglion Cells from Excitotoxic Damage via the Induction of Leukemia Inhibitory Factor. *Cells*. 2020;9(2).
doi:10.3390/cells9020277
13. Leopold SA, Zeilbeck LF, Weber G, Seitz R, Bösl MR, Jägle H, Fuchshofer R, Tamm ER, Ohlmann A. Norrin protects optic nerve axons from degeneration in a mouse model of glaucoma. *Sci Rep*. 2017;7(1):14274. doi:10.1038/s41598-017-14423-8
14. Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res*. 2009;28(6):423–51. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.07.001
15. Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*. 2000;26(2):99–109.
16. Brault V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, Sommer L, Boussadia O, Kemler R. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development*. 2001;128(8):1253–64.

17. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* 1999;21(1):70–1. doi:10.1038/5007
18. Shen Y, Liu X-L, Yang X-L. N-methyl-D-aspartate receptors in the retina. *Mol Neurobiol.* 2006;34(3):163–79. doi:10.1385/MN:34:3:163
19. Anderson MG, Libby RT, Gould DB, Smith RS, John SWM. High-dose radiation with bone marrow transfer prevents neurodegeneration in an inherited glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(12):4566–71. doi:10.1073/pnas.0407357102
20. Forkwa TK, Neumann ID, Tamm ER, Ohlmann A, Reber SO. Short-term psychosocial stress protects photoreceptors from damage via corticosterone-mediated activation of the AKT pathway. *Exp Neurol.* 2014;25228–36. doi:10.1016/j.expneurol.2013.11.016
21. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods.* 2008;44(3):250–4. doi:10.1016/j.ymeth.2007.11.008
22. Shen W, Fruttiger M, Zhu L, Chung SH, Barnett NL, Kirk JK, Lee S, Coorey NJ, Killingsworth M, Sherman LS, Gillies MC. Conditional Müllercell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. *J Neurosci.* 2012;32(45):15715–27. doi:10.1523/JNEUROSCI.2841-12.2012
23. Li Y, Schlamp CL, Nickells RW. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(5):1004–8.
24. Lewis GP, Fisher SK. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol.* 2003;230:263–90. doi:10.1016/s0074-7696(03)30005-1
25. Derouiche A, Rauen T. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res.* 1995;42(1):131–43. doi:10.1002/jnr.490420115
26. Lehre KP, Davanger S, Danbolt NC. Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina. *Brain Res.* 1997;744(1):129–37.

27. Rauen T, Rothstein JD, Wässle H. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res.* 1996;286(3):325–36.
28. Mori T, Tanaka K, Buffo A, Wurst W, Kühn R, Götz M. Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia.* 2006;54(1):21–34. doi:10.1002/glia.20350
29. Rattner A, Wang Y, Zhou Y, Williams J, Nathans J. The role of the hypoxia response in shaping retinal vascular development in the absence of Norrin/Frizzled4 signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(12):8614–25. doi:10.1167/iovs.14-15693
30. Melo J de, Miki K, Rattner A, Smallwood P, Zibetti C, Hirokawa K, Monuki ES, Campochiaro PA, Blackshaw S. Injury-independent induction of reactive gliosis in retina by loss of function of the LIM homeodomain transcription factor Lhx2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(12):4657–62. doi:10.1073/pnas.1107488109
31. Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE. NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron.* 2010;68(4):668–81. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.009
32. Fu X, Sun H, Klein WH, Mu X. Beta-catenin is essential for lamination but not neurogenesis in mouse retinal development. *Dev Biol.* 2006;299(2):424–37. doi:10.1016/j.ydbio.2006.08.015
33. Shen Y, Zhu L-J, Liu S-S, Zhou S-Y, Luo J-H. Interleukin-2 inhibits NMDA receptor-mediated currents directly and may differentially affect subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;351(2):449–54. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.047
34. Natoli R, Jiao H, Barnett NL, Fernando N, Valter K, Provis JM, Rutar M. A model of progressive photo-oxidative degeneration and inflammation in the pigmented C57BL/6J mouse retina. *Exp Eye Res.* 2016;147:114–27. doi:10.1016/j.exer.2016.04.015
35. Naash ML, Peachey NS, Li ZY, Gryczan CC, Goto Y, Blanks J, Milam AH, Ripps H. Light-induced acceleration of photoreceptor degeneration in transgenic

- mice expressing mutant rhodopsin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(5):775–82.
36. Lumayag S, Haldin CE, Corbett NJ, Wahlin KJ, Cowan C, Turturro S, Larsen PE, Kovacs B, Witmer PD, Valle D, Zack DJ, Nicholson DA, Xu S. Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(6):E507-16. doi:10.1073/pnas.1212655110
 37. Arnés M, Casas Tintó S. Aberrant Wnt signaling: a special focus in CNS diseases. *J Neurogenet.* 2017;31(4):216–22. doi:10.1080/01677063.2017.1338696
 38. L'Episcopo F, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, Cossetti C, D'Adamo P, Zardini E, Andreoni L, Ihekwaba AEC, Serra PA, Franciotta D, Martino G, Pluchino S, Marchetti B. Reactive astrocytes and Wnt/ β -catenin signaling link nigrostriatal injury to repair in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2011;41(2):508–27. doi:10.1016/j.nbd.2010.10.023
 39. Jones SE, Jomary C, Grist J, Stewart HJ, Neal MJ. Altered expression of secreted frizzled-related protein-2 in retinitis pigmentosa retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1297–301.
 40. Jones SE, Jomary C, Grist J, Stewart HJ, Neal MJ. Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration. *Neuroreport.* 2000;11(18):3963–7. doi:10.1097/00001756-200012180-00012
 41. Park KH, Choi AJ, Yoon J, Lim D, Woo SJ, Park SJ, Kim HC, Chung H. Wnt modulators in the aqueous humor are associated with outer retinal damage severity in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(9):5522–30. doi:10.1167/iovs.14-14566
 42. Ji B, Lim D, Kim J, Kim HC, Chung H. Increased Levels of Dickkopf 3 in the Aqueous Humor of Patients With Diabetic Macular Edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(4):2296–304. doi:10.1167/iovs.15-18771
 43. Wang W-H, McNatt LG, Pang I-H, Millar JC, Hellberg PE, Hellberg MH, Steely HT, Rubin JS, Fingert JH, Sheffield VC, Stone EM, Clark AF. Increased expression of the WNT antagonist sFRP-1 in glaucoma elevates intraocular pressure. *J Clin Invest.* 2008;118(3):1056–64. doi:10.1172/JCI33871

44. Williams RW, Strom RC, Rice DS, Goldowitz D. Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *J Neurosci*. 1996;16(22):7193–205.
45. Luo X, Baba A, Matsuda T, Romano C. Susceptibilities to and mechanisms of excitotoxic cell death of adult mouse inner retinal neurons in dissociated culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(12):4576–82. doi:10.1167/iovs.04-0166
46. Ullian EM, Barkis WB, Chen S, Diamond JS, Barres BA. Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity. *Mol Cell Neurosci*. 2004;26(4):544–57. doi:10.1016/j.mcn.2004.05.002
47. Kuehn S, Rodust C, Stute G, Grotegut P, Meißner W, Reinehr S, Dick HB, Joachim SC. Concentration-Dependent Inner Retina Layer Damage and Optic Nerve Degeneration in a NMDA Model. *J Mol Neurosci*. 2017;63(3-4):283–99. doi:10.1007/s12031-017-0978-x
48. Zhu L, Shen W, Zhang T, Wang Y, Bahrami B, Zhou F, Gillies MC. Characterization of canonical Wnt signalling changes after induced disruption of Müller cell in murine retina. *Exp Eye Res*. 2018;175:173–80. doi:10.1016/j.exer.2018.06.016
49. Lebrun-Julien F, Duplan L, Pernet V, Osswald I, Sapieha P, Bourgeois P, Dickson K, Bowie D, Barker PA, Di Polo A. Excitotoxic death of retinal neurons in vivo occurs via a non-cell-autonomous mechanism. *J Neurosci*. 2009;29(17):5536–45. doi:10.1523/JNEUROSCI.0831-09.2009
50. Lebrun-Julien F, Morquette B, Douillette A, Saragovi HU, Di Polo A. Inhibition of p75(NTR) in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci*. 2009;40(4):410–20. doi:10.1016/j.mcn.2008.12.005
51. Honjo M, Tanihara H, Kido N, Inatani M, Okazaki K, Honda Y. Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Müller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(2):552–60.
52. Sarup V, Patil K, Sharma SC. Ciliary neurotrophic factor and its receptors are differentially expressed in the optic nerve transected adult rat retina. *Brain Res*. 2004;1013(2):152–8. doi:10.1016/j.brainres.2004.03.030

53. Liu B, Hunter DJ, Rooker S, Chan A, Paulus YM, Leucht P, Nusse Y, Nomoto H, Helms JA. Wnt signaling promotes Müller cell proliferation and survival after injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(1):444–53. doi:10.1167/iops.12-10774

6.2. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	Alpha
β	Beta
κ	Kappa
μ	mikro-
a	Adenin
Abb.	Abbildung
<i>ad libitum</i>	nach Belieben
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ARVO	<i>Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Cytosin, Zenti-
C57BL/6J	Maus-Inzuchtstamm
cDNA	komplementäre DNA
Cntf	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
Ctnnb1	β-Catenin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DBA/2J	Maus-Inzuchtstamm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
Edn2	Endothelin 2
ER	Östrogenrezeptor
<i>et al.</i>	und andere
Fgf2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
fl	<i>loxP site</i>

g	Gramm, Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gfap	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLAST	Glutamat/Aspartat-Transporter
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HRP	Meerrettich-Peroxidase
INL	innere Körnerschicht
i.p.	intraperitoneal
IPL	innere plexiforme Schicht
Konz.	Konzentration
l	Liter
LGR	<i>leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor</i>
Lif	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LRP	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
m	milli-, Meter
M	molar
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N.	<i>Nervus</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP-40	Nonoxinol 40
ONH	<i>optic nerve head</i> , Sehnervenkopf
ONL	äußere Körnerschicht
OPL	äußere plexiforme Schicht
OS	<i>Ora serrata</i>
p	<i>Probability</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGC	retinale Ganglienzellen
RNA	Ribonukleinsäure

