

**Aus dem Anatomischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Ralph Lucius)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

*In vitro*-Untersuchungen zum Einfluss des SGLT2-Inhibitors Empagliflozin auf LPS-  
aktivierte Mikroglia vor dem Hintergrund des Morbus Parkinson

**Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von  
Florian Lenz  
aus Lübeck

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Lucius, Anatomisches Institut

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Leypoldt, Institut für Klinische Chemie

Tag der mündlichen Prüfung: 05.09.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 20.06.2022

gez.: Priv.-Doz. Dr. med. habil. Andreas Bayer

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b> .....                               | <b>I</b>  |
| <b>I. Abbildungsverzeichnis</b> .....                         | <b>IV</b> |
| <b>II. Abkürzungsverzeichnis</b> .....                        | <b>V</b>  |
| <b>1. Einleitung</b> .....                                    | <b>1</b>  |
| 1.1. Parkinson-Syndrom.....                                   | 1         |
| 1.1.1. Definition und Klinik.....                             | 1         |
| 1.1.2. Epidemiologie des M. Parkinson.....                    | 1         |
| 1.1.3. Pathogenese des M. Parkinson.....                      | 2         |
| 1.1.4. Therapieoptionen.....                                  | 3         |
| 1.2. Mikroglia und Neuroinflammation.....                     | 4         |
| 1.2.1. Funktion und Aufgaben der Mikroglia.....               | 4         |
| 1.2.2. Mikroglia und Neuroinflammation beim M. Parkinson..... | 7         |
| 1.3. Empagliflozin als möglicher Modulator der Mikroglia..... | 10        |
| 1.3.1. Der SGLT2-Inhibitor Empagliflozin.....                 | 10        |
| 1.3.2. SGLT2-Inhibitoren und Inflammation.....                | 11        |
| 1.4. Fragestellung.....                                       | 13        |
| <b>2. Material</b> .....                                      | <b>14</b> |
| 2.1. Chemikalien.....                                         | 14        |
| 2.2. Testsubstanz.....                                        | 15        |
| 2.3. Lösungen und Puffer.....                                 | 15        |
| 2.3.1. Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia.....    | 15        |
| 2.3.2. MTT-Test.....                                          | 16        |
| 2.3.3. Western-Blot.....                                      | 16        |
| 2.3.4. cDNA-Herstellung.....                                  | 18        |
| 2.3.5. ELISA.....                                             | 18        |
| 2.3.6. Fluoreszenzfärbung.....                                | 19        |
| 2.4. Gebrauchsfertige Kits, Enzyme und Primer.....            | 19        |
| 2.4.1. ELISA.....                                             | 19        |

|           |                                                                                     |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4.2.    | cDNA-Herstellung.....                                                               | 19        |
| 2.4.3.    | Western Blot.....                                                                   | 19        |
| 2.4.4.    | PCR .....                                                                           | 20        |
| 2.5.      | Primärantikörper.....                                                               | 20        |
| 2.6.      | Sekundärantikörper .....                                                            | 20        |
| 2.7.      | Software.....                                                                       | 20        |
| 2.8.      | Verbrauchsmaterialien.....                                                          | 21        |
| 2.9.      | Geräte und Hilfsmittel .....                                                        | 21        |
| <b>3.</b> | <b>Methoden.....</b>                                                                | <b>22</b> |
| 3.1.      | Kultivierung und Isolierung primärer Mikroglia.....                                 | 22        |
| 3.2.      | Aussaat und Stimulation der Mikroglia.....                                          | 23        |
| 3.3.      | MTT-Test .....                                                                      | 24        |
| 3.4.      | Indirekte NO-Messung.....                                                           | 25        |
| 3.5.      | Untersuchungen auf RNA-Ebene.....                                                   | 25        |
| 3.5.1.    | RNA-Isolierung .....                                                                | 25        |
| 3.5.2.    | Reverse Transkription .....                                                         | 26        |
| 3.5.3.    | Quantitative Real-Time-PCR (qPCR).....                                              | 27        |
| 3.6.      | Untersuchungen auf Proteinebene.....                                                | 28        |
| 3.6.1.    | Western Blot.....                                                                   | 28        |
| 3.6.2.    | Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis vom Transkriptionsfaktor NFκB.....             | 31        |
| 3.6.3.    | Sandwich-ELISA.....                                                                 | 32        |
| 3.7.      | Statistische Auswertung .....                                                       | 33        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse .....</b>                                                             | <b>34</b> |
| 4.1.      | Einfluss von Empagliflozin auf das Zellüberleben der Mikroglia.....                 | 34        |
| 4.2.      | Einfluss von Empagliflozin auf die Radikalbildung.....                              | 35        |
| 4.2.1.    | NO-Freisetzung .....                                                                | 35        |
| 4.2.2.    | iNOS-mRNA-Synthese .....                                                            | 36        |
| 4.3.      | Einfluss von Empagliflozin auf die Genexpression proinflammatorischer Zytokine..... | 37        |
| 4.3.1.    | IL-6-mRNA-Synthese .....                                                            | 37        |
| 4.3.2.    | TNF-α-mRNA-Synthese .....                                                           | 39        |

|           |                                                                                                                                    |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.3.    | IL-1 $\beta$ -mRNA-Synthese .....                                                                                                  | 40        |
| 4.4.      | Einfluss von Empagliflozin auf die Zytokin-Freisetzung aus Mikroglia .....                                                         | 41        |
| 4.4.1.    | IL-6-Freisetzung .....                                                                                                             | 42        |
| 4.4.2.    | TNF- $\alpha$ -Freisetzung .....                                                                                                   | 42        |
| 4.4.3.    | IL-10-Freisetzung .....                                                                                                            | 43        |
| 4.5.      | Untersuchung potentieller Signalwege von Empagliflozin .....                                                                       | 44        |
| 4.5.1.    | Beeinflussung des ERK <sub>1/2</sub> -Signalweges durch Empagliflozin .....                                                        | 44        |
| 4.5.2.    | Beeinflussung des NF $\kappa$ B-Signalweges durch Empagliflozin .....                                                              | 46        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion .....</b>                                                                                                            | <b>49</b> |
| 5.1.      | Einfluss von Empagliflozin auf die Radikalbildung .....                                                                            | 49        |
| 5.2.      | Einfluss von Empagliflozin auf die Expression und Freisetzung inflammatorischer Zytokine<br>.....                                  | 51        |
| 5.2.1.    | IL-6 .....                                                                                                                         | 51        |
| 5.2.2.    | IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ .....                                                                                               | 53        |
| 5.2.3.    | IL-10 .....                                                                                                                        | 55        |
| 5.3.      | Einfluss von Empagliflozin auf ausgewählte Signalwege .....                                                                        | 56        |
| 5.4.      | Wie interagiert Empagliflozin mit den Mikroglia? .....                                                                             | 58        |
| 5.5.      | Bewertung der Ergebnisse .....                                                                                                     | 61        |
| 5.5.1.    | Das <i>in vitro</i> -Modell als vereinfachte Betrachtung der Mikroglia .....                                                       | 61        |
| 5.5.2.    | Wie geeignet ist Empagliflozin zur Anwendung als Mikroglia-Modulator beim<br>M. Parkinson? Abschließendes Fazit und Ausblick ..... | 62        |
| <b>6.</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>                                                                                                       | <b>66</b> |
| <b>7.</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                                                                                                  | <b>68</b> |
| <b>8.</b> | <b>Erklärung .....</b>                                                                                                             | <b>85</b> |
| <b>9.</b> | <b>Danksagung .....</b>                                                                                                            | <b>86</b> |

## I. Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 4.1.: Einfluss von Empagliflozin auf das Zellüberleben der Mikroglia                                      | 34 |
| Abbildung 4.2.: Einfluss von Empagliflozin auf die NO-Freisetzung nach 24 Stunden                                   | 35 |
| Abbildung 4.3.: Einfluss von Empagliflozin auf die iNOS-mRNA-Expression<br>in Mikroglia nach drei Stunden           | 36 |
| Abbildung 4.4.: Einfluss von Empagliflozin auf die iNOS-mRNA-Expression<br>in Mikroglia nach 24 Stunden             | 37 |
| Abbildung 4.5.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-6-mRNA-Expression<br>in Mikroglia nach drei Stunden           | 38 |
| Abbildung 4.6.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-6-mRNA-Expression<br>in Mikroglia nach 24 Stunden             | 38 |
| Abbildung 4.7.: Einfluss von Empagliflozin auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression<br>in Mikroglia nach drei Stunden | 39 |
| Abbildung 4.8.: Einfluss von Empagliflozin auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression<br>in Mikroglia nach 24 Stunden   | 40 |
| Abbildung 4.9.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression<br>in Mikroglia nach drei Stunden  | 41 |
| Abbildung 4.10.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression<br>in Mikroglia nach 24 Stunden   | 41 |
| Abbildung 4.11.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-6-Freisetzung<br>aus Mikroglia nach 24 Stunden               | 42 |
| Abbildung 4.12.: Einfluss von Empagliflozin auf die TNF- $\alpha$ -Freisetzung<br>aus Mikroglia nach 24 Stunden     | 43 |
| Abbildung 4.13.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-10-Freisetzung<br>aus Mikroglia nach 24 Stunden              | 44 |
| Abbildung 4.14.: Repräsentativer Western-Blot nach 30-minütiger Stimulation                                         | 45 |
| Abbildung 4.15.: Einfluss von Empagliflozin auf die ERK1/2-Phosphorylierung<br>in Mikroglia nach 30 Minuten         | 45 |
| Abbildung 4.16.: Einfluss von Empagliflozin auf den NF $\kappa$ B-Signalweg<br>nach 30 Minuten in Mikroglia         | 47 |
| Abbildung 4.17.: Einfluss von Empagliflozin auf den NF $\kappa$ B-Signalweg<br>nach 60 Minuten in Mikroglia         | 48 |
| Abbildung 5.1.: Darstellung der Involvierung des NHE-1 in die mikrogliale<br>Inflammation (aus Liu et al., 2010)    | 59 |

