

DISS. ETH No. 26744

**THE AFFERENT VISUAL PATHWAY AS A MODEL FOR  
ASSESSING NEURODEGENERATION IN EXPERIMENTAL  
AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS – A TRANSLATIONAL  
OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY (OCT) APPROACH**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**PRAVEENA MANOGARAN**

M.Sc. Experimental Medicine, University of British Columbia

B.Sc. Cognitive Science, University of British Columbia

born on 01.07.1991

citizen of Canada

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Sebastian Kozerke

Prof. Dr. Sven Schippling

Prof. Dr. Markus Rudin

Prof. Dr. Sebastian Wolf

2020



# SUMMARY

Multiple sclerosis is an inflammatory and neurodegenerative autoimmune disease of the central nervous system that presents with perivenous lymphocytic infiltration, focal demyelination and neuro-axonal degeneration. Neuro-axonal injury is a key contributor to non-reversible long-term disability in multiple sclerosis, however, the exact mechanisms underlying neurodegeneration as well as the sequence of events leading to structural and functional impairment are not yet fully understood. Visual impairment, including optic neuritis, is a common and early clinical feature of multiple sclerosis, with up to 75% of patients experiencing some form of visual disability during their disease course. Frequently, episodes of multiple sclerosis related acute optic neuritis are followed by structural retinal damage that can be quantified *in vivo* using optical coherence tomography (OCT). Reduced retinal peripapillary nerve fibre layer and macular ganglion cell layer thickness assessed by OCT have been shown to correlate strongly with functional visual impairment and- on a broader level - brain atrophy among multiple sclerosis patients. Similar to findings in human studies, alterations in the retina including the retinal ganglion cells and optic nerve have been reported in a mouse model of multiple sclerosis called experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). However, the exact biological basis and temporal dynamics behind the retinal abnormalities observed clinically and in OCT studies, including the complex interplay between inflammatory and degenerative mechanisms have not yet been fully elucidated. EAE can be used to investigate structural damage in the afferent visual pathway, providing a unique model for assessing neurodegenerative changes and their functional consequences. In addition, it has the potential to generate deeper insight into basic mechanisms underlying structural tissue damage in multiple sclerosis.

To assess visual pathway damage in EAE, an OCT and magnetic resonance imaging platform was developed and established. OCT detected inner retinal layer thickness changes in EAE mice, resembles what is observed in human multiple sclerosis related acute papillitis. Where an initial phase of swelling was associated with inner retinal layer thickening, followed by a significant decrease in thickness over time, once the swelling had subsided, likely representative of neuro-axonal pathology. Diffusion tensor imaging measurements of the optic nerve and tract provided complementary results suggestive of demyelination and axonal damage in the visual pathway. OCT retinal thickness also correlated significantly with diffusion tensor imaging measurements providing support for retrograde and anterograde degeneration in the visual pathway following optic neuritis. Immunofluorescence analysis contributed further evidence for a strong inflammatory response in the retina and optic nerve in EAE mice at the final observational time point. A combination of both OCT and magnetic resonance

imaging provided a reliable and sensitive quantitative tool to assess structural damage in the visual pathway and the temporal sequence of neurodegeneration in EAE.

To further characterize the biological mechanisms of visual pathway impairment in EAE and to unravel the morphological correlates of retinal thickness changes, a longitudinal OCT study including a systematic assessment of retinal and optic nerve immunohistochemical analysis was performed. Signs of inflammatory edema 11 days post immunisation coincided with inner retinal layer thickening, while neuro-axonal degeneration throughout the disease course contributed to inner retinal layer thinning observed at later time points. Early retinal pathology, including axonal transport impairment, was observed prior to cellular infiltration (i.e. T-cells) in the optic nerve 11 days post immunisation. However, the consequences of early retinal damage on OCT-derived measurements were offset by the initial inflammatory edema. Microgliosis and astrocytosis was detected in the retina prior to optic neuritis and persisted until the final observational time point. Early glial activity likely contributed to initial signs of retinal pathology that appeared in the absence of cellular infiltration, suggesting a need for early intervention of optic neuritis. Subsequent to inflammation, Müller cells responded to retinal pathology with possible neuroprotective behaviour. Müller cell reactivity (i.e. aquaporin-4 and glutamine synthetase decrease) occurred after 11 days post immunisation in the inner retinal layer. Future studies should explore Müller cell reactivity and its potentially neuroprotective role. Severe neuro-axonal degeneration was observed in the optic nerve and retina until 33 days post immunisation. Although, retrograde degeneration likely promoted the majority of observed inner retinal layer damage following optic neuritis, primary pathology – possibly due to gliosis – also contributed to inner retinal layer thinning. These results added morphological substrate to the OCT findings, further solidifying this tool as a valuable method to assess visual pathway damage in EAE and multiple sclerosis.