Rosa26	<i>Reverse Oriented Splice Acceptor, Clone 26</i>
RT	Raumtemperatur, reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
Slc1a3	<i>Solute carrier family 1 member 3</i>
t	Thymin
Taq Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline and Tween 20</i>
TG	Transgen
TNF- α	Tumornekrosefaktors- α
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase mediated biotinylated UTP nick end labeling</i>
Tx	Tamoxifen
U	Enzymeinheit
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UTP	Uridintriphosphat
Wnt	<i>wingless</i>
WT	Wildtyp
x	mal, -fach
XGal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verifizierung der spezifischen Expression der Tx-abhängigen Cre-Rekombinase in Slc1a3-Cre ^{ERT} /ROSA26-LacZ-Tieren.....	15
Abb. 2: Verifizierung der konditionalen β -Catenin-Defizienz auf Proteinebene	16
Abb. 3: Konditionale β -Catenin Defizienz in Müllerzellen führt nicht zum zeitnahen Untergang der Müllerzellen.....	17
Abb. 4: Wnt/ β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen erhöht den Verlust an Axonen in Sehnerven nach akutem exzitotoxischem Schaden der RGC.	19
Abb.: 5: Morphologische Analyse adulter Retinae von Slc1a3-Cre ^{ERT} /Ctnnb1 ^{fl/fl} und Ctnnb1 ^{fl/fl} Mäusen	21

Abb. 6: β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen verstärkt die Degeneration der inneren Retina nach akutem Schaden an retinalen Neuronen	22
Abb. 7: Wnt/ β -Catenin-Defizienz in Müllerzellen steigert die Apoptose von retinalen Neuronen.....	24
Abb. 8: Akuter Schaden an retinalen Neuronen verstärkt die β -Catenin-Expression in Müllerzellen	26
Abb. 9: Akuter Schaden an retinalen Neuronen verstärkt die Gliose-Reaktion über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen	27
Abb. 10: Akuter Schaden an retinalen Neuronen induziert über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Müllerzellen die Expression von Lf	28

6.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oligonukleotidprimer für Genotypisierungen	9
Tabelle 2: Oligonukleotidprimer für real-time RT-PCR	13

6.5. Originalpublikation

Endogenous Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells protects retinal ganglion cells from excitotoxic damage

Fabian Boesl,¹ Konstantin Drexler,¹ Birgit Müller,¹ Roswitha Seitz,¹ Gregor R. Weber,² Siegfried G. Priglinger,² Rudolf Fuchshofer,¹ Ernst R. Tamm,¹ Andreas Ohlmann²

¹Institute of Human Anatomy and Embryology, University of Regensburg, Regensburg, Germany; ²Department of Ophthalmology, University Hospital, Ludwig-Maximilians-University Munich, Germany

Purpose: To analyze whether activation of endogenous wingless (Wnt)/ β -catenin signaling in Müller cells is involved in protection of retinal ganglion cells (RGCs) following excitotoxic damage.

Methods: Transgenic mice with a tamoxifen-dependent β -catenin deficiency in Müller cells were injected with N-methyl-D-aspartate (NMDA) into the vitreous cavity of one eye to induce excitotoxic damage of the RGCs, while the contralateral eye received PBS only. Retinal damage was quantified by counting the total number of RGC axons in cross sections of optic nerves and measuring the thickness of the retinal layers on meridional sections. Then, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was performed to identify apoptotic cells in retinas of both genotypes. Western blot analyses to assess the level of retinal β -catenin and real-time RT-PCR to quantify the retinal expression of neuroprotective factors were performed.

Results: Following NMDA injection of wild-type mice, a statistically significant increase in retinal β -catenin protein levels was observed compared to PBS-injected controls, an effect that was blocked in mice with a Müller cell-specific β -catenin deficiency. Furthermore, in mice with a β -catenin deficiency in Müller cells, NMDA injection led to a statistically significant decrease in RGC axons as well as a substantial increase in TUNEL-positive cells in the RGC layer compared to the NMDA-treated controls. Moreover, in the retinas of the control mice a NMDA-mediated statistically significant induction of leukemia inhibitory factor (Lif) mRNA was detected, an effect that was substantially reduced in mice with a β -catenin deficiency in Müller cells.

Conclusions: Endogenous Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells protects RGCs against excitotoxic damage, an effect that is most likely mediated via the induction of neuroprotective factors, such as Lif.

Wingless (Wnt) signaling is involved in various processes, such as embryonic development, maintenance of homeostasis in adults, or tumor growth in cancer biology. Members of the Wnt family are secreted glycolipoproteins, which bind with a high affinity to frizzled receptors. The central signaling molecule for the canonical Wnt signaling pathway is β -catenin, which is constitutively expressed in most cell types. In the absence of Wnt proteins, β -catenin is constantly removed by its degradation complex. After Wnt proteins bind to their frizzled receptors, a complex with its coreceptor, low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5 or 6, is formed to inactivate the β -catenin degradation complex by recruiting it to the plasma membrane. After accumulation in the cytoplasm, β -catenin translocates into the nucleus to induce the expression of Wnt-specific target genes [1].

In the retina, Wnt/ β -catenin signaling is involved in the development and maintenance of vasculature, as well as in

homeostasis of neurons. A predominant mediator of retinal Wnt/ β -catenin signaling is the secreted protein Norrin, which is specifically expressed in Müller cells [2]. Via binding to frizzled 4 or leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor (LGR) 4, Norrin activates canonical Wnt/ β -catenin signaling in the presence of its coreceptor LRP 5 or 6 [3-5]. During the development of the retinal vasculature, Norrin-mediated Wnt/ β -catenin signaling is crucial for vessel outgrowth on the inner retinal surface toward the ora serrata, the formation of the intraretinal plexus as well as the differentiation and maintenance of the inner blood-retinal barrier [6-8]. In addition to an angiogenic function in development, Norrin promotes vessel regrowth into ischemic retinal areas in a mouse model of retinopathy of prematurity [9]. Several reports demonstrated an additional neuroprotective role of Norrin for retinal neurons. A continuous loss of retinal ganglion cells (RGCs) was observed in Norrin-deficient mice in addition to the vascular changes, while transgenic overexpression of Norrin during development led to enhanced proliferation of retinal progenitor cells [6,7]. In addition, following acute damage of RGCs with N-methyl-D-aspartate (NMDA) and of photoreceptors by light exposure, Norrin protects both cell types against apoptosis [10,11]. In both

Correspondence to: Andreas Ohlmann, Department of Ophthalmology, University Hospital, LMU Munich, Mathildenstr. 8, 80336 Munich; Phone: +49-89-440053054; FAX: +49-89-440054778; email: andreas.ohlmann@med.uni-muenchen.de

animal models, Wnt/ β -catenin dependent induction of neuroprotective factors, such as leukemia inhibitory factor (Lif), endothelin (Edn)-2, brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, or fibroblast growth factor (Fgf)-2, was observed. In a recent study, we showed that following NMDA injection into the vitreous cavity Norrin mediates its protective effects on RGCs via the induction of Lif [12]. Moreover, in DBA/2J mice that have increased intraocular pressure and chronic degeneration of RGCs, Norrin protects the cells via Wnt/ β -catenin-mediated induction of insulin-like growth factor-1 [13].

As Müller cells have the distinct potential to transmit protective effects on damaged retinal neurons via enhanced expression of neuroprotective factors [14], we hypothesized that activation of endogenous Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells could mediate protective effects on RGCs following acute excitotoxic damage. To this end, a mouse model with a tamoxifen-dependent, conditional β -catenin deficiency in Müller cells was generated, and excitotoxic damage of RGCs was investigated after induction of β -catenin deficiency and intravitreal injection of NMDA. The results provide evidence that the endogenous Wnt/ β -catenin pathway in Müller cells mediates protective properties that are critical for RGC survival after injury, an effect that involves increased expression of neuroprotective factors in Müller cells.

METHODS

Animals: All animal procedures in this study conformed with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and were authorized by the local authorities (Regierung der Oberpfalz, Regierung, Germany). Mice were housed in the animal facility of the University of Regensburg according to standard conditions. All experiments were performed in mice of both sexes.

Mice with two loxP restriction sites including exon 2 to 6 of *Ctmb1* (*Ctmb1^{fl/fl}*; a gift from Rolf Kemler) [15] were crossed with mice that express tamoxifen-dependent Cre-recombinase under the control of the *Slc1a3* promoter (*Slc1a3-Cre^{ERT}*; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) to generate *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctmb1^{fl/fl}* mice. Both mouse strains were bred in the C57BL/6J genetic background. To analyze the expression and activity of Cre-recombinase in the retinas of the *Slc1a3-Cre^{ERT}* transgenic animals, the mice were crossed with Rosa26-LacZ reporter animals [16]. Transgenic mice were identified with PCR genotyping, using the primer pairs 5'-ACA ATC TGG CCT GCT ACC AAA GC-3' and 5'-CCA GTG AAA CAG CAT TGC TGT C-3' for the *Slc1a3-Cre^{ERT}* mice (fragment size about 600 bp), 5'-ATC CTC TGC ATG GTC AGG TC-3' and 5'-CGT GGC CTG ATT CAT

TCC-3' for the Rosa26-LacZ animals (fragment size about 300 bp), and 5'-AAG GTA GAG TGA TGA AAG TTG TT-3' and 5'-CAC CAT GTC CTC TGT CT ATTC-3' for the *Ctmb1^{fl/fl}* mice (the fragment size for the wild-type and loxP allele was 221 bp and 324 bp, respectively). The thermal cycle profile of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 45 s for 35 cycles was used to identify Rosa26-LacZ, *Slc1a3-Cre^{ERT}*, and *Ctmb1^{fl/fl}* mice. All primers were purchased from Thermo Fisher (Waltham, MA). To induce Cre-mediated recombination, 50 μ l tamoxifen (20 mg/ml) were injected intraperitoneally in isoflurane-anesthetized 6-week-old *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctmb1^{fl/fl}*, *Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ*, Rosa26-LacZ, and *Ctmb1^{fl/fl}* mice twice a day for 5 days.

NMDA-induced retinal damage: The NMDA injection was performed as previously described [10]. Briefly, to induce retinal excitotoxic damage, 8-week-old *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctmb1^{fl/fl}* mice and *Ctmb1^{fl/fl}* controls were anesthetized with isoflurane followed by an injection of 3 μ l NMDA (10 mM dissolved with 1X PBS; 144 mg/l KH_2PO_4 , 9 g/l NaCl, 795 mg/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4) into the vitreous cavity of one eye while the contralateral eye was injected with 3 μ l PBS. The eyes, optic nerves, and retinas were prepared at the indicated time.