## II. Abkürzungsverzeichnis

|                             |                                                                       |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| AMPK                        | AMP-aktivierte Proteinkinase                                          |
| APS                         | Ammoniumperoxodisulfat                                                |
| ATP                         | Adenosintriphosphat                                                   |
| BDNF                        | <i>brain-derived neurotrophic factor</i>                              |
| BHS                         | Blut-Hirn-Schranke                                                    |
| BSA                         | Bovines Serumalbumin                                                  |
| COMT                        | Catechol-O-Methyltransferase                                          |
| DMF                         | Dimethylformamid                                                      |
| DMEM                        | <i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>                               |
| DMSO                        | Dimethylsulfoxid                                                      |
| dNTP                        | Desoxynukleotidtriphosphat                                            |
| DTT                         | Dithiothreitol                                                        |
| EDTA                        | Ethylendiamintetraacetat                                              |
| ERK                         | <i>extracellular signal-regulated kinases</i>                         |
| GDNF                        | <i>glial-derived neurotrophic factor</i>                              |
| Hepes                       | 2-4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonsäure                     |
| HMGB1                       | <i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>                                 |
| IGF-1                       | <i>insulin-like growth factor 1</i>                                   |
| IL                          | Interleukin (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10)                              |
| iNOS                        | Induzierbare NO-Synthase                                              |
| IPS                         | Idiopathisches Parkinson-Syndrom                                      |
| L-Dopa                      | Levo-Dopamin                                                          |
| LPS                         | Lipopolysaccharid                                                     |
| MAO-B                       | Monoaminoxidase B                                                     |
| MAPK                        | <i>mitogen-activated protein kinases</i>                              |
| MPTP                        | 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridin                        |
| mRNA                        | <i>messenger ribonucleic acid (messenger-RNA)</i>                     |
| MTT                         | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid            |
| NADPH-Oxidase               | Nicotinamadeninucleotidphosphat-Oxidase                               |
| NF- $\kappa$ B              | <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> |
| NO                          | <i>nitric oxide</i> (Stickstoffmonoxid)                               |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Hyperoxid-Anion                                                       |
| ONOO <sup>-</sup>           | Peroxinitrit                                                          |

|               |                                                             |
|---------------|-------------------------------------------------------------|
| PBS           | <i>phosphate-buffered saline</i>                            |
| pERK          | Phosphorylierte ERK                                         |
| PET           | Positronen-Emissions-Tomographie                            |
| ROS           | <i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies |
| SDS           | Natriumdodecylsulfat                                        |
| SDS-PAGE      | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese         |
| SOCS          | <i>suppressor of cytokine signaling</i>                     |
| TBST          | <i>tris-buffered saline with Tween20</i>                    |
| TEMED         | Tetramethylethylendiamin                                    |
| TGF- $\beta$  | <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>        |
| THS           | Tiefe Hirnstimulation                                       |
| TMB           | Tetramethylbenzidin                                         |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor- $\alpha$                                |
| TRIS          | Trishydroxymethyl-aminomethan                               |
| ZNS           | Zentrales Nervensystem                                      |

# 1. Einleitung

## 1.1. Parkinson-Syndrom

### 1.1.1. Definition und Klinik

Als kennzeichnend für das Parkinson-Syndrom (PS) gelten die motorischen Hauptsymptome Steifigkeit der Muskulatur (Rigor), Muskelzittern, welches häufig in Ruhe auftritt (Ruhetremor), Bewegungsarmut (Brady- /Akinese) und Störungen des Gleichgewichtes (posturale Instabilität). Die Kriterien für die klinische Diagnose eines PS sind das Vorliegen von Brady-/Akinese mit mindestens einem der anderen oben genannten motorischen Symptome (Deuschl *et al.*, 2016). Außer den motorischen Symptomen kommt es bei der Erkrankung auch zu einer Reihe weiterer nicht-motorischer Begleiterscheinungen, welche auch bereits früh im Krankheitsverlauf auftreten können. Dazu gehören Defizite, wie z.B. Hyposmie (verminderter Geruchssinn), vegetative (Miktionsstörungen, Obstipation, orthostatische Dysregulation) und neuropsychiatrische Symptome (Gedächtnis- und Konzentrationsstörungen, Apathie, Angstzustände) sowie Schlafstörungen (Khoo *et al.*, 2013; Kalia und Lang, 2015).

Das PS lässt sich in vier Formen einteilen, wobei das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS, Morbus Parkinson) mit einem Anteil von ca. 75% am häufigsten auftritt. Zu den Formen des Parkinson-Syndroms gehören neben dem IPS genetische Parkinson-Formen, symptomatische (sekundäre) Parkinson-Syndrome (z.B. medikamentös oder toxisch induziert) sowie atypische Parkinson-Syndrome, welche im Zusammenhang mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen auftreten (Deuschl *et al.*, 2016).

### 1.1.2. Epidemiologie des M. Parkinson

Mit einem Anteil von 0,3 % an der Gesamtbevölkerung in der westlichen Welt ist der M. Parkinson die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Demenz. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit zeigt eine eindeutige Altersabhängigkeit: Ist der M. Parkinson bei unter 50-jährigen selten, steigt die Prävalenz bei 70-79-jährigen im Vergleich zur Prävalenz bei 50-59-jährigen deutlich an (de Lau und Breteler, 2006). Mit dem Ansteigen der weltweiten Lebenserwartung sowie der demografischen Entwicklung insbesondere in den industrialisierten Ländern wird es im Zeitraum bis 2030 wahrscheinlich zu einer Verdopplung der Erkrankungszahlen im Vergleich zum Jahr 2005 kommen (Dorsey *et al.*, 2007; Kalia und Lang, 2015).

### 1.1.3. Pathogenese des M. Parkinson

Die Ursachen für die Erkrankung sind bis heute nicht komplett verstanden. Derzeitig geht man davon aus, dass das Zusammenwirken von einem veränderten Proteinstoffwechsel, mitochondrialer Dysfunktion, oxidativem Stress und inflammatorischen Veränderungen für Entstehung und Progression des M. Parkinson verantwortlich sind (Schapira und Jenner, 2011). Als gesichert gilt, dass die Degeneration Dopamin-produzierender Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SN) im Bereich des *Mesencephalons* die pathophysiologische Grundlage der klinischen Symptomatik des M. Parkinson darstellt. Der daraus resultierende Mangel an Dopamin in den Basalganglien führt zu den klassischen motorischen Parkinson-Symptomen. Die Neurodegeneration beim M. Parkinson ist nicht allein auf die SN beschränkt, sondern findet sich auch in anderen Hirnregionen, wie u. a. im Hypothalamus, in den serotonergen Raphe-Kernen oder den noradrenergen Neuronen des *Locus caeruleus* (Kalia und Lang, 2015; Dickson, 2012). Dies ist eine mögliche Erklärung für das Auftreten der bereits erwähnten nicht-motorischen Symptome (Schapira *et al.*, 2017).

Als morphologisches Korrelat für die degenerativen Zellveränderungen gilt die pathologische Aggregation neuronaler Proteine. Erste Hinweise darauf gelangen dem Neurologen Friedrich Lewy bereits 1912 mit dem mikroskopischen Nachweis eosinophiler Einschlüsse in Neuronen, sogenannter Lewy-Körperchen. Spillantini und Kollegen konnten 1997 erstmals fehlerhaftes  $\alpha$ -Synuclein als deren Hauptbestandteil identifizieren (Spillantini *et al.*, 1997). Sich daran anschließende Untersuchungen zeigten zudem, dass Mutationen im  $\alpha$ -Synuclein-Gen genetische Erkrankungsformen des Parkinson-Syndroms bedingen (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Kalia und Lang, 2015). Neben dem  $\alpha$ -Synuclein wurde auch eine Vielzahl weiterer Moleküle, u. a. mitochondriale Proteine sowie Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Systems als Bestandteile der Lewy-Körperchen identifiziert (Wakabayashi *et al.*, 2013). Wahrscheinlich induzieren die neuronalen Proteinaggregate über die Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion oder Aktivierung von Mikrogliazellen oxidativen Stress und tragen somit zur Neurodegeneration bei (Dias *et al.*, 2013).

Interessanterweise breiten sich die Proteinaggregate wahrscheinlich in einer stets gleichartigen Weise mit Progression der Erkrankung im Nervensystem aus: Vermutlich beginnen die degenerativen Vorgänge im peripheren Nervensystem und gehen dann zunehmend in das zentrale Nervensystem (ZNS) über, wo sie sich über das Gehirn, mit Beginn im unteren Hirnstamm (dorsaler Vagus-Kern) und anschließender Progression der Erkrankung in Bereiche des Mittel-, Vorderhirns und schließlich der *Cortices*, ausbreiten (Braak *et al.*, 2003). Es wird daher vermutet, dass die Proteinaggregate im Verlauf der

Erkrankung auch auf andere, bis dahin nicht betroffene Neurone übergehen können und somit in ähnlicher Weise wie bei Prion-Erkrankungen eine Art „infektiöses“ Verhalten an den Tag legen (Kalia und Lang, 2015; Visanji *et al.*, 2013). Dies ist somit ein denkbarer Erklärungsansatz für die Progredienz der Erkrankung.

Als weitere Krankheitskomponente des M. Parkinson gilt mitochondriale Dysfunktion und eine verminderte Aktivität der mitochondrialen Atmungskette in Neuronen der SN. So zeigten sich in *post mortem*-Untersuchungen der SN von Personen mit M. Parkinson eine signifikante Reduktion der Komplex 1-Aktivität der Atmungskette gegenüber nicht betroffenen Kontrollpersonen (Schapira *et al.*, 1989). Ursächlich für diese Veränderungen sind wahrscheinlich durch oxidativen Stress geschädigte Untereinheiten dieses Enzyms (Keeney, 2006; Subramaniam und Chesselet, 2013). Weitere Anhaltspunkte für eine Beteiligung mitochondrialer Dysfunktion im Rahmen der M. Parkinson-Pathogenese entstanden durch Zufall durch die Infusion des Toxins MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridin), das in einer Gruppe Heroin-abhängiger Parkinson-ähnliche Symptome hervorrief (Langston *et al.*, 1983). Vermutlich akkumuliert das MPTP in den Mitochondrien dopaminergener Neurone und inhibiert dort ebenfalls den Komplex 1 der Atmungskette (Subramaniam und Chesselet, 2013). Wie der Komplex 1-Defekt letztendlich zum Zelltod der dopaminergen Neurone führt, ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich kommt es über eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) in den Mitochondrien zu einer Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege und somit zum Zelltod (Perier *et al.*, 2005; Subramaniam und Chesselet, 2013).

Untersuchungen an Patienten mit M. Parkinson zeigten zudem eine erhöhte Dichte aktivierter Mikroglia, den zentralen Vermittlern neuroinflammatorischer Prozesse, in der SN (Hirsch und Hunot, 2009). Basierend auf diesen und anderen Untersuchungen wurde eine entzündliche Komponente in der Pathogenese des M. Parkinson postuliert, auf die zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Dissertation ausführlicher eingegangen wird.