Although, retinal ganglion cell pathology had been observed using immunohistochemical analysis and corroborated inner retinal layer thickness findings, it is still unclear to what extent retinal ganglion cell loss plays a role in OCT observed thinning of the retina. *In vivo* measurements of retinal ganglion cells can provide additional information on the time-course of neuro-axonal pathology within the same mouse, which histology is not capable of. A transgenic mouse line with yellow fluorescent proteins expressed in the *Thy1* sequence (a marker for neurons including retinal ganglion cells) was used in conjunction with green autofluorescence imaging to examine neuro-axonal damage in the retina longitudinally. Feasibility and longitudinal reliability of green autofluorescence imaging to assess yellow fluorescent protein expressing cells was confirmed in healthy transgenic mice. To measure the number of yellow fluorescent protein expressing cells in the retina both a manual and automated cell

counting method was employed. Although the automated cell counting method had high variance compared to the manual cell count, it was significantly faster and allowed for a greater area on the fundus image to be examined, giving a more unbiased representative read-out of neurodegeneration and allowing for spatial statistics. In EAE mice, hyperintensity of the yellow fluorescent signal was observed around the optic nerve head at onset of clinical symptoms, likely coinciding with the occurrence of optic neuritis in this model. Interestingly, this phenomenon dissipated at peak of symptoms in almost all the EAE mice. Green autofluorescence imaging may be a useful way to identify the occurrence of optic neuritis in EAE through the hyperintensity observed at clinical onset of symptoms, especially compared to standard magnetic resonance imaging *or ex-vivo* methods of confirming optic neuritis. Future studies should evaluate the value of this model for assessing retinal ganglion cell death or neuropathology at later stages of experimental optic neuritis. The EAE induced *Thy1* transgenic mouse model would be valuable in future pre-clinical trials that want to target retinal ganglion cells.

Overall, investigating structural anterior visual pathway damage may constitute a unique model for assessing mechanism and temporal sequence of neurodegeneration in multiple sclerosis. The extent and rapid onset of axonal and neuronal damage in this model appears relevant for pre-clinical trials and for testing interventions scaled to multiple sclerosis.

# Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche und degenerative Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die mit perivenöser lymphozytärer Infiltration, fokaler Demyelinisierung und neuro-axonaler Degeneration einhergeht. Neuro-axonale Schädigungsmechanismen tragen maßgeblich zur irreversiblen Langzeitbehinderung der MS bei. Die exakten Mechanismen der Neurodegeneration (zellulär/ molekular) sowie die zeitliche Abfolge der Ereignisse, die zu strukturellen und funktionellen Veränderungen bei der MS führen, sind nicht vollständig geklärt. Einschränkungen der Sehfähigkeit, einschließlich der Optikusneuritis, sind ein häufiges und frühes klinisches Merkmal der Multiplen Sklerose. Bis zu 75% aller Patienten leiden während ihres Krankheitsverlaufs an irgendeiner Form von Sehbehinderung. Häufig führen MS-assoziierte, akute Optikusneuritiden zu strukturellen Netzhautschäden, die *in-vivo* mithilfe der optischen Kohärenztomographie (OCT) quantifiziert werden können. So wurde gezeigt, dass eine Reduktion in der mittels OCT ermittelten Dicke der peripapillären Nervenfaserschicht, sowie der makulären Ganglienzellschicht stark mit einer funktionellen Visuseinschränkung und - auf einer breiteren Ebene - einer Hirnatrophie bei MS-Patienten korreliert. Ähnlich wie in Studien am Menschen wurde in einem Mausmodell der MS, der sogenannten experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis (EAE), über Veränderungen der Netzhaut, inklusive der retinalen Ganglienzellen und des Sehnervs, berichtet. Die genaue biologische Grundlage und zeitliche Dynamik, die den klinischen und in OCT-Studien beobachteten Netzhautveränderungen, einschließlich des komplexen Zusammenspiels zwischen entzündlichen und degenerativen Mechanismen, zugrundeliegt, ist wie beim Menschen nicht vollständig geklärt. Das EAE-Modell kann verwendet werden, um strukturelle Schäden des afferenten visuellen Systems zu untersuchen, und bietet ein einzigartiges Modell zur Beurteilung neurodegenerativer Veränderungen und ihrer funktionellen Konsequenzen. Darüber hinaus hat es das Potenzial, tiefere Einblicke in grundlegende Mechanismen zu gewinnen, die strukturellen Gewebeschäden bei der MS zugrunde liegen.