Light microscopy: Following tamoxifen treatment and 2 weeks after the NMDA injection, the eyes and the attached optic nerves were enucleated and fixed in cacodylate buffer with 2.5% paraformaldehyde (PFA) and 2.5% glutaraldehyde overnight. After washing with cacodylate buffer and postfixing with OsO_4 , the eyes and the optic nerves were dehydrated and embedded in Epon (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) according to standard protocols. Semithin meridional sections (1 μ m) of the eyes and the optic nerves were stained with fuchsin and methylene blue, or pararaphenylenediamine, respectively, according to standard protocols and analyzed with light microscopy using an Axiovision microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Quantification of the axons in the optic nerve was performed following a protocol published previously [17]. Briefly, one central and four peripheral squares (40 μ m \times 40 μ m each), which cover more than 10% of the total optic nerve area, were projected onto the optic nerves, quantified, and extrapolated to the total area of the optic nerve.

To evaluate the thickness of the retinal layers, meridional retinal semithin sections were analyzed as described previously [18]. Briefly, the distance between the ora serrata and the optic nerve head was divided into tenths, and the thickness of the total retina, the inner nuclear layer, the outer nuclear layer, the inner plexiform layer, and the outer plexiform layer

was measured between each tenth using Axiovision software 4.8 (Carl Zeiss).

X-Gal staining: Two weeks after tamoxifen treatment, the eyes of the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ* mice and *Rosa26-LacZ* littermates were prepared and fixed in 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) at 4 °C for 1 h. After three washings for 30 min each (0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40, 2 mM MgCl₂, and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3), the eyes were incubated in LacZ staining buffer (0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, 3 mM MgCl₂, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, and 1 mg/ml X-Gal) overnight. After three additional washings with PBS, the eyes were embedded in paraffin according to standard protocols. Meridional sections were analyzed on an Axiovision fluorescent microscope (Carl Zeiss).

Immunohistochemistry and TUNEL labeling: For immunohistochemistry and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) labeling, the eyes were fixed with 4% PFA for 4 h and embedded in paraffin according to standard procedures. For Sox6 staining, the sections were treated with 1x Target Retrieval Solution (Dako North America, Carpinteria, CA) at 100 °C for 20 min, washed with 1x PBS at room temperature for 5 min, and incubated in 0.25% Triton X-100 in 1x PBS at room temperature for an additional 10 min. After blocking with 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X-100 in 1x PBS for 60 min, the sections were incubated with rabbit anti-Sox9 antibodies (1:50, Merck, Darmstadt, Germany) in 0.2% BSA and 0.01% Triton X-100 in 1x PBS overnight at 4 °C. Following three washes (10 min each) with 1x PBS, the samples were incubated with Cyc3 coupled anti-rabbit antibodies (1:1,000; Thermo Fisher) for 60 min. After the final incubation, all specimens were washed again three times, mounted in fluorescent mounting medium containing 1:50 of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA), and analyzed on an Axio Observer 7 fluorescent microscope (Carl Zeiss).

Apoptotic retinal cells were identified with the DeadEnd Fluorometric TUNEL system (Promega, Fitchburg, WI). TUNEL labeling of the paraffin sections was performed according to the manufacturer's instructions. Slides were analyzed on an Axiovision fluorescent microscope (Carl Zeiss). For quantification, the total number of TUNEL-positive cells was quantified in the RGC layer and in the inner nuclear layer (INL) of the meridional sections and calculated as the number of TUNEL-positive cells per 1,000 μm retinal length.

RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time RT-PCR analyses: For the expression analyses, the retinas were dissected

24 h after injection of 3 μl NMDA (10 mM) into the vitreous body of one eye and 3 μl PBS into the contralateral eye. The retinas were homogenized in peqGOLD TriFast (Peqlab, Erlangen, Germany), and total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration and the OD260/OD280 ratio were measured with the NanoDrop spectrophotometer ND-2000c (Peqlab). Only total RNA with a 260/280 ratio between 1.8 and 2.0 was used for first-strand cDNA synthesis with the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) in accordance with the manufacturer's recommendations. Quantitative real-time RT-PCR analyses were performed on a Bio-Rad iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). HotStart Taq DNA polymerase (Qiagen, Hilde, Germany) was used for PCR according to the manufacturer's protocol. PCR was performed in a volume of 15 μl, consisting of 1.5 μl of 10x PCR buffer (Qiagen), 0.6 μl of 25 mM MgCl₂ (Qiagen), 0.12 μl of dNTPs (25 mM each, Qiagen), 0.06 μl of HotStart Taq (5 U/μl), 0.16 μl of primer mix (1 μM each, Thermo Fisher) and 0.39 μl of 1x SYBR Green I solution (Qiagen). The following temperature profile was used: 40 cycles with 20 s denaturation at 95 °C, 10 s annealing at 60 °C, and 20 s extension at 70 °C. RNA that had not been reverse-transcribed served as negative control for real-time RT-PCR. All PCR primers were designed to span exon-intron boundaries and were purchased from Thermo Fisher (Table 1). All PCR products were analyzed with DNA sequencing. For relative quantification, the reference gene *Gnb2l1* was used. Results were analyzed using the iQ5 optical system software (Version 2.1).

Protein preparation and western blot analyses: To analyze retinal β-catenin expression, dissected retinas of 8-week-old *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctmb1^{fl/fl}* mice and *Ctmb1^{fl/fl}* controls with or without intravitreal injections of 3 μl NMDA into the vitreous body of one eye and 3 μl PBS into the contralateral eye were homogenized in peqGOLD TriFast (Peqlab), and retinal proteins were isolated according to the manufacturer's instructions. Protein concentration was measured with the bicinchoninic acid (BCA) assay according to the manufacturer's instructions (Interchim, Wörgl, Austria). Up to 25 μg of total protein were loaded onto 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Roche, Rotkreuz, Switzerland) with semidry blotting. After blocking with 5% BSA in Tris-buffered saline and Tween 20 (TBST), the membranes were incubated overnight with rabbit anti-β-catenin antibodies (1:1,000; Cell Signaling, Cambridge, UK) in TBST with 0.5% BSA. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit antibodies were used as secondary antibodies (Santa Cruz, Santa Cruz, CA). Antibody labeling was visualized using the Immobilon HRP substrate (Millipore,

Darmstadt, Germany) and documented on an LAS 3000 Imager work station (Fujifilm, Tokyo, Japan). As loading control, HRP-conjugated anti-GAPDH antibodies were used (Cell Signaling). Densitometry of western blot analyses was performed with the Aida Advanced Image Data Analyzer v.4.06 (Raytest, Straubenhardt, Germany).

Statistics: All values are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). For statistical analyses, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the mean variables, followed by a least significant difference (LSD) post hoc test for data that met the criteria of the assumption of homogeneity of variances and a Games-Howell post hoc test for data that did not meet the criteria of homogeneity of variances. P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Tamoxifen-induced β -catenin deficiency in Müller cells of *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice: To confirm the expression of Cre-recombinase in Müller cells of *Slc1a3-Cre^{ERT}* mice, which express tamoxifen-dependent Cre-recombinase under the control of the *Slc1a3* promoter, *Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ* mice with LacZ expression after Cre-mediated recombination were generated. Two weeks after tamoxifen treatment, X-Gal staining of the eyes of 8-week-old *Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ* mice was performed while *Rosa26-LacZ* animals without additional Cre expression served as negative controls. In the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ* mice, blue staining in the middle of the inner nuclear layer was observed, strongly indicating cytoplasmic labeling of Müller cells. From these labeled cells, radial extensions to the inner

and outer limiting membrane with enhanced staining in the RGC layer and the inner limiting membrane were detected that likely corresponded to the end feet of the Müller cells (Figure 1B). In *Rosa26-LacZ* mice without Cre expression, no positive signal for β -galactosidase was detected (Figure 1A).

To verify that tamoxifen treatment leads to β -catenin deficiency in retinas of *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice, retinal proteins were investigated by western blot analyses. In retinal proteins from tamoxifen-treated *Ctnnb1^{fl/fl}* mice, an intense signal for β -catenin was detected, whereas in the tamoxifen-injected *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice only a faint signal for retinal β -catenin was observed (Figure 1C). Quantification with densitometry of several experiments demonstrated a more than 35% decrease in the β -catenin protein levels in *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice compared to the *Ctnnb1^{fl/fl}* controls ($p < 0.05$; Figure 1D). The difference was statistically significant ($p < 0.05$), strongly suggesting that tamoxifen treatment promotes substantially reduced β -catenin expression in the retinas of *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice.

Then, to rule out that Wnt/ β -catenin deficiency in Müller cells by tamoxifen treatment leads to a loss of Müller cells, immunohistochemical staining against Sox9, a glial marker for Müller cells and astrocytes [19], as well as real-time RT-PCR for Sox9 mRNA were performed. In the retinas from the tamoxifen-treated 8-week-old *Ctnnb1^{fl/fl}* mice and the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice, staining for Sox9 was predominantly observed in the nuclei of the INL of both genotypes and to a lesser extent in the RGC layer (Figure 1F,G). No obvious difference in the number or distribution of Sox9-positive nuclei in the INL was seen between the *Ctnnb1^{fl/fl}* and *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice. Furthermore, 2 weeks after

TABLE 1. PRIMERS USED FOR REAL-TIME RT-PCR AMPLIFICATION.