#### **1.1.4. Therapieoptionen**

Eine kausale Therapie mit dem Ziel, die neurodegenerativen Prozesse zu stoppen, ist bis heute nicht möglich. Vorherrschender Therapieansatz ist es, Dopamin zu substituieren und somit die mit dem Dopaminmangel verbundenen Symptome zu lindern. Als besonders effektiv hierfür erwies sich der Einsatz von L-Dopa, kombiniert mit einem Decarboxylase-Hemmer, der den Abbau des L-Dopas in der Peripherie verhindert. Aufgrund seiner guten Wirksamkeit ist es häufig die initiale Therapieoption (Lees *et al.*, 2009). Als Nebenwirkungen sind vor allem

sogenannte On-Off-Phasen zu erwähnen, also Fluktuationen der Symptomatik mit zum Teil plötzlichem Übergang von guter Beweglichkeit oder auch Überbeweglichkeit in einen akinetischen Zustand und umgekehrt. Diese Nebenwirkungen treten umso häufiger auf, je länger die Krankheit besteht und je höher die täglich applizierte L-Dopa-Dosis ist (Oertel und Schulz, 2016).

Das Ziel, den Dopaminmangel auszugleichen, verfolgen auch Medikamente, die agonistisch am Dopaminrezeptor wirken. Sie können in frühen Krankheitsstadien als Monotherapie, aber auch in fortgeschrittenen Krankheitsstadien in Kombination mit L-Dopa verwendet werden, da auf diese Weise ein L-Dopa-sparender Effekt erzielt wird und die Wirkungsfluktuationen der L-Dopa-Therapie vermindert werden können. Den Dopaminrezeptor-Agonisten werden allerdings stärkere Nebenwirkungen im Vergleich zu L-Dopa zugeschrieben, bei denen vor allem Übelkeit und orthostatische Dysregulation zu erwähnen sind (Oertel und Schulz, 2016).

Um die Verfügbarkeit von Dopamin im synaptischen Spalt zu steigern, kommt als weiterer medikamentöser Ansatz die Hemmung Dopamin-abbauender Enzyme in Frage. Zu dieser Klasse gehören Catechol-O-Methyltransferase (COMT)- und Monoaminoxidase B (MAO-B)-Hemmer. Sie können in Kombination mit L-Dopa eingesetzt werden, um dessen Wirkdauer zu verlängern (Oertel und Schulz, 2016).

Als nicht-medikamentöse Behandlungsform wird in späten Krankheitsstadien bei Auftreten von Wirkungsfluktuationen oder bei therapieresistentem Ruhetremor die tiefe Hirnstimulation (THS) eingesetzt, bei der eine stereotaktische Elektroden-Implantation, meist im Bereich des *Nucleus subthalamicus*, vorgenommen wird. Die Wirkung hält, anders als bei der medikamentösen Therapie, über 24 Stunden gleichmäßig an und ist somit der medikamentösen Therapie bei Fluktuationen der Beweglichkeit überlegen. Außerdem ermöglicht der Einsatz der THS oft eine Dosisreduktion der Medikation und verringert somit Nebenwirkungen der Pharmakotherapie (Oertel und Schulz, 2016).

## **1.2. Mikroglia und Neuroinflammation**

### **1.2.1. Funktion und Aufgaben der Mikroglia**

Mikroglia entstammen entwicklungsgeschichtlich primitiven Makrophagen aus dem Dottersack und wandern bereits in der Embryonalentwicklung in die Vorläuferstruktur des Nervensystems ein (Wolf *et al.*, 2017). Sie sind an der prä- und postnatalen Hirnentwicklung maßgeblich beteiligt: Beispielsweise phagozytieren sie nicht mehr benötigte neuronale Vorläuferzellen im sich entwickelnden Hirn (Cunningham *et al.*, 2013) und eliminieren in der

postnatalen Hirnentwicklung redundante Synapsen (*synaptic pruning*) (Paolicelli *et al.*, 2011), weshalb den Mikroglia eine entscheidende Rolle für die Optimierung neuronaler Netzwerke zugeschrieben wird (Menassa und Gomez-Nicola, 2018). Bei der Ausführung ihrer Funktionen, sowohl im gesunden als auch im pathologisch veränderten ZNS, nehmen Zytokine eine wichtige Rolle ein (Hanisch, 2002). Sie umfassen eine große Anzahl verschiedener Moleküle und können sowohl anti- als auch proinflammatorische Effekte an Zellen induzieren. Im gesunden ZNS regulieren von Gliazellen freigesetzte Zytokine wichtige physiologische Prozesse. So ist das Zytokin TNF- $\alpha$  in die Steuerung von Funktionen wie synaptische Plastizität, Lernen und Gedächtnis eingebunden (Olmos und Lladó, 2014). Für ein weiteres Zytokin, IL-6, wurde ebenfalls eine Beteiligung an einer Vielzahl neurophysiologischer Vorgänge nachgewiesen, z.B. eine Regulation der synaptischen Transmission durch Hemmung der Transmitterfreisetzung (D'Arcangelo *et al.*, 2000) sowie eine Beteiligung an Gedächtnisfunktionen über eine Modulation der Langzeitpotenzierung oder -depression an Synapsen (Gruol, 2015).

Im adulten Gehirn nehmen Mikroglia vor allem die Funktion ortständiger Makrophagen wahr und schützen so das ZNS vor Krankheitserregern oder neurotoxischen Substanzen. Im ruhenden Zustand liegen Mikroglia in einer ramifizierten Form mit weit verzweigten Ausläufern vor (Kettenmann *et al.*, 2011). Über diese Ausläufer überwachen sie permanent ihre Umgebung, was allerdings ein hochdynamischer Prozess ist und die Bezeichnung des „ruhenden“ Zustandes diesem somit nicht gerecht wird (Nimmerjahn *et al.*, 2005; Kettenmann *et al.*, 2011).

Im Zuge ihrer Überwachungsfunktion exprimieren Mikroglia verschiedene Rezeptoren an der Zelloberfläche, die als sogenannte *pattern recognition receptors* (PRR) zusammengefasst werden. Über sie werden zum einen sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) erkannt, welches u. a. für Bakterien typische Strukturmoleküle, wie z. B. LPS, sind. Zum anderen reagieren die PRR auch auf körpereigene Strukturmoleküle, deren Anwesenheit auf einen Zellschaden schließen lässt, sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMP), ebenso wie auf abnorme endogene Proteinaggregate (z.B.  $\alpha$ -Synuclein) (Colonna und Butovsky, 2017; Yang und Zhou, 2019).

Nach Bindung einer dieser Liganden können intrazellulär verschiedene mehrteilige Signalkaskaden angestoßen werden. In der Regel werden hierbei intrazelluläre Signalwege und Transkriptionsfaktoren wie der *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF $\kappa$ B) aktiviert und darüber die Expression proinflammatorischer Zytokine induziert (Wolf *et al.*, 2017; Subhramanyam *et al.*, 2019). Der physiologische Hintergrund dieser

Mikroglia-Aktivierung und Initiierung der Entzündungsreaktion liegt darin, das auslösende Pathogen zu bekämpfen und somit eine Gefährdung des ZNS abzuwenden.

Verletzungen des ZNS, inflammatorische Mediatoren, Toxine oder Schädigung und Untergang von umliegenden Neuronen führen somit zu einer Aktivierung der Mikroglia. Als Ergebnis der im Zuge der Mikroglia-Aktivierung ablaufenden Signalkaskaden nehmen die Zellen je nach Umgebungsbedingungen unterschiedliche Phänotypen an. Es besteht die vereinfachte Annahme, dass aktivierte Mikroglia in Analogie zu den entwicklungsbiologisch verwandten Makrophagen situationsabhängig entweder einen M1- oder M2-Phänotyp annehmen können. M1-Mikroglia produzieren hohe Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren, wie die Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12 und TNF- $\alpha$ , und steigern die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), wodurch große Mengen Stickstoffmonoxid (NO) produziert werden und somit ein toxischer Effekt generiert wird (Colonna und Butovsky, 2017; Moss und Bates, 2001). Sie dienen auf diese Weise der Bekämpfung von das ZNS infiltrierenden Pathogenen, um das Gehirn zu schützen.

Im intakten Gehirn wird in Folge einer M1-Aktivierung schnell eine Gewebereparatur-Phase initiiert, die durch eine M2-Polarisation der Mikroglia charakterisiert ist (Tang und Le, 2016). Dies dient dazu, eine überschießende inflammatorische Reaktion zu verhindern und unverletztes Gewebe zu schützen. Wichtige Stimuli zur Initiierung dieses Phänotypen-Wechsels sind z. B. antiinflammatorische Zytokine, wie u. a. die Interleukine IL-4 und IL-10 (Colton, 2009; Moehle und West, 2015), welche von Mikroglia und Astrozyten nach PRR-Stimulation und der damit verbundenen intrazellulären Signalweg-Aktivierungen freigesetzt werden (Ledeboer *et al.*, 2002; Jack *et al.*, 2005). IL-10 führt wiederum durch Bindung an seinen Rezeptor zur Beeinflussung der Immunantwort, z.B. eine Minderung der Expression proinflammatorischer Zytokine. Die Annahme des M2-Phänotyps bewirkt zudem die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie z. B. *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) und neurotrophen Faktoren wie *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) oder *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF), wodurch die neuronale Regeneration sowie Gewebereparaturprozesse ermöglicht werden (Colonna und Butovsky, 2017; Colton, 2009).

Eine Aktivierung von Mikroglia kann somit sehr unterschiedliche Folgen nach sich ziehen und kann, je nach angenommenem Phänotyp, zur Schädigung von umliegenden Zellen, insbesondere Neuronen, als auch zu deren Regeneration beitragen. Vor diesem Hintergrund wird die mikrogliale Neuroinflammation auch oft als „zweischneidiges Schwert“ bezeichnet (Marchetti und Abbracchio, 2005).

Das hier beschriebene M1-/M2-Modell der mikroglialen Phänotypen gilt allgemein jedoch nur als eine vereinfachte Darstellung der Funktionszustände der Mikroglia, da das Aktivitätsspektrum der Zellen *in vivo* nicht alleine diese zwei gegensätzlichen Zustandsformen beinhaltet. Vielmehr geht man aktuell davon aus, dass Mikroglia diverse Phänotypen annehmen können, abhängig von den jeweiligen Umgebungsbedingungen und der jeweils vorliegenden Erkrankung sowie dem Stadium der Erkrankung (Wolf *et al.*, 2017; Colonna und Butovsky, 2017).

### **1.2.2. Mikroglia und Neuroinflammation beim M. Parkinson**

Nach der oben beschriebenen Darstellung der physiologischen Bedeutung von Mikroglia und den von ihnen freigesetzten neuroinflammatorischen Mediatoren soll im Folgenden die pathogenetische Rolle der durch Mikroglia vermittelten neuroinflammatorischen Prozesse beim M. Parkinson genauer betrachtet werden.