Um die Schädigung des visuellen Systems bei der EAE genauer zu charakterisieren, wurde eine OCT- und Magnetresonanztomographie-Plattform entwickelt und validiert. Die mittels OCT nachgewiesenen Netzhautveränderungen der inneren Netzhautschichten im EAE-Modell ähnelt sehr stark jenen, die im Rahmen akuter Optikusneuritiden beim Menschen beobachtet werden. Auf eine initiale Phase der Verdickung der inneren Netzhautschichten (entzündlich-ödematöse Schwellung) folgt eine signifikante Abnahme der Dicke im weiteren Verlauf (neuro-axonale Degeneration). Diffusions-Tensor-Bildgebung (DTI) des Sehnervs (Nervus opticus) und der Sehbahn (Tractus

opticus) lieferten komplementäre Ergebnisse, die auf eine Demyelinisierung, und sekundäre axonale Schädigung im visuellen System hinweisen. OCT-Parameter der neuro-axonalen Degeneration korrelierten zudem signifikant mit den DTI-Parametern. Insgesamt stützen die Ergebnisse der multimodalen Bildgebung die Annahme einer sowohl retrograden wie auch anterograden Degeneration im visuellen System nach einer Optikusneuritis. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen lieferten zusätzliche Hinweise auf eine starke inflammatorische Reaktion in der Retina sowie im Sehnerven bei EAE-Mäusen. In Kombination stellen OCT- und Magnetresonanztomographie nicht nur ein zuverlässiges und ausreichend sensibles Instrument zur quantitativen Beurteilung von Strukturschäden im visuellen System im Tiermodell der MS (EAE), sondern erlauben zudem eine Charakterisierung der zeitlichen Abfolge der Neurodegeneration.

Um die zugrunde liegenden biologischen Mechanismen der Schädigung des Sehnervs und der Netzhaut in der EAE genauer zu verstehen und das morphologische Korrelat der eingangs beschriebenen Stadien von Inflammation und (sekundärer) Degeneration detaillierter zu charakterisieren, wurde eine zweite OCT-Längsschnittstudie durchgeführt. Diese umfasste eine extensive immunhistochemische und elektronenmikroskopische Analyse der Netzhaut und des Sehnervs in der EAE. Anzeichen eines entzündlichen Ödems 11 Tage nach Krankheitsinduktion (durch eine Immunisierung mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Peptid 35-55) fielen zeitlich mit einer im OCT nachweisbaren Verdickung der inneren Netzhautschichten zusammen. Die im Verlauf zunehmend prominente neuro-axonale Degeneration spiegelte sich in einer Ausdünnung der inneren Netzhautschichten im OCT zu späteren Untersuchungszeitpunkten. Eine frühe Netzhautpathologie, einschließlich einer Beeinträchtigung des axonalen Transports, wurde 11 Tage nach Immunisierung, allerdings noch vor der zellulären Infiltration der T-Zellen im Sehnerv beobachtet. Eine möglicherweise bereits frühzeitig auftretende strukturelle Netzhautschädigung wurde durch das initial nachweisbare, und im OCT zur Schwellung führende entzündliche Ödem maskiert. Eine Aktivierung von Mikroglia und Astrozytose waren in der Netzhaut bereits vor der eigentlichen entzündlichen Infiltration des Sehnerven erkennbar und blieben bis zum endgültigen Beobachtungszeitpunkt bestehen. Die frühe Gliaaktivierung hat wahrscheinlich zur ersten Phase der Netzhautpathologie, welche bereits vor der zellulären Infiltration der T-Zellen im Sehnerven auftrat, beigetragen - was darauf hindeutet, dass eine therapeutische Intervention bei der Optikusneuritis möglichst frühzeitig erfolgen sollte. Nach einer Entzündung reagierten Müller-Zellen auf eine Netzhautpathologie mit möglichem neuroprotektivem Verhalten. Die Müller-Zellreaktivität (d.h. die Abnahme von Aquaporin-4 und Glutaminsynthetase) trat 11 Tage nach der Immunisierung in der inneren Netzhautschicht auf. Zukünftige Studien sollten die Reaktivität von Müller-Zellen und ihre potenziell neuroprotektive Rolle untersuchen. Bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt, 33 Tage nach der Immunisierung, wurde eine