Gene	Accession No.	Sequence	Position	Product size
<i>Lif</i>	NM_008501	5'-CGCCAATGCTCTCTTCATTT-3'	400 - 419	80 bp
		5'-TAGGCGCACATAGCTTTTCC-3'	479 - 460	
<i>End2</i>	NM_007902	5'-ACCTCCTCCGAAAGCTGAG-3'	720 - 738	76 bp
		5'-TTTCTTGTCACCTCTGGCTGTA-3'	795 - 774	
<i>Fgf2</i>	NM_008006	5'-CGGCTCTACTGCAAGAACG-3'	285 - 303	108 bp
		5'-TGCTTGGAGTTGTAGTTTGACG-3'	392 - 371	
<i>Gfap</i>	NM_001131020	5'-TCGAGATCGCCACCTACAG-3'	1156 - 1174	67 bp
		5'-GTCTGTACAGGAATGGTGATGC-3'	1222 - 1201	
<i>Sox9</i>	NM_011448	5'-GTACCCGCATCTGCACAAC-3'	753 - 771	94 bp
		5'-CTCCTCCACGAAGGGTCTCT-3'	846 - 827	
<i>GNB2L1</i>	NM_008143	5'-TCTGCAAGTACACGGTCCAG-3'	514 - 533	89 bp
		5'-ACGATGATAGGGTTGCTGCT-3'	601 - 582	

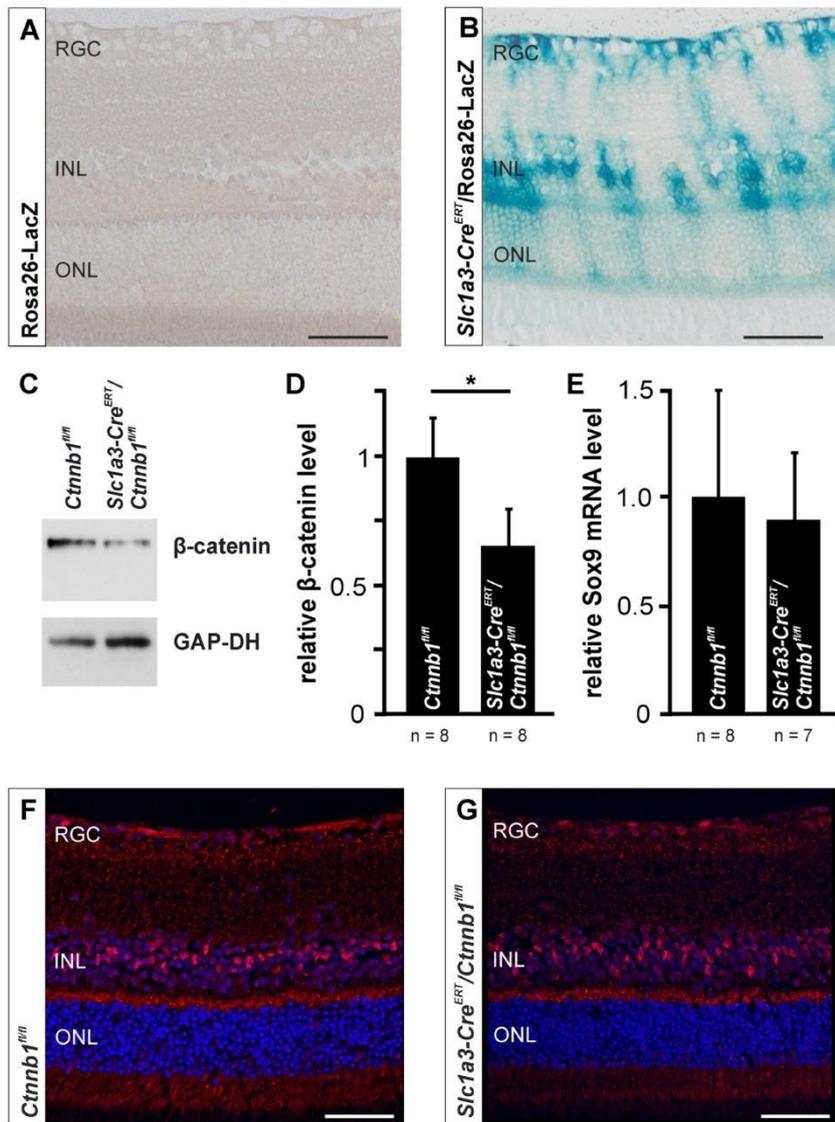


Figure 1. Tamoxifen-induced β -catenin deficiency in Müller cells of *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice. **A, B**: Representative β -galactosidase staining of 8-week-old *Rosa26-LacZ* reporter mice with or without additional Cre expression in Müller cells (*Slc1a3-Cre^{ERT}*) after treatment with tamoxifen (50 μ l tamoxifen [20 mg/ml] i.p. 2x/day for 5 days). In the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Rosa26-LacZ* mice, radial staining for β -galactosidase that spread from the inner to the outer limiting membrane was detected. In addition, the nuclei of the labeled cells were localized in the inner nuclear layer (**B**), whereas no β -galactosidase expression was detected in mice without Cre expression (**A**). Magnification bars = 50 μ m. RGC, retinal ganglion cell, INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. **C, D**: Western blot analysis (**C**) and densitometry (**D**) for β -catenin from retinal proteins of 8-week-old *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice 2 weeks after treatment with tamoxifen (mean \pm standard error of the mean, SEM; n = 8; *p<0.05). **E–G**: Real-time RT-PCR (**E**) and immunohistochemical staining (**F, G**) for Sox9 of 8-week-old mice 2 weeks after treatment with tamoxifen (50 μ l tamoxifen [20 mg/ml] i.p. 2x/day for 5 days). No difference in the number or distribution of Sox9 positive nuclei (red) in the INL was seen between the *Ctnnb1^{fl/fl}* (**F**) and *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* (**G**) mice. Magnification bars, 50 μ m. Blue, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining; RGC, retinal ganglion cell, INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer.

the tamoxifen treatment similar expression of Sox9 mRNA was detected with real-time RT-PCR in the retinal RNA of both genotypes (Figure 1E), strongly suggesting that the tamoxifen-induced loss of Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells does not lead to prompt degeneration of these cells.

Wnt/ β -catenin deficiency in Müller cells enhances NMDA-mediated excitotoxic damage of retinal ganglion cells: To investigate whether endogenous Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells protects against NMDA-mediated excitotoxic RGC damage, the optic nerves from 10-week-old *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice and *Ctnnb1^{fl/fl}* littermates were investigated 4 weeks after treatment with tamoxifen and 2 weeks after intravitreal injection of NMDA or PBS. After injection of PBS into the vitreous cavity, only a few darkly stained, degenerating myelin sheaths were detectable (Figure 2A–D). In contrast, an obvious loss of axons with darkly stained myelin whorls and extensive glial scars was seen after NMDA injection (Figure 2E–H). Furthermore, axonal damage was even more pronounced in the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice compared to the *Ctnnb1^{fl/fl}* controls (Figure 2E–H). The quantitative analysis of the total number of axons in the optic nerves of both genotypes showed a substantial decline in the RGC axons following the NMDA injection to $17,029 \pm 870$

in the *Ctnnb1^{fl/fl}* mice as well as $13,677 \pm 775$ in the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice compared to the PBS-injected controls ($32,856 \pm 961$ in the *Ctnnb1^{fl/fl}* mice; $32,451 \pm 1,646$ in the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice), a difference that was highly statistically significant for both groups ($p < 0.001$; Figure 2I). Comparing the total number of optic nerve axons from the NMDA-treated eyes between the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice and *Ctnnb1^{fl/fl}* littermates, we found almost 25% more axons in the *Ctnnb1^{fl/fl}* mice, a difference that was statistically significant ($p < 0.05$). In contrast, no statistically significant difference between the total number of optic nerve axons of the PBS-injected eyes from the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice and *Ctnnb1^{fl/fl}* controls was observed. In summary, the results strongly suggest that deficiency of endogenous Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells enhances NMDA-mediated excitotoxic damage of RGCs.

To further analyze the effects of NMDA-mediated excitotoxic damage on retinal neurons in mice with a β -catenin deficiency in Müller cells, we analyzed the retinal morphology of *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice and *Ctnnb1^{fl/fl}* controls on meridional semithin sections 2 weeks after intravitreal injection of NMDA or PBS and 4 weeks after treatment with tamoxifen. For quantification, the distance

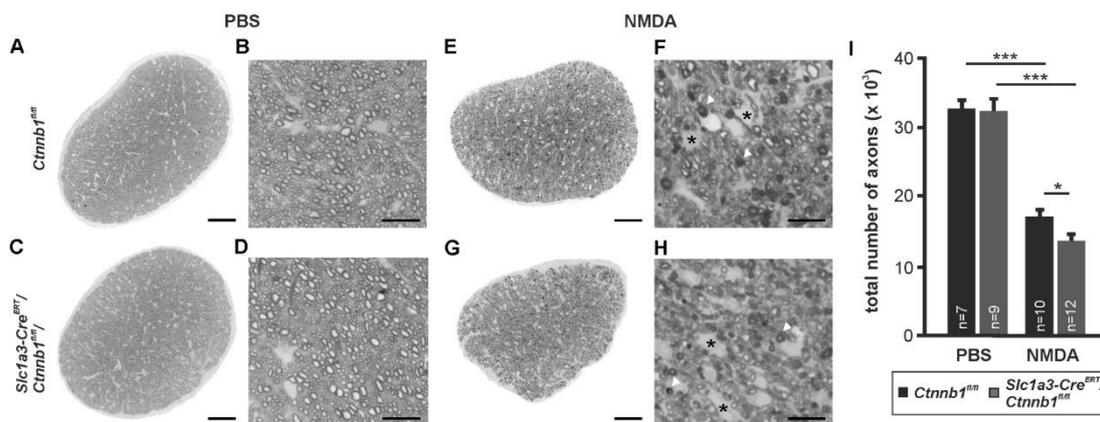


Figure 2. Wnt/ β -catenin deficiency in Müller cells enhances axon loss in the optic nerve following acute excitotoxic damage of RGCs. **A–H:** Representative sagittal semithin sections through optic nerves from 10-week-old *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice and *Ctnnb1^{fl/fl}* controls 2 weeks after intravitreal injection of 3 μ l N-methyl-D-aspartate (NMDA) [10 mM] or PBS and treatment with tamoxifen at the age of 6 weeks (50 μ l tamoxifen [20 mg/ml] i.p. 2x/day for 5 days). In the optic nerves of the NMDA-injected eyes, obvious loss of axons, broad glial scars (asterisk), and darkly stained myelin whorls (arrow heads) were observed (**E–H**), whereas in the PBS-treated eyes only a few degenerating myelin sheaths were detectable (**A–D**). In the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice, the axonal damage was even more pronounced compared to that in the *Ctnnb1^{fl/fl}* controls (**E–H**). Magnification bars: A, C, E, G, 50 μ m; B, D, F, H, 10 μ m. **I:** For quantification, the number of axons in the optic nerves from the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice and the *Ctnnb1^{fl/fl}* controls was quantified and plotted as the total number per optic nerve (mean \pm standard error of the mean, SEM; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

between the ora serrata and the optic nerve head was divided into tenths, and the thickness of the total retina, inner plexiform layer (IPL), INL, outer plexiform layer (OPL), and outer nuclear layer (ONL) was measured between each tenth.