Ein Zusammenhang zwischen einer Mikroglia-Beteiligung und dem M. Parkinson wurde erstmals hergestellt durch *post mortem*-Untersuchungen an den Hirnen erkrankter Patienten. 1988 wiesen McGeer und Kollegen hierbei anhand von Molekülen an der Zelloberfläche aktivierte Mikroglia in der SN von Patienten mit M. Parkinson nach (McGeer *et al.*, 1988). Die daraufhin entwickelte Hypothese einer Mikroglia-Beteiligung an der Pathogenese des M. Parkinson wurde zudem durch *in vivo*-Untersuchungen bekräftigt, die mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) aktivierte Mikroglia in erhöhter Dichte in der SN von Patienten mit M. Parkinson nachwies (Gerhard *et al.*, 2006; Hirsch und Hunot, 2009).

Da das Toxin MPTP beim Menschen dopaminerge Neurone schädigt und auch parkinsonoide Symptome hervorruft, basieren viele Tiermodelle der Parkinson-Erkrankung auf der Verabreichung dieses Toxins. Interessanterweise wurde nach systemischer MPTP-Gabe an Versuchstiere eine Mikroglia-Aktivierung nachgewiesen, die auch nach Beendigung der Toxin-Exposition noch besteht (Barcia *et al.*, 2004). Auch beim Menschen scheint auch Jahre nach MPTP-Exposition noch eine Mikroglia-Aktivierung zu bestehen (Langston *et al.*, 1999; Hirsch und Hunot, 2009). *In vitro*-Studien mit Verwendung von MPTP an Neuron-Gliazell-Kokulturen zeigten außerdem, dass die MPTP-Neurotoxizität vor allem von der Anwesenheit von Mikroglia abhängig zu sein scheint, während in Abwesenheit dieser Zellen die Neurotoxizität nicht weiter voranschreitet (Gao *et al.*, 2003). Diese Resultate aus den experimentellen Parkinson-Modellen legen nahe, dass auch eine kurze Konfrontation der Mikroglia mit neuronalem Zelluntergang oder Neurotoxinen eine lang andauernde Mikroglia-Antwort bewirken kann.

Im Zusammenhang mit dem M. Parkinson spielt für die Mikroglia-Aktivierung vor allem das bereits erwähnte  $\alpha$ -Synuclein eine Rolle. Setzen betroffene Neurone das pathologisch veränderte  $\alpha$ -Synuclein frei, wandern Mikroglia zum Ort der Freisetzung (Ferreira und Romero-Ramos, 2018). Zudem sind sie in der Lage, bestimmte Formen des  $\alpha$ -Synucleins über die an der Zelloberfläche lokalisierten PRR als ein DAMP zu identifizieren, woraufhin die Mikroglia in der Folge einen proinflammatorischen Phänotyp annehmen und die Expression von proinflammatorischen Mediatoren stark gesteigert wird (Zhang, 2005; Ferreira und Romero-Ramos, 2018). Als wichtiger intrazellulärer Signalgeber in diesem Prozess der  $\alpha$ -Synuclein-vermittelten Mikroglia-Aktivierung wirkt der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, der nach seiner Aktivierung in den Zellkern wandert und dort die Transkription verschiedener Gene, wie beispielsweise diverser Zytokine, erhöht. Neben der NF $\kappa$ B-Kaskade sind aber auch weitere Signalwege in die proinflammatorische Mikroglia-Aktivierung eingebunden, so zum Beispiel die *extracellular-regulated kinases 1/2* (ERK  $_{1/2}$ ), welche den *mitogen-activated protein kinases* (MAP-Kinasen) zugeordnet werden (Wilms *et al.*, 2009; Ferreira und Romero-Ramos, 2018). Die dauerhafte Konfrontation der Mikroglia mit aktivierenden Stimuli, wie z. B. mit den erwähnten Proteinaggregaten oder sterbenden Neuronen, führt somit zu einer dauerhaften proinflammatorischen Mikroglia-Aktivierung. Dementsprechend belegen auch signifikant veränderte Zytokinspiegel bei erkrankten Personen eine neuroinflammatorische Komponente in der Pathogenese des M. Parkinson. Hierbei scheinen insbesondere TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  eine Rolle zu spielen, da erhöhte Werte dieser Zytokine sowohl *post mortem* im *Striatum* als auch im Liquor von Parkinson-Patienten nachgewiesen wurden (Hirsch und Hunot, 2009). Insbesondere wenn proinflammatorische Zytokine über längere Zeiträume in hohen Konzentrationsbereichen freigesetzt werden, werden ihnen trotz ebenfalls zahlreicher physiologischer Funktionen im gesunden ZNS schädigende Effekte zugeschrieben (Leal *et al.*, 2013). Mittels *in vitro*-Versuchen konnten beispielsweise für hohe TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Konzentrationen neurotoxische Effekte nachgewiesen werden. Diese sind vermutlich in einer Steigerung der Glutaminase-Expression in Neuronen und damit einer Anhebung der Glutamat-Konzentration auf zytotoxische Werte begründet (Ye *et al.*, 2013). Neben diesen direkt neurotoxischen Effekten der Zytokine sollte auch eine indirekte Neurotoxizität berücksichtigt werden, etwa über eine Induktion der Freisetzung neurotoxischer Substanzen aus Astrozyten (Brown und Vilalta, 2015). Es gilt daher als wahrscheinlich, dass eine Veränderung des Zytokin-Milieus im ZNS die Degeneration der nigrostriatalen Bahnen mitverursacht (Nagatsu *et al.*, 2000).

Neben den proinflammatorischen Zytokinen gilt auch durch Stickstoffmonoxid (NO) verursachter oxidativer Stress als Bestandteil der neurotoxischen Mikroglia-Effekte. Verantwortlich für die Bildung von NO sind die NO-Synthasen (NOS), von denen verschiedene Subtypen bekannt sind, wie die endotheliale NOS (eNOS), die neuronale NOS (nNOS) oder die induzierbare NOS (iNOS) (Picón-Pagès *et al.*, 2019). Geringe NO-Mengen kommen also im gesunden ZNS vor und sind an unterschiedlichen physiologischen Prozessen beteiligt. Hierzu zählen beispielsweise synaptische Übertragungsprozesse, bei denen NO als Neurotransmitter wirken kann und in die Langzeit-Potenzierung von Synapsen eingebunden ist (Picón-Pagès *et al.*, 2019). Im Gegensatz zur nNOS wird die iNOS im ZNS unter physiologischen Bedingungen nicht exprimiert, jedoch kann die Expression der iNOS in Gliazellen durch diverse Stimuli induziert werden. Dazu gehören neben bakteriellen Bestandteilen wie LPS auch Zytokine wie IL-12, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Murphy, 2000) sowie die pathologisch veränderten Proteinaggregate um das bereits erwähnte  $\alpha$ -Synuclein (Su *et al.*, 2008; Brown und Vilalta, 2015; Ferreira und Romero-Ramos, 2018).

Wahrscheinlich ist vor allem die iNOS das für die toxischen NO-Wirkungen relevante Herstellungsenzym. So zeigten *in vitro*-Untersuchungen am MPTP-Modell des M. Parkinson, dass der durch MPTP induzierte neuronale Zelltod durch Gabe eines selektiven iNOS-Inhibitors reduziert wurde. Hingegen bewirkte die Hemmung der konstitutiv exprimierten nNOS keinen Schutz der Neurone (Brzozowski *et al.*, 2015). Der neurotoxische Effekt von NO wird vermutlich einerseits durch eine Inhibition der mitochondrialen Cytochrom-Oxidase, einem Enzym der Atmungskette, verursacht (Bal-Price und Brown, 2001). Außerdem spielt in diesem Zusammenhang auch die NADPH-Oxidase eine Rolle, welche ebenfalls in aktivierten Mikroglia exprimiert wird. Die NADPH-Oxidase katalysiert die Reaktion von Sauerstoff zu Hyperoxidanionen ( $O_2^-$ ), welche mit NO zum neurotoxischen Peroxinitrit ( $ONOO^-$ ) reagieren (Beckman und Koppenol, 1996). Die vermehrte Expression der iNOS in Mikroglia resultiert somit in der Bildung von Radikalen, welche oxidative Umgebungsbedingungen schaffen und damit als weiterer Verstärker der nigrostriatalen Neurodegeneration wirken (Mander und Brown, 2005; Brown und Vilalta, 2015).

Die gesteigerte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren scheint somit einen Anteil an der Progression neurodegenerativer Krankheiten zu haben. Beim M. Parkinson entwickeln sich die neuroinflammatorische Prozesse wahrscheinlich sekundär in Folge einer mikroglialen Reaktion auf pathologische Proteinaggregate oder neuronale Zellschäden. Die dauerhafte Konfrontation mit diesen Stimuli bewirkt eine proinflammatorische Aktivierung der Mikroglia, die wiederum durch Freisetzung von Zytokinen und Radikalen die

Neurodegeneration verstärkt. Somit entsteht ein *circulus vitiosus* zwischen Neurodegeneration und mikroglialer Neuroinflammation (Tang und Le, 2014). Passend zu dieser Hypothese zeigten *in vivo*-Studien, dass eine Inhibition der mikroglialen Neuroinflammation die Neurodegeneration im MPTP-Modell mildern kann (Wu *et al.*, 2002). Therapeutisches Ziel der Mikroglia-Modulation sollte allerdings nicht allein die Eindämmung der Expression und Freisetzung neurotoxischer Substanzen sein. Idealerweise beinhaltet die Modifikation der mikroglialen Inflammation auch eine Annahme des M2-Phänotyps mit der vermehrten Aktivierung neuroregenerativer Signalwege, die beispielsweise in einer erhöhten IL-10-Sekretion aus den Mikroglia resultiert (Tang und Le, 2016). Auf diese Weise könnte den Mikroglia ein Ausweg aus dem *circulus vitiosus* gebnet werden, die Progression der Neurodegeneration verzögert und somit eine Therapiestrategie für den M. Parkinson entwickelt werden.