ausgeprägte neuro-axonale Degeneration von Netzhaut und Sehnerv beobachtet. Obwohl die sekundäre, retrograde Degeneration vermutlich den größten Teil der gesamtbeobachteten Schädigung der inneren Netzhautschicht nach einer Optikusneuritis beitrug, scheint die primäre Komponente - möglicherweise durch die Aktivierung residenter Glia - zusätzlich zur Ausdünnung der inneren Netzhautschicht zu führen.

Obwohl ein Verlust retinaler Ganglienzellen mittels immunhistochemischer Analyse beobachtet werden konnte, ist immer noch unklar, inwieweit der Verlust retinaler Neurone quantitativ tatsächlich eine Rolle bei der im OCT beobachteten Ausdünnung retinaler Schichten spielt. *In-vivo*-Messungen von Ganglienzellen der Netzhaut könnten hier zusätzliche Informationen über den zeitlichen Verlauf der neuro-axonalen Pathologie innerhalb derselben Maus liefern, zu der die Histologie nicht in der Lage ist. Eine transgene Mauslinie mit einem gelb fluoreszierenden Protein (Abkürzung YFP; engl. Yellow fluorescent protein), das in der *Thy1*-Sequenz exprimiert wird (ein Marker für Neuronen, einschließlich Ganglienzellen der Netzhaut), wurde in Verbindung mit einer grünen Autofluoreszenzbildgebung verwendet, um die neuro-axonale Schädigung der Netzhaut longitudinal zu untersuchen. Die Durchführbarkeit und Reliabilität der grünen Autofluoreszenzbildgebung zur Beurteilung von YFP-exprimierenden Zellen wurde bei gesunden transgenen Mäusen nachgewiesen. Um die Anzahl der YFP-exprimierenden Zellen in der Netzhaut zu messen, wurde sowohl ein manuelles als auch ein automatisiertes Zellzählverfahren angewendet. Obwohl das automatisierte Zellzählverfahren im Vergleich zur manuellen Zellzählung eine höhere Varianz aufwies, war es signifikant schneller und ermöglichte die Untersuchung eines größeren Bereichs auf dem Fundusbild, was ein unvoreingenommenes, repräsentatives Auslesen der Neurodegeneration ermöglichte. Bei EAE-Mäusen wurde zu Beginn der klinischen Symptome eine Hyperintensität des YFP-Signals um den Sehnervenkopf beobachtet, die wahrscheinlich mit dem Auftreten einer Optikusneuritis in diesem Modell zusammenfiel. Interessanterweise löste sich dieses Phänomen bei fast allen EAE-Mäusen auf dem Höhepunkt der Symptome auf. Die grüne Autofluoreszenzbildgebung kann ein nützlicher Weg sein, um das Auftreten einer Optikusneuritis bei EAE anhand der beim klinischen Auftreten von Symptomen beobachteten Hyperintensität zu identifizieren, insbesondere im Vergleich zur Standard-Magnetresonanztomographie oder zu *Ex-vivo*-Methoden zur Bestätigung der Optikusneuritis. Zukünftige Studien sollten den Wert dieses Modells für die Beurteilung des Zelltodes der retinalen Ganglienzellen oder der Neuropathologie in späteren Stadien der experimentellen Optikusneuritis bewerten. Das EAE-induzierte transgene *Thy1*-Mausmodell wäre in zukünftigen, präklinischen Studien, die auf Ganglienzellen der Netzhaut abzielen, wertvoll.

Insgesamt stellt die Untersuchung der Schädigung der vorderen Strukturen des visuellen Systems ein einzigartiges Modell für die Beurteilung des Mechanismus und der zeitlichen Abfolge der Neurodegeneration bei MS dar. Das Ausmaß und der rasche Beginn von axonalen und neuronalen Schäden in diesem Modell, scheint für die präklinische Prüfung neuer Interventionen für die Behandlung der MS, relevant zu sein.