The thickness of the total retina, the INL, and the OPL of the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice was reduced by approximately 6%, 10%, and 15%, respectively, in the central retina following PBS injection compared to the *Ctnnb1^{fl/fl}* controls, suggesting that a lack of endogenous Wnt/ β -catenin signaling leads to slight neuronal degeneration of the central retina (Figure 3A,B,D,E). In addition, the central ONL and the OPL were statistically significantly thicker in the eyes of mice from both genotypes following NMDA injection compared to the PBS-treated contralateral eyes (Figure 3E,F) suggesting that NMDA-mediated damage of the inner retina might lead to protective effects of the outer retina.

As expected, following treatment with NMDA both genotypes showed a pronounced and statistically significant reduction in the thicknesses of the total retina (up to 15%), the IPL (up to 50%), and the INL (up to 30%) compared to the PBS-injected controls (Figure 3A–D). In contrast, following NMDA injection, the thicknesses of the IPL and of the total retina of the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice were only slightly decreased compared to those of the *Ctnnb1^{fl/fl}* controls, a result that was, at least in part, statistically significant (Figure 3A–C). The difference between the two genotypes after NMDA injection was most evident for the INL, which in the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice showed a uniform, statistically significant reduction in the INL thickness of up to 12% compared to the *Ctnnb1^{fl/fl}* mice (Figure 3A,D). Overall, the data strongly suggest that Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells mediates effects that protect retinal neurons from excitotoxic retinal damage.

Endogenous Wnt/ β -catenin signaling inhibits NMDA-induced apoptosis of RGCs: After NMDA treatment, RGC death is a result of apoptosis [20]. To evaluate whether a deficiency in Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells leads to an increase in NMDA-mediated apoptosis, TUNEL labeling on meridional sections of retinas was performed 24 h after injection of NMDA or PBS into the vitreous cavity of 8-week-old *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice and the *Ctnnb1^{fl/fl}* controls and tamoxifen treatment.

In eyes of both genotypes, only a few TUNEL-positive cells were detected in the ONL following PBS injection (Figure 4A). In contrast, in the retinas of the NMDA-injected eyes from the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*, as well as to a lesser extent in the retinas of the NMDA-treated eyes from the *Ctnnb1^{fl/fl}* mice, numerous apoptotic cells were found in the RGC layer and the inner parts of the INL (Figure 4A).

Quantitative analysis confirmed that the number of TUNEL-positive cells in the RGC layer of the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice (56.0 ± 4.60 per 1,000 μm , mean \pm SEM) was approximately 40% higher than in the RGC layer of the *Ctnnb1^{fl/fl}* controls (39.8 ± 4.70 per 1,000 μm , mean \pm SEM) following NMDA injection, a difference that was statistically significant ($p = 0.023$; Figure 4B,C). Intriguingly, no difference in the number of apoptotic cells of NMDA-injected eyes was detected in the INL between the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* and *Ctnnb1^{fl/fl}* animals (Figure 4B,C).

Acute damage of RGCs enhances Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells: Next, we investigated whether the excitotoxic damage of RGCs leads to activation of Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells. Therefore, western blot analyses were performed on retinal proteins from NMDA- or PBS-injected *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice and *Ctnnb1^{fl/fl}* littermates that served as controls for β -catenin expression. In the *Ctnnb1^{fl/fl}* and *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice, a moderate signal for β -catenin was observed in retinal proteins after PBS injection (Figure 5A). In contrast, treatment of the *Ctnnb1^{fl/fl}* controls with NMDA led to a marked increase in β -catenin levels compared to the PBS-injected contralateral eyes (Figure 5A). However, no difference in the retinal β -catenin levels was seen between the NMDA- or PBS-injected eyes of the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice (Figure 5A).

Quantification with densitometry demonstrated a statistically significant increase of more than 85% in the β -catenin protein level in the retinas of the *Ctnnb1^{fl/fl}* animals following NMDA treatment compared to that of the PBS-injected contralateral eyes (1.87 ± 0.31 ; $p < 0.05$; Figure 5B), whereas in the retinas of the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice, no difference between the PBS- (1.24 ± 0.21) and NMDA- (1.08 ± 0.19 ; Figure 5B) treated eyes could be observed. Overall, the results strongly suggest that excitotoxic damage of the RGCs leads to enhanced expression of β -catenin in Müller cells.

Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells after acute damage of RGCs but also its loss in undamaged retina enhances gliosis reaction: To analyze whether Müller cell gliosis is mediated via enhanced Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells, quantitative real-time RT-PCR for *Gfap* on retinal RNA from eyes of 8-week-old mice that had been injected with NMDA or PBS after tamoxifen treatment was performed. In the *Ctnnb1^{fl/fl}* mice, a moderate but statistically significant induction in the mRNA level for *Gfap* (1.7 ± 0.3 ; $p < 0.05$) was detected following NMDA treatment compared to the PBS-injected contralateral eyes (Figure 5C). Intriguingly, following PBS injection of *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice, a statistically significant increase in *Gfap* (2.5 ± 0.6 ; $p < 0.05$) was observed compared to the PBS-injected *Ctnnb1^{fl/fl}*

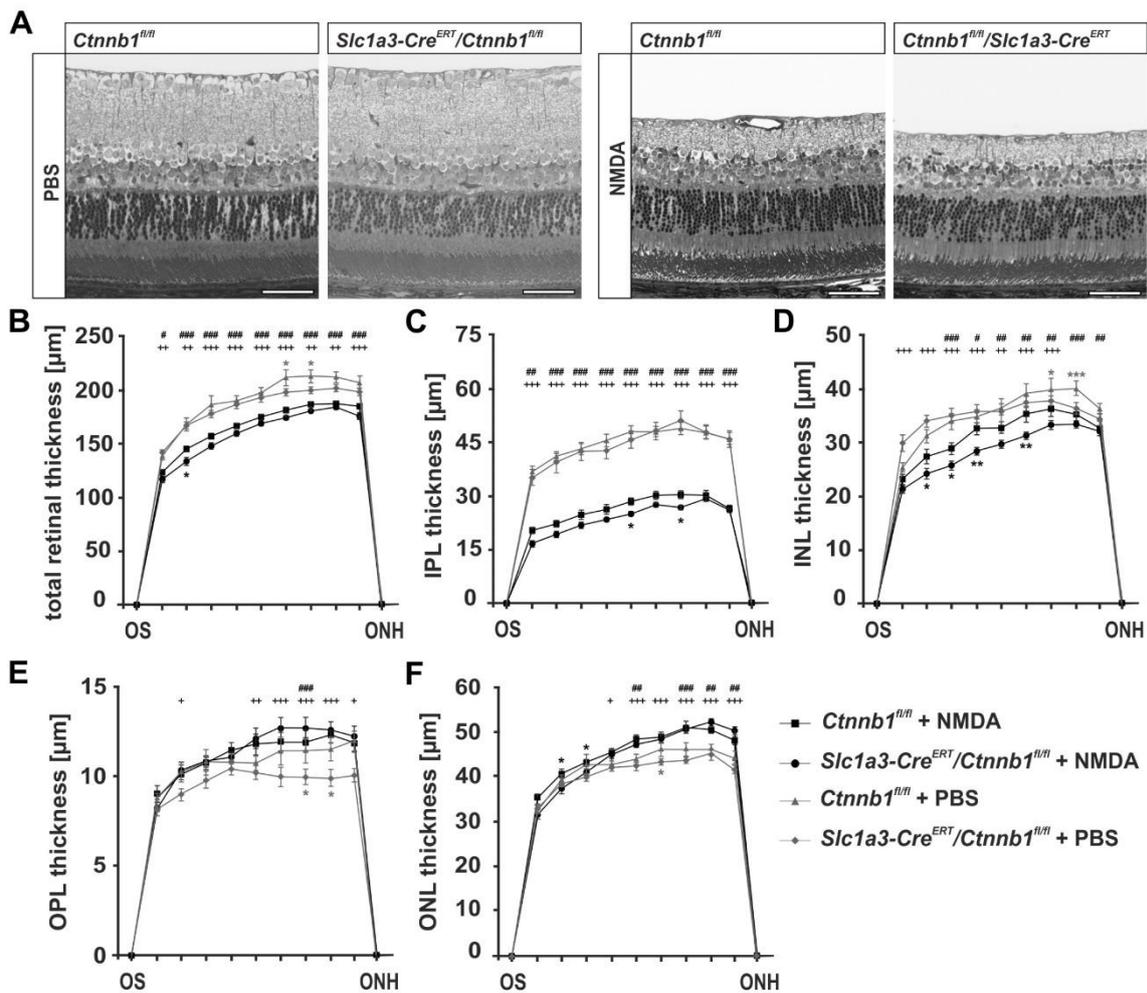


Figure 3. Deficiency of Wnt/β-catenin signaling in Müller cells enhances degeneration of the inner retina following acute RGC damage. **A:** Representative sagittal sections of retinas from 10-week-old *Ctnnb1^{fl/fl}* and *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice 2 weeks after injection of N-methyl-D-aspartate (NMDA) or PBS into the vitreous cavity and treatment with tamoxifen at the age of 6 weeks. Scale bars, 50 μm. **B–F:** For quantification, the thickness of the **(B)** total retina, **(C)** the inner plexiform layer (IPL), **(D)** the inner nuclear layer (INL), **(E)** the outer plexiform layer (OPL), and **(F)** the outer nuclear layer (ONL) of 10-week-old *Ctnnb1^{fl/fl}* and *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice 2 weeks after injection of PBS or NMDA into the vitreous cavity and treatment with tamoxifen 4 weeks before was measured between every retinal tenth and plotted as a spider diagram. OS, ora serrata; ONH, optic nerve head; mean ± standard error of the mean, SEM; n≥8; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; # indicates statistical significance between the two genotypes with the same treatment; # (*Ctnnb1^{fl/fl}*) and + (*Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}*) indicate statistical significance between NMDA and PBS-injected eyes.

littermates. However, treatment of the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice with NMDA did not lead to a further increase in the retinal Gfap mRNA level, suggesting that Wnt/β-catenin signaling in Müller cells might be required for gliosis reaction after acute excitotoxic damage of retinal neurons.