### **1.3. Empagliflozin als möglicher Modulator der Mikroglia**

#### **1.3.1. Der SGLT2-Inhibitor Empagliflozin**

Empagliflozin ist ein Antidiabetikum, welches seinen blutzuckersenkenden Effekt über eine Hemmung des Natrium-Glukose-Cotransporters 2 (SGLT2) vermittelt. Dieser Transporter ist am proximalen Tubulus der Niere lokalisiert und für die Resorption von Glukose aus dem Primärharn zuständig. Eine Blockade dieses Transporters erhöht die Glukose-Ausscheidung über den Urin und senkt darüber den Blutzuckerspiegel, wodurch in klinischen Studien auch eine signifikante Reduktion des Langzeitwertes HbA1c durch Empagliflozin gezeigt wurde (Frampton, 2018). Außer der Senkung des Blutzuckerspiegels ergaben sich unter Empagliflozin-Behandlung auch weitere vorteilhafte Effekte. So wurde eine Reduktion des Körpergewichtes sowie eine blutdrucksenkende Wirkung bei Patienten mit Typ 2-Diabetes festgestellt (Frampton, 2018). Letzteres könnte u. a. über osmotische Diurese vermittelt werden (Tikkanen *et al.*, 2015).

Die *EMPA-REG OUTCOME*-Studie, eine große klinische Studie an kardiovaskulär vorerkrankten Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, zeigte, dass Empagliflozin das Risiko u. a. für kardiovaskulär bedingte Todesfälle und Hospitalisierungen aufgrund von Herzinsuffizienz deutlich reduzieren konnte (Zinman *et al.*, 2015). Auch nephroprotektive Effekte bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 wurden unter Therapie mit Empagliflozin beobachtet (Wanner *et al.*, 2016; Frampton, 2018).

Die zugrundeliegenden Mechanismen hierfür sind derzeit jedoch nicht hinreichend geklärt und somit Gegenstand der aktuellen Forschung. Diskutiert werden hierbei u.a. hämodynamische Veränderungen wie eine durch osmotische Diurese vermittelte Reduktion des Plasmavolumens und dadurch eine Minderung der kardialen Vor- und Nachlast (Lahnwong *et al.*, 2018). Durch die Glukose-Ausscheidung über den Urin und damit einhergehenden sinkenden Blutglukosespiegeln ist auch eine Reduktion der Glukotoxizität, welche zu Folgeerkrankungen wie der diabetischen Kardiomyopathie beiträgt, denkbar (Lahnwong *et al.*, 2018). Bezüglich der Glukotoxizität spielen *advanced glycation endproducts* (AGE) eine Rolle. Diese sind das Resultat einer nicht-enzymatischen Modifikation von Proteinen durch Zuckermoleküle und entstehen vermehrt in diabetischen Stoffwechsellagen (Ojima *et al.*, 2015). Die AGE-Moleküle können in Verbindung mit ihren Rezeptoren oxidativen Stress verursachen und somit auch zur Entwicklung anderer Folgeerkrankungen wie der diabetischen Nephropathie beitragen. Es gibt aus Tiermodellen Hinweise, dass Empagliflozin diesen Prozess verhindern kann (Ojima *et al.*, 2015).

Insgesamt überraschten die kardio- und nephroprotektiven Effekte Empagliflozins, da ähnlich ausgeprägte Ergebnisse in Studien mit anderen Antidiabetika, auch mit einer vergleichbaren oder stärkeren blutzuckersenkenden Wirkung, nicht beobachtet wurden (Prattichizzo *et al.*, 2018; Packer, 2020). In einer kürzlich durchgeführten klinischen Studie konnte Empagliflozin zudem das Risiko für kardiovaskuläre Todesfälle sowie Hospitalisierungen aufgrund von Herzinsuffizienz deutlich reduzieren, unabhängig davon, ob die Patienten an Diabetes erkrankt waren oder nicht (Packer *et al.*, 2020).

Wahrscheinlich können die ausgeprägten Effekte auf das kardiovaskuläre System daher nicht allein über die Senkung der Blutglukose-Spiegel erklärt werden. Denkbar sind daher auch direkte Wirkmechanismen, die über die indirekten, durch die Blutzuckersenkung vermittelten Effekte hinausgehen.

### **1.3.2. SGLT2-Inhibitoren und Inflammation**

Manche Autoren postulieren aufgrund der überraschenden kardio- und nephroprotektiven Effekte, dass SGLT2-Inhibitoren auch eine direkte Wirkung auf inflammatorische Prozesse ausüben und auch auf diese Weise zum guten Outcome beitragen (Yaribeygi *et al.*, 2018; Uthman *et al.*, 2018a). Verschiedene experimentelle Studien haben zudem *in vivo* eine Verbindung zwischen SGLT2-Inhibitoren und verminderter inflammatorischer Aktivität hergestellt. So wiesen mit Empagliflozin behandelte Mäuse eine verminderte myokardiale iNOS- und IL-6-Expression auf (Andreadou *et al.*, 2017) oder zeigten reduzierte

Plasmaspiegel von TNF- $\alpha$  (Xu *et al.*, 2017). Ein möglicher Erklärungsansatz für die antiinflammatorischen Effekte liegt u. a. in der Reduktion der Hyperglykämie-induzierten Zytokinproduktion oder Minderung von oxidativem Stress (Yaribeygi *et al.*, 2018). Von anderen Autoren wurde außerdem auch eine leichte Steigerung der Ketonkörper-Bildung durch die Empagliflozin-Behandlung angeführt, da diesen ebenfalls antiinflammatorische Effekte zugeschrieben werden (Prattichizzo *et al.*, 2018).

Es ist bei den antiinflammatorischen Wirkungen von Empagliflozin oder anderen Antidiabetika daher relevant zu unterscheiden, ob die herabregulierte Inflammation auf einer besseren Blutzuckerkontrolle oder auf einer intrinsischen antiinflammatorische Wirkung des Wirkstoffes beruht (Kothari *et al.*, 2016).

Dass SGLT2-Inhibitoren möglicherweise einen antiinflammatorischen Einfluss unabhängig von der besseren Blutzuckerkontrolle ausüben, legen *in vivo*-Experimente an Mausmodellen nicht-diabetischer Nierenerkrankungen nahe, an denen nach Empagliflozin-Applikation antiinflammatorische und antifibrotische Effekte in der Niere nachgewiesen werden konnten, ohne dass es zu einer signifikanten Reduktion des Körpergewichtes oder des Blutzuckerspiegels kam (Abbas *et al.*, 2018). Weitere Anhaltspunkte für eine direkte antiinflammatorische Wirkung von SGLT2-Inhibitoren liefern *in vitro*-Experimente mit Dapagliflozin und Canagliflozin, in denen durch verschiedene Arbeitsgruppen eine signifikant niedrigere Expression von inflammatorischen Zytokinen dargelegt wurde (Xu *et al.*, 2018; Gaspari *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2017). Auch für Empagliflozin wurde *in vitro* bereits ein antiinflammatorischer Effekt nachgewiesen (Koyani *et al.*, 2020). Viele dieser Experimente hatten gemeinsam, dass die Versuche unter normoglykämischen Bedingungen stattfanden. Zudem zeigten Untersuchungen an einem Tiermodell des Diabetes mellitus, dass ein SGLT2-*knockout* zwar die Blutglukosespiegel senkte, es jedoch nicht zur Änderung der Expression inflammatorischer Marker, wie u. a. IL-6, kam (Vallon *et al.*, 2013). Somit scheint die Zielstruktur Empagliflozins, der SGLT2, nicht für die Expression inflammatorischer Mediatoren relevant zu sein, wodurch die These eines entzündungsmodulierenden Einflusses Empagliflozins unabhängig von der blutzuckersenkenden und SGLT2-blockierenden Wirkung unterstützt wird.

Die beobachteten kardio- und nephroprotektiven Effekte unter Empagliflozin-Therapie sind also wahrscheinlich über verschiedenste, sowohl indirekte als auch direkte Mechanismen zu erklären. Möglicherweise spielt hierbei auch eine direkte, bisher noch weitgehend unverstandene Beeinflussung inflammatorischer Prozesse durch Empagliflozin eine Rolle, die

sich auch bei anderen Erkrankungen, die eine inflammatorische Komponente beinhalten, nutzen ließe.

#### **1.4. Fragestellung**

In dieser Arbeit soll erstmalig die Wirkung von Empagliflozin auf ruhende und LPS-stimulierte Mikroglia der Ratte *in vitro* untersucht werden. Dabei soll die LPS-Stimulation die Mikroglia in einen ähnlichen Aktivitätszustand versetzen wie es beim M. Parkinson der Fall ist, da die Mikroglia-Antwort auf fehlgefaltete Proteine, wie z. B.  $\alpha$ -Synuclein, und auf bakterielle Zellwandbestandteile über die ähnliche Oberflächenrezeptoren und Signalkaskaden vermittelt wird (Butovsky *et al.*, 2005; Kouli *et al.*, 2019). Neben der Frage, ob Empagliflozin an Mikroglia antiinflammatorische Effekte ausübt, soll anhand der Freisetzung des Zytokins IL-10 auch untersucht werden, inwiefern neuroregenerative Signalwege durch Empagliflozin angestoßen werden, um eine mögliche Eignung zur Phänotypen-Modulation der Mikroglia zu eruieren.

Konkret sollen folgende Fragestellungen genauer bearbeitet werden:

1. Welche Konzentration von Empagliflozin hat den größten Effekt bei geringer Toxizität?
2. Wie verändert sich die mRNA-Expression inflammatorisch relevanter Moleküle wie IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und iNOS unter Empagliflozin-Stimulation?
3. In welcher Weise wird die Freisetzung von NO, IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 aus Mikroglia durch Empagliflozin beeinflusst?
4. Gibt es intrazelluläre Signalwege, die von Empagliflozin in Mikroglia beeinflusst werden?
5. Lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass durch Empagliflozin ein neuroprotektiver Phänotyp an Mikroglia induziert wird?

Die ermittelten Ergebnisse sollen anschließend vor dem Hintergrund der Rolle der Mikroglia beim M. Parkinson diskutiert werden.

## 2. Material

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Software-Programme, Geräte, Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien samt ihrer Hersteller sind im Folgenden aufgelistet. Die hergestellten Lösungen und Puffer sowie Kits, Enzyme und Primer werden nach Methoden geordnet aufgeführt.

Zur Gewinnung der Mikroglia wurden 1-3 Tage alte Ratten (P1-P3) des Sprague Dawley- und des Wistar-Stammes verwendet. Diese wurden unter Standardbedingungen im Viktor-Hensen-Haus (Tierstall) der Universität Kiel gehalten. Eine Tierversuchsgenehmigung des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein lag vor (V312-7224.121-13).