Wnt/β-catenin signaling in Müller cells induces expression of protective factors following acute excitotoxic damage of RGCs: In previous studies, we showed that intravitreal injection of NMDA leads to increased expression of neuroprotective factors, such as Lif in the retina [10,12]. We wondered whether the induction of protective factors is mediated by

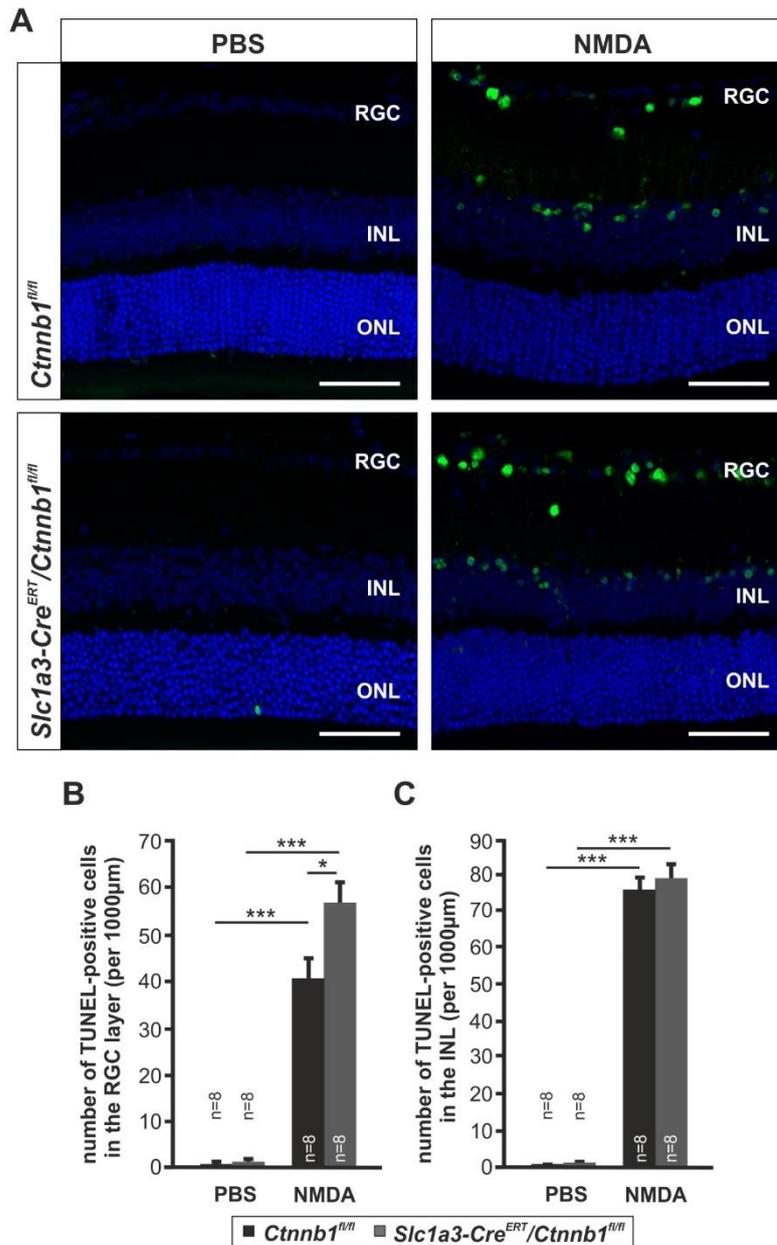


Figure 4. Wnt/ β -catenin deficiency in Müller cells amplifies apoptosis of retinal neurons. **A**: Representative terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining of 8-week-old, tamoxifen-treated *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice and *Ctnnb1^{fl/fl}* controls 24 h after injection of 3 μ l of N-methyl-D-aspartate (NMDA; 10 mM) in one eye and PBS in the contralateral eye. In the retinas of the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice, statistically significantly more TUNEL-positive cells in the retinal ganglion cell (RGC) layer were observed compared to those in the *Ctnnb1^{fl/fl}* controls. Intriguingly, no difference in the number of apoptotic cells was detected in the inner nuclear layer (INL) between the *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* and *Ctnnb1^{fl/fl}* animals. Magnification bars, 50 μ m; ONL, outer nuclear layer. **B**, **C**: The number of TUNEL-positive cells in the RGC layer (**B**) and the INL (**C**) was quantified and correlated to the retinal length (mean \pm standard error of the mean, SEM; * p <0.05; *** p <0.001).

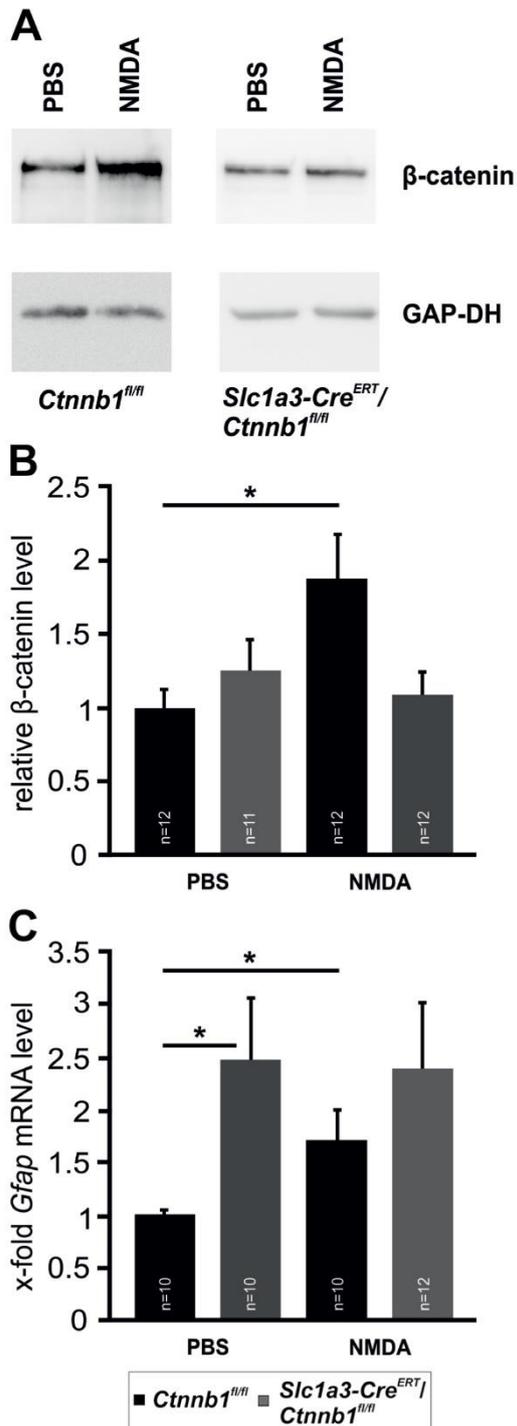


Figure 5. Acute damage of retinal ganglion cells enhances β -catenin expression in Müller cells and gliosis reaction via Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells. **A, B**: Western blot analyses (**A**) and densitometry (**B**) for β -catenin from retinal proteins of 8-week-old *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice and *Ctnnb1^{fl/fl}* controls 24 h after injection of N-methyl-D-aspartate (NMDA) or PBS into the vitreous cavity and 2 weeks after treatment with tamoxifen (mean \pm standard error of the mean, SEM; * $p < 0.05$). **C**: Quantitative real-time RT-PCR for Gfap in RNA from retinas of 8-week-old *Slc1a3-Cre^{ERT}/Ctnnb1^{fl/fl}* mice and *Ctnnb1^{fl/fl}* controls 7 h after injection of 3 μ l of NMDA (10 mM) or PBS into the vitreous cavity and tamoxifen treatment 2 weeks before (mean \pm SEM; * $p < 0.05$).

activation of Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells. To this end, quantitative real-time RT-PCR on retinal RNA from eyes of 8-week-old mice that had been injected with NMDA or PBS after tamoxifen treatment was performed.

Following injection of NMDA into the vitreous body of the *Ctnnb1^{fl/fl}* mice, the mRNA expression levels for *Lif* (37.45 ± 6.430 ; $p < 0.001$), *Fgf2* (2.22 ± 0.290 ; $p < 0.05$), and *Edn2* (1.59 ± 0.18 ; $p < 0.05$) were statistically significantly enhanced compared to those of the PBS-treated eyes, although the strength of the mRNA induction was different (Figure 6A-C). However, in NMDA-treated retinas from mice with a deletion of Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells, the mRNA level for *Lif* (16.94 ± 3.720) was statistically significantly lower ($p < 0.05$; Figure 6A) compared to that of the *Ctnnb1^{fl/fl}* controls. In addition, there was a trend toward lower levels of *Fgf2* (1.61 ± 0.16) and *Edn2* (1.39 ± 0.18) although it was not statistically significant (Figure 6B,C). Overall, the observations strongly suggested that excitotoxic damage of RGCs enhances Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells, which, in turn, induces the expression of neuroprotective factors, such as *Lif*.

DISCUSSION

We concluded that endogenous Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells has the distinct potential to protect RGCs from excitotoxic damage, an effect that is most likely mediated via enhanced expression of neuroprotective factors. Our conclusions are based on (1) the observation that acute excitotoxic damage leads to activation of the Wnt/ β -catenin pathway, (2) the decrease in optic nerve axons and the increase in TUNEL-positive cells in the RGC layer following excitotoxic damage in mice with a β -catenin deficiency in Müller cells, and (3) the finding that the expression of neuroprotective factors after excitotoxic damage is substantially decreased in mice with a β -catenin deficiency in Müller cells.

The effects of endogenous Wnt/ β -catenin signaling were analyzed in a mouse model that expresses tamoxifen-dependent Cre-recombinase under the control of the *Slc1a3* promoter fragment. The *Slc1a3* gene encodes for the high-affinity glutamate transporter GLAST, which was located with immunohistochemistry in retinal Müller cells and astrocytes [21-23]. In line with these reports, we found radially oriented staining in the reporter mice, which span from the inner to the outer limiting membranes of the retina and had triangular protrusions in the nerve fiber layer corresponding to the end feet of Müller cells. However, no obvious β -galactosidase staining for astrocytes was detected in the RGC layer, in which retinal astrocytes are located. Although we cannot rule out tamoxifen-induced activation

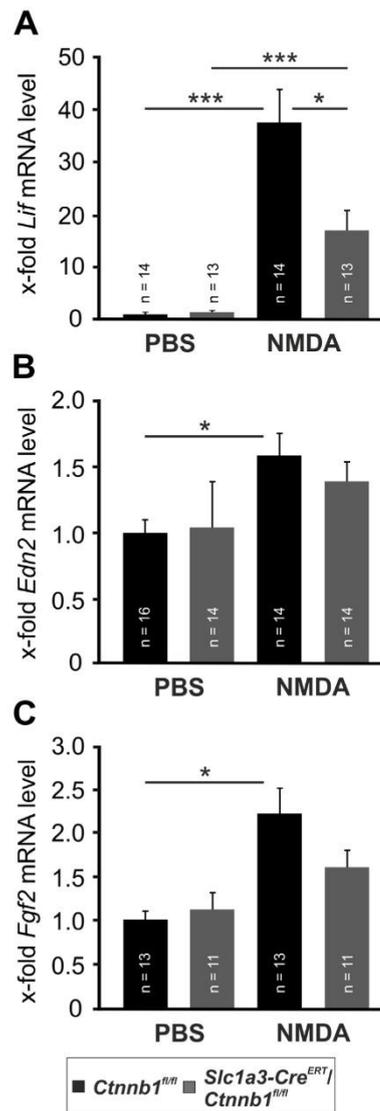


Figure 6. Acute damage of RGCs induces the expression of *Lif* via Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells. Quantitative real-time RT-PCR for (A) *Lif*, (B) *Edn2*, and (C) *Fgf2* in RNA from retinas of 8-week-old *Slc1a3-Cre^{ERT2}/*Ctnnb1^{fl/fl}** mice and *Ctnnb1^{fl/fl}* controls 7 h after injection of 3 μ l of N-methyl-D-aspartate (NMDA; 10 mM) or PBS into the vitreous cavity and tamoxifen treatment 2 weeks before (mean \pm standard error of the mean, SEM; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

of the recombinase in a few astrocytes, several studies clearly demonstrated expression of Cre-recombinase in Müller cells of *Sclt3-CRE^{ERT}* mice [24-26]. The observed discrepancy between the endogenous and transgenic *Sclt3* promoter activity could be caused by the use of a *Sclt3* promoter fragment from a BAC clone in the *Sclt3-CRE^{ERT}* mice [27]. The protective effects of endogenous Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells were investigated following induction of NMDA-mediated excitotoxic damage of retinal neurons. After binding to NMDA-type glutamate receptors, NMDA induces apoptosis via an excessive Ca^{2+} influx [28]. In the retina, RGCs and amacrine cells are known to express these receptors and thus, are susceptible to excitotoxic damage [28], which is in accordance with our observations of TUNEL-positive cells in the RGCs and the INL. Although we found no obvious retinal phenotype or a loss of Müller cells in mice with a targeted disruption of Wnt/ β -catenin signaling in these cells following tamoxifen treatment and PBS injection 4 and 2 weeks before analysis, respectively, the thickness of the total retina, the INL, and the ONL showed a moderate but statistically significant reduction in the central retina compared to those of the control mice. Several studies that examined light-mediated retinal degeneration reported enhanced damage of the central retina, which occurs because the lens focuses light on this region of the eye [29-31]. As we found the reduced retinal thickness of Wnt/ β -catenin deficient mice only in the central retinal areas, but NMDA-mediated damage either occurred in the peripheral retina or was uniformly distributed, it remains to be determined whether endogenous Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells mediates protective effects on retinal neurons against damage induced by ambient light of the animal facility. Further on, in the central retinas of the NMDA-treated mice from both genotypes the ONL was thicker compared to that in the PBS-injected contralateral eyes. As following NMDA treatment the expression of protective factors is enhanced in the retina, it is tempting to speculate that these factors also protect photoreceptors against light-induced degeneration.

In several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer or Parkinson disease, reduced Wnt/ β -catenin signaling is associated with pathological progression [32,33]. In ocular disorders, enhanced expression of inhibitors of Wnt/ β -catenin signaling has been observed in eyes of patients with glaucoma, retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, and diabetic macular edema, suggesting that impaired Wnt/ β -catenin signaling might be involved in retinal degeneration [34-38]. In line with previous findings that enhanced Wnt/ β -catenin signaling mediates protective effects on retinal neurons [10-13], we observed a reduced number of RGC axons and an increased number of apoptotic

cells in the RGC layer in mice with a β -catenin deficiency in Müller cells. With light microscopy, approximately 32,500 RGC axons were detected in optic nerves from both genotypes following PBS injection, which were obviously lower than that observed by Williams and colleagues in a previous report of various mouse strains with electron microscopy [39]. This discrepancy might be explained by the use of mice in the C57BL/6J genetic background, which are known to have a smaller number of RGCs, and by the use of light microscopy for readout, which is less sensitive than electron microscopy. However, no effect of Wnt/ β -catenin signaling on NMDA-damaged neurons in the INL was detected, in which amacrine cells are predominantly located. As amacrine cells were previously described as much more susceptible to excitotoxic damage than RGCs [40,41], we assume that the administered dose of NMDA may be excessive and covers potential neuroprotective effects of Wnt/ β -catenin signaling on amacrine cells. In contrast, with light microscopy 2 weeks after NMDA injection a moderate reduction in the IPL and the INL was observed in the mice with a Wnt/ β -catenin deficiency in Müller cells compared to the control animals. Two weeks after NMDA-induced damage, not only a marked loss of RGCs and amacrine cells were reported but also a moderate reduction in bipolar cells [42] suggesting that the acute degeneration of RGCs and amacrine cells could lead to secondary degeneration of bipolar cells. As in retinas with normal Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells the number of surviving RGCs is increased, and the expression of neuroprotective factors is enhanced, it is tempting to speculate that this scenario could protect retinal neurons in the INL.

A major cell type mediating potential neuroprotective effects are Müller cells. The important role of Müller cells for the maintenance of retinal homeostasis was pointed out in a transgenic mouse model with inducible ablation of Müller cells. Following selective ablation of Müller cells, degeneration of photoreceptors and enhanced retinal Wnt/ β -catenin signaling were observed [19,43]. In line with these reports, the loss of Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells leads to enhanced expression of GFAP, strongly suggesting that Wnt/ β -catenin signaling in these cells is required for normal retinal function. In addition, in retinas of mice with targeted disruption of Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells, no further expression of *Gfap* mRNA was observed following NMDA treatment compared to control littermates. However, the role of Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells for damaged retinal neurons has not been investigated thus far. RGC damage leads to reactive gliosis of Müller cells, which enables Müller cells, depending on the kind of RGC damage and its duration, to mediate protective or detrimental effects. For instance, following NMDA-induced damage of

RGCs, enhanced NF κ B-mediated expression of TNF- α was observed, which can further enhance the susceptibility of RGCs to excitotoxic damage via increased insertion of Ca²⁺-permeable AMPA receptors [44,45]. However, for reactive Müller cells, increased expression of protective factors, such as Lif, Cntf, or Edn2, following damage of RGCs has been described as well [10,46,47], which is in line with the observation of reduced *Lif* expression in mice with the deletion of Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells. Further on, following laser damage, retinal Wnt/ β -catenin signaling was enhanced, and the increased retinal activity of Wnt/ β -catenin signaling was shown to be associated with the more pronounced gliosis reaction of Müller cells [10,48], which is in line with the blocked induction of *Gfap* mRNA after NMDA treatment of mice with the targeted deletion of Wnt/ β -catenin signaling in Müller cells. In the present study, we demonstrated that the damage-induced activation of Wnt/ β -catenin signaling in the retina occurs predominantly in Müller cells, which, in turn, leads to the increased expression of neuroprotective factors. Overall, we identified the Wnt/ β -catenin pathway in Müller cells as part of a neuroprotective network in the retina to promote RGC survival after acute damage, an effect that involves enhanced expression of protective factors.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Research Unit FOR 1075, TP 7). The authors would like to thank Silvia Babel, Angelika Pach, Margit Schimmel, Elke Stauber and Katja Widholzer for their excellent technical assistance. The authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

- MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17:9-26. [PMID: 19619488].
- Ye X, Smallwood P, Nathans J. Expression of the Norrie disease gene (*Ndp*) in developing and adult mouse eye, ear, and brain. *Gene Expr Patterns* 2011; 11:151-5. [PMID: 21055480].
- Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, Kelley MW, Jiang L, Tasman W, Zhang K, Nathans J. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 2004; 116:883-95. [PMID: 15035989].
- Ke J, Harikumar KG, Erice C, Chen C, Gu X, Wang L, Parker N, Cheng Z, Xu W, Williams BO, Melcher K, Miller LJ, Xu HE. Structure and function of Norrin in assembly and activation of a Frizzled 4-Lrp5/6 complex. *Genes Dev* 2013; 27:2305-19. [PMID: 24186977].
- Deng C, Reddy P, Cheng Y, Luo CW, Hsiao CL, Hsueh AJ. Multi-functional norrin is a ligand for the LGR4 receptor. *J Cell Sci* 2013; 126:2060-8. [PMID: 23444378].
- Richter M, Gottanka J, May CA, Welge-Lüssen U, Berger W, Lutjen-Drecoll E. Retinal vasculature changes in Norrie disease mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:2450-7. [PMID: 9804153].
- Ohlmann A, Scholz M, Goldwisch A, Chauhan BK, Hudl K, Ohlmann AV, Zrenner E, Berger W, Cvekl A, Seeliger MW, Tamm ER. Ectopic norrin induces growth of ocular capillaries and restores normal retinal angiogenesis in Norrie disease mutant mice. *J Neurosci* 2005; 25:1701-10. [PMID: 15716406].
- Wang Y, Rattner A, Zhou Y, Williams J, Smallwood PM, Nathans J. Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Cell* 2012; 151:1332-44. [PMID: 23217714].
- Ohlmann A, Seitz R, Braunger B, Seitz D, Bosl MR, Tamm ER. Norrin promotes vascular regrowth after oxygen-induced retinal vessel loss and suppresses retinopathy in mice. *J Neurosci* 2010; 30:183-93. [PMID: 20053900].
- Seitz R, Hackl S, Seibuchner T, Tamm ER, Ohlmann A. Norrin mediates neuroprotective effects on retinal ganglion cells via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the induction of neuroprotective growth factors in Muller cells. *J Neurosci* 2010; 30:5998-6010. [PMID: 20427659].
- Braunger BM, Ohlmann A, Koch M, Tanimoto N, Volz C, Yang Y, Bosl MR, Cvekl A, Jagle H, Seeliger MW, Tamm ER. Constitutive overexpression of Norrin activates Wnt/ β -catenin and endothelin-2 signaling to protect photoreceptors from light damage. *Neurobiol Dis* 2013; 50:1-12. [PMID: 23009755].
- Kassumeh S, Leopold S, Fuchshofer R, Thomas CN, Priglinger SG, Tamm ER, Ohlmann A. Norrin Protects Retinal Ganglion Cells from Excitotoxic Damage via the Induction of Leukemia Inhibitory Factor. *Cells* 2020; 9:277-[PMID: 31979254].
- Leopold SA, Zeilbeck LF, Weber G, Seitz R, Bosl MR, Jagle H, Fuchshofer R, Tamm ER, Ohlmann A. Norrin protects optic nerve axons from degeneration in a mouse model of glaucoma. *Sci Rep* 2017; 7:14274-[PMID: 29079753].
- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A. Cellular signaling and factors involved in Muller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res* 2009; 28:423-51. [PMID: 19660572].
- Braut V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, Sommer L, Boussadia O, Kemler R. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* 2001; 128:1253-64. [PMID: 11262227].
- Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 1999; 21:70-1. [PMID: 9916792].