### 2.1. Chemikalien

|                                                           |                                           |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Acetonitril                                               | Sigma, St. Louis (USA)                    |
| Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)                             | Serva, Heidelberg (Deutschland)           |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS)                              | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)   |
| Azeton                                                    | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)        |
| $\beta$ -Glycerol-Phosphat                                | Sigma, St. Louis (USA)                    |
| Bisbenzimid                                               | Sigma, St. Louis (USA)                    |
| Bovines Serumalbumin (BSA)                                | Serva, Heidelberg (Deutschland)           |
| Bromphenolblau                                            | Riedel-de Haën, Seelze (Deutschland)      |
| Chloroform                                                | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)        |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                   | Sigma, St. Louis (USA)                    |
| Dithiothreitol (DTT)                                      | Sigma, St. Louis (USA)                    |
| <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)            | Invitrogen, Karlsruhe(Deutschland)        |
| Ethanol                                                   | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)        |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA)                           | Merck, Darmstadt(Deutschland)             |
| Fetales Kälberserum (FKS)                                 | Invitrogen, Karlsruhe(Deutschland)        |
| Glycin                                                    | AppliChem, Darmstadt (Deutschland)        |
| Glykogen                                                  | Sigma, St. Louis (USA)                    |
| Griess-Reagenz                                            | Sigma, St. Louis (USA)                    |
| 2-4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonsäure (Hepes) | Sigma, St. Louis (USA)                    |
| Isopropanol                                               | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)        |
| Kasein (Magermilchpulver)                                 | Heirler Cenovis, Radolfzell (Deutschland) |

|                                                     |                                          |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| L-Glutamin                                          | PAN Biotech, Aidenbach (Deutschland)     |
| Lipopolysaccharid aus <i>Salmonella typhimurium</i> | Sigma, St. Louis (USA)                   |
| Methanol                                            | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)       |
| Natriumchlorid (NaCl)                               | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)       |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                          | Serva, Heidelberg (Deutschland)          |
| Natrium-Vanadat                                     | Sigma, St. Louis (USA)                   |
| Natrium-Pyrophosphat                                | Sigma, St. Louis (USA)                   |
| Natronlauge (NaOH)                                  | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)       |
| Penicillin/Streptomycin                             | PAN Biotech, Aidenbach (Deutschland)     |
| <i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)              | PAN Biotech, Aidenbach (Deutschland)     |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)                  | Sigma, St. Louis (USA)                   |
| RNase-freies Aqua bidest.                           | Anatomisches Institut, Kiel(Deutschland) |
| Salzsäure (HCl)                                     | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)       |
| Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )     | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)       |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED)                    | Sigma, St. Louis (USA)                   |
| Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS)                | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)       |
| Trizol                                              | Quiagen, Hilden(Deutschland)             |
| Trypsin                                             | Sigma, St. Louis (USA)                   |
| Tween 20                                            | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)       |

## 2.2. Testsubstanz

|                           |                                                  |
|---------------------------|--------------------------------------------------|
| Empagliflozin (Jardiance) | Boehringer-Ingelheim, Ingelheim<br>(Deutschland) |
|---------------------------|--------------------------------------------------|

Die Substanz lag in Tablettenform vor. Diese wurde vor Gebrauch mechanisch zerkleinert und das Pulver in 1 ml Stimulationsmedium in einer Konzentration von 1 mM angesetzt. Zur Verbesserung der Löslichkeit Empagliflozins wurde dem Ansatz 1 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt.

## 2.3. Lösungen und Puffer

### 2.3.1. Isolierung und Kultivierung primärer Mikroglia

|                      |             |
|----------------------|-------------|
| Dissoziationslösung: | 10 ml DMEM  |
|                      | 24 mg Hepes |

---

|                                            |                                                           |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|                                            | 20 mg Trypsin                                             |
|                                            | 2 mg EDTA                                                 |
|                                            | 35 µl DNase auf 3 ml Dissoziationslösung                  |
| Kulturmedium Mikroglia:                    | 500 ml DMEM                                               |
|                                            | 60 ml FKS (bei 44-53°C inaktiviert)                       |
|                                            | 6 ml Penicillin (10.000 U/ml) und                         |
|                                            | Streptomycin (10 mg/ml)                                   |
|                                            | 5 ml L-Glutamin (200 mM)                                  |
| Kulturmedium für die Stimulationsversuche: | 500 ml DMEM                                               |
|                                            | 60 ml FKS (bei 56°C inaktiviert)                          |
|                                            | 6 ml Penicillin (10.000 U/ml) und                         |
|                                            | Streptomycin (10 mg/ml)                                   |
| <b>2.3.2. MTT-Test</b>                     |                                                           |
| MTT-Lösung:                                | 100 mg MTT-Pulver                                         |
|                                            | 20 ml PBS (Ca <sup>2+</sup> - und Mg <sup>2+</sup> -frei) |
| Solubilisierungslösung:                    | 210 ml Dimethylformamid (DMF)-                            |
|                                            | Lösung (50% in A.dest)                                    |
|                                            | 60 g SDS                                                  |
|                                            | 7,5 ml HCl                                                |
|                                            | 7,5 ml Essigsäure (80%)                                   |
| <b>2.3.3. Western-Blot</b>                 |                                                           |
| Lysis-Puffer:                              | 1 ml 50 mM TRIS                                           |
|                                            | 1 ml 100 mM NaCl                                          |
|                                            | 100 µl 5 mM EDTA                                          |
|                                            | 100 µl 1% Triton                                          |
|                                            | 20 µl 2 mM Natrium-Vanadat                                |
|                                            | 250 µl 2,5 mM Natrium-Pyrophosphat                        |
|                                            | 100 µl 1 mM β-Glycerolphosphat                            |

---

|                                       |                                                                                                            |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                       | 100 µl 1 mM PMSF (Phenylmethylnsulfonylfluorid)<br>In Acetonitril angesetzt                                |
| Trenngelpuffer (pH 8,8):              | 45,43 g TRIS<br>1 g SDS<br>ad 250 ml A. dest<br>mit HCl auf pH 8,8 einstellen                              |
| Sammelgelpuffer (pH 6,8):             | 15,1 g TRIS<br>1 g SDS<br>ad 250 ml A. dest<br>mit HCl auf pH 6,8 einstellen                               |
| Trenngel 10 %:                        | 2,6 ml Trenngelpuffer<br>3,33 ml Acrylamid<br>4,03 ml A. dest<br>60 µl APS (10% in A. dest)<br>30 µl Temed |
| Sammelgel 4,5 %:                      | 1,3 ml Sammelgelpuffer<br>0,835 ml Acrylamid<br>2,895 A. dest<br>30 µl APS (10% in A. dest)<br>15 µl Temed |
| Laufpuffer/Elektrodenpuffer (pH 8,2): | 12,2 g TRIS<br>57,6 g Glycin<br>4 g SDS<br>ad 4 l A. dest                                                  |
| SDS-Probenpuffer (pH 8,0):            | 0,23 g SDS in 7,25 ml A. dest lösen<br>1,25 ml Sammelgelpuffer                                             |

1 ml Glycerin  
50 mM Dithiothreitol (DTT)  
ad 10 ml A. dest

3×-Proteinpuffer (pH 6,8):

2,28 g TRIS  
9 g SDS  
30 ml Glycerin  
1 mg Bromphenolblau  
ad 60 ml A. dest, anschließend ad 85 ml  
A. bidest

Vor Gebrauch wurde der 3×-Proteinpuffer mit 150 µl 0,5 M DTT versetzt.

Transferpuffer (pH 9):

7,5 g TRIS  
36,03 g Glycin  
250 ml Methanol  
ad 2,5 l A. dest

TBST-Puffer (pH 7,5):

20 mM TRIS  
0,14 M NaCl  
5 ml 1 mM EDTA  
2,5 ml 0,1% Tween20  
ad 2,5 l A. dest

#### 2.3.4. cDNA-Herstellung

dNTP-Mix (100mM)

10 µl dATP  
10 µl dGTP  
10 µl dCTP  
10 µl dTTP  
60 µl RNase-freies A. bidest.

#### 2.3.5. ELISA

Waschpuffer:

80 g NaCl  
11,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 2 g KCl  
 50  $\mu\text{l}$  Tween  
 Ad 1 l A. dest, pH 7

### 2.3.6. Fluoreszenzfärbung

Antibody Diluent Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)  
 ImmuMount-Eindeckmedium Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

## 2.4. Gebrauchsfertige Kits, Enzyme und Primer

### 2.4.1. ELISA

BD OptEIA™ Rat TNF ELISA-Set BD Biosciences, San Diego (USA)  
 BD OptEIA™ Rat IL-6 ELISA-Set BD Biosciences, San Diego(USA)  
 BD OptEIA™ Rat IL-10 ELISA-Set BD Biosciences, San Diego(USA)  
 Streptavidin-HRP BD Biosciences, San Diego (USA)  
 TMB Substrate Kit Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

### 2.4.2. cDNA-Herstellung

RQ1 DNase Reaction Buffer Promega, Madison (USA)  
 RQ1 RNase-free DNase Promega, Madison (USA)  
 DNase Stop Solution Promega, Madison (USA)  
 Random Hexamer Primer Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)  
 d-NTP-Mix (100 mM) Bionline, London (UK)  
 5×Reaction Buffer Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)  
 RevertAid H Minus Reverse Transcriptase Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

### 2.4.3. Western Blot

ECL-Kit GE Healthcare, Little Chalfont (UK)  
 Pierce™ BCA (Bicinchoninsäure)-Protein-Assay Kit Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)  
 Reagenz A des BCA-Kits Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)  
 Reagenz B des BCA-Kits Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

|                                                   |                                         |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| SuperSignal™ West Femto Stable Peroxide Solution  | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| SuperSignal™ West Femto Luminol/Enhancer Solution | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |

#### 2.4.4. PCR

|                                                   |                               |
|---------------------------------------------------|-------------------------------|
| QuantiNova™ Probe PCR Kit                         | Quiagen, Hilden (Deutschland) |
| IL-6: Rat Forward/Reverse Primer, Probe           | Eurogentec, Lüttich (Belgien) |
| TNF- $\alpha$ : Rat Forward/Reverse Primer, Probe | Eurogentec, Lüttich (Belgien) |
| IL1- $\beta$ : Rat Forward/Reverse Primer, Probe  | Eurogentec, Lüttich (Belgien) |
| iNOS: Rat Forward/Reverse Primer, Probe           | Eurogentec, Lüttich (Belgien) |
| GapDh: Rat Forward/Reverse Primer, Probe          | Eurogentec, Lüttich (Belgien) |

#### 2.5. Primärantikörper

|                                                                    |                                         |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Rabbit Phospho-p44/42 MAPK (ERK <sub>1/2</sub> ) (Thr 202/Tyr 204) | Cell Signaling Technology, Boston (USA) |
| Anti-MAP Kinase 2/Erk2, 1B3B9, (80,45 mg/ml)                       | Millipore, Burlington (USA)             |
| NF $\kappa$ B (p65), anti-mouse (200 $\mu$ g/0,5 ml)               | Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)  |

#### 2.6. Sekundärantikörper

|                                 |                                        |
|---------------------------------|----------------------------------------|
| Chicken anti-mouse IgG-HRP      | Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA) |
| Goat anti-rabbit IgG-HRP        | Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA) |
| Alexa Fluor A 31620, anti-mouse | Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)    |

#### 2.7. Software

|                         |                                            |
|-------------------------|--------------------------------------------|
| 7500 SDS-Software 2.0.6 | Applied Biosystems, Waltham (USA)          |
| Axiovision 4.8.2.       | Carl Zeiss, Göttingen (Deutschland)        |
| Mendeley                | Mendeley Ltd., London (UK)                 |
| FusionCapt Advance      | Vilber Lourmat, Eberhardzell (Deutschland) |
| Gen5 Take3 Session      | BioTek, Winooski (USA)                     |

|                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| GraphPad Prism 5.04        | GraphPad Software          |
| Magellan™ Analyse-Software | Tecan, Männedorf (Schweiz) |
| Microsoft Word             | Microsoft, Redmond (USA)   |
| Microsoft Excel            | Microsoft, Redmond (USA)   |

## 2.8. Verbrauchsmaterialien

|                                                               |                                                  |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Deckgläser (22 mm×22 mm)                                      | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)          |
| ELISA 96-Mikrotiterplatten                                    | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| 96 Fast PCR-Platte Halbrand                                   | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| Gewebekulturschalen (60×15 mm)                                | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| MultiPLY Reaktionsgefäße (200µl)                              | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| Objektträger (26×76 mm)                                       | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)               |
| Pipettenspitzen                                               | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| PVDF-Membran "Hybond P"                                       | Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont (UK) |
| Reaktionsgefäße (0,2 ml/0,5 ml/1,5 ml)                        | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| Whatman-Pappe                                                 | GE Healthcare, Little Chalfont (UK)              |
| 6-Well Mikrotiterplatten                                      | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| 12-Well Mikrotiterplatten                                     | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| 96-Well Mikrotiterplatten                                     | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> ) | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| Zellkulturplatten (6, 12, 24 Vertiefungen)                    | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| Zellschaber                                                   | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |
| Zentrifugenröhrchen (10 ml, 50 ml)                            | Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)                |

## 2.9. Geräte und Hilfsmittel

|                                             |                                            |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Axiocam Fotokamera                          | Carl Zeiss, Oberkochen (Deutschland)       |
| Elektrophoresekammer                        | Bio-Rad, Hercules (USA)                    |
| Epoch Multi Volume Spectrophotometer System | BioTek, Winooski (USA)                     |
| 7500 Fast Real-Time PCR System              | Applied Biosystems, Waltham (USA)          |
| Fusion SL Vilber Lourmat                    | Vilber Lourmat, Eberhardzell (Deutschland) |
| Gefrier-/Kühlschrank                        | Bosch, Gerlingen (Deutschland)             |

|                                      |                                               |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Gefrierschrank (-70°C)               | Heraeus, Hanau (Deutschland)                  |
| Gelkammer                            | Bio-Rad, Hercules (USA)                       |
| Thermocycler GeneAmp PCR System 2400 | PerkinElmer, Waltham (USA)                    |
| GENios                               | Tecan, Männedorf (Schweiz)                    |
| Inkubator Hera Cell 150              | Heraeus, Hanau (Deutschland)                  |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M   | Carl Zeiss, Jena (Deutschland)                |
| Mikrotiterplatten-Photometer         | SLA Laborinstrumente, Karlsruhe (Deutschland) |
| Neubauer Zählkammer                  | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)            |
| Pipetten (1-1000 µl)                 | Eppendorf, Hamburg (Deutschland)              |
| Präzisionswaage BP 610               | Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)         |
| Sterile Werkbank HERASafe®           | Heraeus, Hanau (Deutschland)                  |
| Take3™ Multi-Volume Plate            | BioTek Instruments, Winooski (USA)            |
| Thermomixer Compact                  | Eppendorf, Hamburg (Deutschland)              |
| Trans-Blot Turbo                     | Biorad, Hercules (USA)                        |
| Vortex Genie 2                       | Scientific Industries, Bohemia (USA)          |
| Zentrifuge 5415 R                    | Eppendorf, Hamburg (Deutschland)              |
| Zentrifuge 5430                      | Eppendorf, Hamburg (Deutschland)              |
| Zentrifuge „Micro Centrifuge“        | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)            |

### 3. Methoden

#### 3.1. Kultivierung und Isolierung primärer Mikroglia

Zu Beginn wurden zwölf Ratten (P1-P3) dekapitiert, die Gehirne entnommen und diese in sterilen PBS-Puffer gegeben, welcher zu 1% mit Penicillin/Streptomycin versetzt worden war. Nach zweifachem Spülen mit jeweils 13 ml PBS und der anschließenden Überführung in eine Petrischale schloss sich die Präparation der Gehirne an, welche unter dem Binokular vorgenommen wurde. Hierbei erfolgte zunächst die Isolierung der Cortexhälften vom Hirnstamm, denen anschließend vorsichtig die Meningen entfernt wurden. *Cerebellum*, *Diencephalon*, die *Hippocampi* und *Bulbi olfactorii* wurden abpräpariert und verworfen. Die präparierten Cortexhälften sowie *Mesencephali* wurden für die weitere Verwendung in separate Gewebekulturschälchen überführt und zweimal mit sterilem PBS gespült. Es folgte die mechanische Zerkleinerung der Cortexhälften und *Mesencephali* mit einem Skalpell.

Anschließend wurde das Gewebe der Gewebekulturschälchen in jeweils ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dem schloss sich eine enzymatische Aufspaltung des Gewebes an, die durch Zugabe von je 3 ml Trypsin-haltiger Dissoziationslösung sowie je 35 µl DNase 1 und anschließender 30-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 8,3% CO<sub>2</sub>-Begasung durchgeführt wurde. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und jedes Zentrifugenröhrchen mit 2 ml 44-53°-Zellkulturmedium und 50 µl DNase 1 versetzt. Die Zugabe des FKS-haltigen Zellkulturmediums stoppte hierbei die Trypsinaktivität der Dissoziationslösung. Anschließend wurden die Zellsuspensionen auf 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen aufgeteilt, sodass pro Flasche in etwa die Zellsuspensionen von zwei Cortexhälften bzw. zwei *Mesencephali* enthalten waren. Diese wurden mit je 10 ml Zellkulturmedium versetzt. Anschließend erfolgte eine 9-10 Tage dauernde Inkubation der Zellen im Brutschrank, bis ein Zellrasen die Böden der Zellkulturflaschen bedeckte. Das Zellkulturmedium wurde bis zur Ernte alle 48 Stunden gewechselt.

Zur Gewinnung der Mikroglia für die Stimulationsversuche wurden diese geerntet. Dafür wurden die 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen manuell kräftig geschwenkt und die Mikroglia enthaltenden Kulturüberstände in 50 ml-Zentrifugenröhrchen dekantiert. Es erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation der Röhrchen bei 500×g, was dazu führte, dass sich ein Zellpellet aus Mikroglia am Boden der Röhrchen absetzte. Der Überstand wurde verworfen und die Mikroglia aus *Cortices* und *Mesencephali* wurden nun in einem gemeinsamen 50 ml-Zentrifugenröhrchen vereinigt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung versetzt und im Anschluss 10 µl dieser Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert, um die vitalen Zellen unter dem Mikroskop auszuzählen.

### 3.2. Aussaat und Stimulation der Mikroglia

Für die jeweiligen Versuche wurden Mikroglia im Stimulationsmedium in unterschiedlicher Zellzahl auf Kulturplatten bzw. Deckgläsern ausgesät:

- 1 Million Zellen pro Ansatz für die Western Blot-Analyse (12-Well-Platte)
- 1 Million Zellen pro Ansatz für die Real-Time-PCR und ELISA (12-Well-Platte)
- 1 Million Zellen pro Ansatz für die NO-Messung (12-Well-Platte)
- je 100.000 Zellen pro Ansatz für den MTT-Test (96-Well-Platte)
- 100.000 Zellen pro Deckglas zwecks Immunzytochemie

Nach Aussaat wurden die Zellen bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Überstände entfernt und frisches Stimulationsmedium hinzugegeben. Anschließend wurden zu den dafür vorgesehenen Ansätzen Empagliflozin pipettiert und die Zellen für 30 Minuten im Brutschrank präinkubiert. Im Anschluss daran wurde LPS zu den dafür vorgesehenen Ansätzen hinzugefügt.

Das Pipettierschema ist nachfolgend aufgeführt:

- 1) Stimulationsmedium (Kontrolle)
- 2) LPS (5 ng/ml)
- 3) 0,5 µMol/l Empagliflozin
- 4) 0,5 µMol/l Empagliflozin + LPS
- 5) 50 µMol/l Empagliflozin
- 6) 50 µMol/l Empagliflozin + LPS

Die Reaktionsansätze wurden bei 37°C und 8,3% CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Die Stimulationen wurden für unterschiedliche Zeiträume durchgeführt:

- MTT-Test: 24 Stunden
- RNA-Isolierung mit anschließender qPCR: drei und 24 Stunden
- Western Blot-Analyse: 30 Minuten
- ELISA: 24 Stunden
- NO-Messung: 24 Stunden
- Immunzytochemische NFκB-Färbung: 30 und 60 Minuten.

### 3.3. MTT-Test

Der MTT-Test wurde verwendet, um eine eventuelle zellschädigende Wirkung von Empagliflozin zu überprüfen. Bei diesem Verfahren wird das gelbe Substrat MTT durch mitochondriale Enzyme zu blau-violetter Formazan reduziert. Da das Vorkommen dieser Enzyme auf vitale Zellen beschränkt ist, kann von der Menge des entstandenen Formazans auf den Anteil vitaler Zellen geschlossen werden (Van Meerloo *et al.*, 2011).

Zur Durchführung des Testes wurden Mikroglia in einer 96-Well-Platte ausgesät und in einem fünffachen Ansatz stimuliert. Die äußeren Wells enthielten hierbei keine Zellen und wurden nur mit Stimulationsmedium versetzt, um einen Leerwert für den späteren photometrischen Abgleich zu schaffen. Nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden erfolgte das Absaugen der Zellkulturüberstände sowie dreifaches Spülen mit Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS. Die

Reaktionsansätze wurden nachfolgend mit je 100 µl Stimulationskulturmedium sowie je 25 µl der MTT-Lösung versetzt. Es folgte eine zweistündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 8,3% CO<sub>2</sub>-Begasung. Anschließend wurden durch Hinzufügen von je 100 µl Solubilisierungslösung und erneuter zweistündiger Inkubation im Brutschrank die Zellen lysiert. Die bis dahin intrazellulären Formazan-Kristalle wurden so freigesetzt und durch einen Rührstab mechanisch zerkleinert und aufgelöst. Abschließend wurde die Absorption des Formazans unter Abgleich mit den Leerwerten bei einer Wellenlänge von 550 nm photometrisch bestimmt.