17. Anderson MG, Libby RT, Gould DB, Smith RS, John SW. High-dose radiation with bone marrow transfer prevents neurodegeneration in an inherited glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:4566-71. [PMID: 15758074].
18. Forkwa TK, Neumann ID, Tamm ER, Ohlmann A, Reber SO. Short-term psychosocial stress protects photoreceptors from damage via corticosterone-mediated activation of the AKT pathway. *Exp Neurol* 2014; 252:28-36. [PMID: 24269865].
19. Shen W, Fruttiger M, Zhu L, Chung SH, Barnett NL, Kirk JK, Lee S, Coorey NJ, Killingsworth M, Sherman LS, Gillies MC. Conditional Muller cell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. *J Neurosci* 2012; 32:15715-27. [PMID: 23136411].
20. Li Y, Schlamp CL, Nickells RW. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:1004-8. [PMID: 10102300].
21. Derouiche A, Rauen T. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 1995; 42:131-43. [PMID: 8531222].
22. Lehre KP, Davanger S, Danbolt NC. Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina. *Brain Res* 1997; 744:129-37. [PMID: 9030421].
23. Rauen T, Rothstein JD, Wassle H. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res* 1996; 286:325-36. [PMID: 8929335].
24. Mori T, Tanaka K, Buffo A, Wurst W, Kuhn R, Gotz M. Inducible gene deletion in astroglia and radial glia—a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* 2006; 54:21-34. [PMID: 16652340].
25. Rattner A, Wang Y, Zhou Y, Williams J, Nathans J. The role of the hypoxia response in shaping retinal vascular development in the absence of Norrin/Frizzled4 signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55:8614-25. [PMID: 25414188].
26. de Melo J, Miki K, Rattner A, Smallwood P, Zibetti C, Hirokawa K, Monuki ES, Campochiaro PA, Blackshaw S. Injury-independent induction of reactive gliosis in retina by loss of function of the LIM homeodomain transcription factor Lhx2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:4657-62. [PMID: 22393024].
27. Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE. NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* 2010; 68:668-81. [PMID: 21092857].
28. Shen Y, Zhu LJ, Liu SS, Zhou SY, Luo JH. Interleukin-2 inhibits NMDA receptor-mediated currents directly and may differentially affect subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351:449-54. [PMID: 17069761].
29. Natoli R, Jiao H, Barnett NL, Fernando N, Valter K, Provis JM, Rutar M. A model of progressive photo-oxidative degeneration and inflammation in the pigmented C57BL/6J mouse retina. *Exp Eye Res* 2016; 147:114-27. [PMID: 27155143].
30. Naash ML, Peachey NS, Li ZY, Gryczan CC, Goto Y, Blanks J, Milam AH, Ripps H. Light-induced acceleration of photoreceptor degeneration in transgenic mice expressing mutant rhodopsin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:775-82. [PMID: 8603862].
31. Lumayag S, Haldin CE, Corbett NJ, Wahlin KJ, Cowan C, Turturro S, Larsen PE, Kovacs B, Witmer PD, Valle D, Zack DJ, Nicholson DA, Xu S. Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:E507-16. [PMID: 23341629].
32. Arnes M, Casas Tinto S. Aberrant Wnt signaling: a special focus in CNS diseases. *J Neurogenet* 2017; 31:216-22. [PMID: 28635355].
33. L'Episcopo F, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, Cossetti C, D'Adamo P, Zardini E, Andreoni L, Ihekwaba AE, Serra PA, Franciotta D, Martino G, Pluchino S, Marchetti B. Reactive astrocytes and Wnt/ β -catenin signaling link nigrostriatal injury to repair in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2011; 41:508-27. [PMID: 21056667].
34. Jones SE, Jomary C, Grist J, Stewart HJ, Neal MJ. Altered expression of secreted frizzled-related protein-2 in retinitis pigmentosa retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1297-301. [PMID: 10798643].
35. Jones SE, Jomary C, Grist J, Stewart HJ, Neal MJ. Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration. *Neuroreport* 2000; 11:3963-7. [PMID: 11192610].
36. Park KH, Choi AJ, Yoon J, Lim D, Woo SJ, Park SJ, Kim HC, Chung H. Wnt modulators in the aqueous humor are associated with outer retinal damage severity in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55:522-30. [PMID: 25034605].
37. Ji B, Lim D, Kim J, Kim HC, Chung H. Increased Levels of Dickkopf 3 in the Aqueous Humor of Patients With Diabetic Macular Edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57:2296-304. [PMID: 27127928].
38. Wang WH, McNatt LG, Pang IH, Millar JC, Hellberg PE, Hellberg MH, Steely HT, Rubin JS, Fingert JH, Sheffield VC, Stone EM, Clark AF. Increased expression of the WNT antagonist sFRP-1 in glaucoma elevates intraocular pressure. *J Clin Invest* 2008; 118:1056-64. [PMID: 18274669].
39. Williams RW, Strom RC, Rice DS, Goldowitz D. Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *J Neurosci* 1996; 16:7193-205. [PMID: 8929428].
40. Luo X, Baba A, Matsuda T, Romano C. Susceptibilities to and mechanisms of excitotoxic cell death of adult mouse inner retinal neurons in dissociated culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:4576-82. [PMID: 15557470].
41. Ullian EM, Barkis WB, Chen S, Diamond JS, Barres BA. Invulnerability of retinal ganglion cells to NMDA excitotoxicity. *Mol Cell Neurosci* 2004; 26:544-57. [PMID: 15276156].

42. Kuehn S, Rodust C, Stute G, Grotegut P, Meissner W, Reinehr S, Dick HB, Joachim SC. Concentration-Dependent Inner Retina Layer Damage and Optic Nerve Degeneration in a NMDA Model. *J Mol Neurosci* 2017; 63:283-99. [PMID: 28963708].
43. Zhu L, Shen W, Zhang T, Wang Y, Bahrami B, Zhou F, Gillies MC. Characterization of canonical Wnt signalling changes after induced disruption of Muller cell in murine retina. *Exp Eye Res* 2018; 175:173-80. [PMID: 29913166].
44. Lebrun-Julien F, Duplan L, Pernet V, Osswald I, Sapieha P, Bourgeois P, Dickson K, Bowie D, Barker PA, Di Polo A. Excitotoxic death of retinal neurons in vivo occurs via a non-cell-autonomous mechanism. *J Neurosci* 2009; 29:5536-45. [PMID: 19403821].
45. Lebrun-Julien F, Morquette B, Douillette A, Saragovi HU, Di Polo A. Inhibition of p75(NTR) in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci* 2009; 40:410-20. [PMID: 19146958].
46. Honjo M, Tanihara H, Kido N, Inatani M, Okazaki K, Honda Y. Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Muller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:552-60. [PMID: 10670488].
47. Sarup V, Patil K, Sharma SC. Ciliary neurotrophic factor and its receptors are differentially expressed in the optic nerve transected adult rat retina. *Brain Res* 2004; 1013:152-8. [PMID: 15193523].
48. Liu B, Hunter DJ, Rooker S, Chan A, Paulus YM, Leucht P, Nusse Y, Nomoto H, Helms JA. Wnt signaling promotes Muller cell proliferation and survival after injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54:444-53. [PMID: 23154457].

Articles are provided courtesy of Emory University and the Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, P.R. China. The print version of this article was created on 5 March 2020. This reflects all typographical corrections and errata to the article through that date. Details of any changes may be found in the online version of the article.

6.6. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. Andreas Ohlmann für das wissenschaftlich aktuelle und spannende Dissertationsthema, die exzellente Betreuung und die Möglichkeit zur Publikation. Weiterhin danke ich für die stets hilfsbereite Unterstützung bei Fragen und Problemen sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Ernst R. Tamm für die Arbeitsmöglichkeit und die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl bedanken.

Ferner bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für die kollegiale Zusammenarbeit und Unterstützung, insbesondere bei Silvia Babl, Angelika Pach, Margit Schimmel und Elke Stauber für die Hilfe bei histologischen und molekularbiologischen Arbeiten und die technische Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des gesamten Studiums und der Promotion unterstützten und stets an mich geglaubt haben.

Meinem Bruder und seiner Frau, die nicht nur verstehen mir bei Problemen tatkräftig zur Seite zu stehen, sondern mich auch von diesen abzulenken und mich aufzuheitern.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern für all die Geduld, Liebe und Unterstützung in sämtlichen Lebenslagen. Ohne Euch wäre mein Studium und diese Promotion nicht möglich gewesen.

6.7. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit durch Herrn PD Dr. Andreas Ohlmann angeregt wurde und durch ihn die Ausarbeitung dieser Arbeit überwacht wurde.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 19.11.2020

Fabian Raphael Bösl