### **3.4. Indirekte NO-Messung**

Da bei einer LPS-Aktivierung von Mikrogliazellen Stickstoffmonoxid (NO) freigesetzt wird, kann anhand der Quantifizierung der NO-Freisetzung auf die Mikroglia-Aktivität rückgeschlossen werden. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit wurde NO über sein stabileres Produkt Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) mittels Griess-Reagenz indirekt nachgewiesen.

Nach einer 24-stündigen Stimulation der Mikroglia wurden 100 µl des Überstandes aus jedem Stimulationsansatz in die Vertiefungen einer 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Es folgte die Hinzugabe von 100 µl Griess-Reagenz je Ansatz sowie eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Das Griess-Reagenz besteht aus Sulfanilsäure und Naphthylethylendiamin. Das Nitrit reagiert mit der erstgenannten Substanz zu einem Komplex, der mit Naphthylethylendiamin einen violetten Azofarbstoff bildet (Tsikas, 2007). Dieser Farbumschlag wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gegen eine mitgeführte Standardreihe gemessen.

### **3.5. Untersuchungen auf RNA-Ebene**

#### **3.5.1. RNA-Isolierung**

Die RNA der stimulierten Zellen wurde unter Zuhilfenahme von Trizol isoliert. In Trizol enthalten ist Guanidiniumthiocyanat, welches zur Zellyse führt, und Phenol, in dem sich Proteine und Nukleinsäuren lösen.

Zu Beginn erfolgte die Lyse der Mikroglia. Dafür wurde der Überstand der Zellkulturen zunächst entfernt und die verbliebenen Mikroglia zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Trizol je Ansatz, zudem wurden die am Boden verbliebenen Zellen mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Zellkulturplatte gelöst.

Das Lysat der jeweiligen Reaktionsansätze wurde daraufhin in je ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 200 µl Chloroform hinzupipettiert. Anschließend erfolgte ein ca. 15-sekündiges manuelles Schütteln. Für die Phasentrennung wurden die Proben für 15 Minuten bei 12.000×g und 4°C zentrifugiert. Es ergab sich eine obere wässrige Phase (RNA), eine Interphase (DNA und Proteine) und eine untere rote Chloroform-Phenol-Phase (DNA und Proteine). Die oberste Phase wurde vorsichtig abpipettiert, in neue Reaktionsgefäße überführt und dort mit je 1 µl Glykogen (70 mg/ml) versetzt, während die anderen beiden Phasen verworfen wurden. In einem weiteren Schritt erfolgte die Fällung der RNA unter Hinzugabe von je 500 µl Isopropanol. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und hinterher bei 12.000×g und 4°C zehn Minuten lang zentrifugiert. Dadurch schlug sich die RNA am Boden und der Seite der Reaktionsgefäße als kleines Pellet nieder, sodass der wässrige Überstand entfernt werden konnte. Die RNA-Pellets wurden nun durch Beifügen von je 1 ml Ethanol und anschließender Zentrifugation für fünf Minuten bei 7.600×g und 4°C gewaschen. Die entstandenen Überstände wurden verworfen, die Pellets getrocknet und anschließend in jeweils 20 µl RNase-freiem A. dest. gelöst. Die Ansätze wurden in der Folge bei 57°C für zehn Minuten inkubiert.

Abschließend erfolgte eine photometrische Reinheitskontrolle und Quantifizierung der RNA-Menge mit dem „Epoch Multi Volume Spectrophotometer System“ und der Software „Gen5 Take3 Session“ bei einer Wellenlänge von 260 nm (RNA) und einer Referenzwellenlänge von 280 nm (DNA). Dabei musste für die weitere Verwendung der RNA der Quotient aus RNA- und DNA-Menge in dem Isolat mindestens 1,7 betragen. Die isolierte RNA konnte nun bei –80°C für einige Wochen gelagert oder direkt zur Reversen Transkription verwendet werden.

### **3.5.2. Reverse Transkription**

Bei der Reversen Transkription wird die isolierte RNA in mehreren Arbeitsschritten in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA ist Grundlage der darauffolgenden Real-Time-PCR (qPCR).

Um einen hohen Reinheitsgrad bei der Synthese der cDNA zu gewährleisten, wurde zunächst ein DNA-Verdau durchgeführt. Hierfür wurde ein Reaktionsansatz, der aus 8 µl Probe (1 µg RNA in 8 µl Aqua dest.) bestand, mit 1 µl DNase-Puffer sowie 1 µl RNase-freier DNase versetzt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 37°C in einem Thermocycler, anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 1 µl einer Stopplösung (25 mM EDTA) sowie nachfolgender, zehnminütiger Inkubation bei 65°C mit anschließender Kühlung wurde der DNA-Verdau beendet. Nach Abschluss des DNA-Verdaus erfolgte die eigentliche

cDNA-Synthese. Zunächst wurde in jedes Reaktionsgefäß 1 µl eines Random Hexamer Primer-Gemisches pipettiert, d.h. die verwendeten Primer bestanden aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden. Jeder Reaktionsansatz erhielt außerdem einen Mix aus 4 µl 5×-Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix sowie 1 µl A. dest. Es folgte eine Inkubation für fünf Minuten bei 25°C. Nach Abschluss der Inkubation wurde 1 µl Reverse Transkriptase in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und die Proben im Thermocycler automatisch für zehn Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 42°C und zehn Minuten bei 70°C inkubiert. Danach konnten die Proben bei -20°C für mehrere Wochen gelagert oder direkt für die Real-Time-PCR verwendet werden.

### 3.5.3. Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Die qPCR wurde verwendet, um den Einfluss von Empagliflozin auf die mRNA-Expression inflammatorischer Mediatoren zu untersuchen. In dieser Dissertation wurde die qPCR mit dem TaqMan®-System durchgeführt. Dieses System basiert auf zu den Reaktionsansätzen hinzugegebenen TaqMan-Sonden, welche komplementär zu den jeweils gesuchten DNA-Sequenzen sind. Die Sonden verfügen an einem Ende über einen Fluoreszenzfarbstoff, am anderen Ende über einen „Dämpfer“, der das Fluoreszenzsignal unterdrückt. Die Taq-Polymerase weist neben ihrer Polymerase- auch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität auf. Die Sonden hybridisieren an die cDNA und werden zeitgleich zur Synthese des Gegenstranges durch die Exonuklease-Aktivität des Enzyms am 5'-Ende hydrolytisch gespalten, wodurch Fluoreszenz und „Dämpfer“ räumlich voneinander getrennt werden und letztendlich eine messbare Fluoreszenz emittiert wird (Wong und Medrano, 2005).

In dieser Arbeit wurde die Quantifizierung der Genexpression unter Anwendung der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode nach Livak und Schmittgen vorgenommen (Livak und Schmittgen, 2001). Zunächst erfolgt die Messung der Fluoreszenzintensität, von der auf die Menge der anfangs vorhandenen DNA geschlossen werden konnte. Dabei gab der  $C_t$ -Wert die Anzahl der PCR-Zyklen an, bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich vom Hintergrund abhob. Dieser Wert wurde mit dem  $C_t$ -Wert eines *housekeeping gene*, in diesem Fall Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), verglichen und somit auf die Expression der untersuchten Gene geschlossen. Die Bestimmung der  $C_t$ -Werte wurde mindestens in Doppelbestimmung durchgeführt. Für die qPCR wurde die cDNA 1:20 mit A. dest. verdünnt und von dieser Verdünnung 4 µl cDNA sowie 16 µl Master-Mix pro Well auf eine 96-Well qPCR-Halbrandplatte pipettiert.

Der Master-Mix bestand aus:

- 10 µl 2× QuantiNova™ PCR Master Mix
- 1 µl QN Rox Reference Dye
- 1 µl Forward Primer
- 1 µl Reverse Primer
- 1 µl Sonde/Probe
- 2 µl A. dest.

Anschließend wurde die Platte mit einer Folie abgeklebt und die Ansätze kurz zentrifugiert, bevor die Proben automatisch im „7500 Fast Real-Time PCR System“ quantifiziert wurden. Dabei erfolgte zunächst für 15 Sekunden bei 94°C eine Denaturierung der doppelsträngigen cDNA, woraufhin die Temperatur für 60 Sekunden auf 60°C reduziert wurde. Bei diesem Schritt erfolgte das *Annealing*, also die Hybridisierung der Primer an die komplementären cDNA-Sequenzen. Im dritten und letzten Schritt eines Zyklus erfolgte eine Temperatureinstellung auf 72°C. Die Taq-Polymerase konnte nun ausgehend von den Primern die cDNA synthetisieren.

Die während der PCR-Zyklen emittierten Fluoreszenzsignale konnten durch das „7500 Fast Real-Time PCR System“ detektiert und durch die 7500 SDS-Software ausgewertet werden.

## 3.6. Untersuchungen auf Proteinebene

### 3.6.1. Western Blot

Der Western Blot wird verwendet, um ausgewählte Proteine in einem Proteingemisch nachzuweisen. Dazu wird das Proteingemisch zunächst mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) im elektrischen Feld nach der Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Proteine auf einem Gel aufgetrennt. Da das Natriumdodecylsulfat hierbei die Eigenladungen der Proteine überdeckt und diese somit vernachlässigt werden können, sind nach Beendigung der SDS-PAGE die Proteine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht in Banden angeordnet. Im Anschluss erfolgt das Blotting, bei dem die Proteine unter Zuhilfenahme eines senkrecht zum Gel verlaufenden elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Trägermembran übertragen werden. Im letzten Schritt werden die gesuchten Proteine auf der Membran mittels eines spezifischen Primärantikörpers und eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (*horseradish-peroxidase*, Meerrettichperoxidase) detektiert. Dabei bindet der Sekundärantikörper an den F<sub>c</sub>-Teil des Primärantikörpers, der seinerseits an das

nachzuweisende Antigen bindet. Die HRP katalysiert nun die Reaktion von zugesetztem Luminol in dessen oxidierte Form, bei der durch Chemolumineszenz ein messbares Signal entsteht.

In dieser Arbeit wurde die Western Blot-Analyse durchgeführt, um den Einfluss von Empagliflozin auf die *extracellular-regulated kinases 1/2* (ERK<sub>1/2</sub>) und ihrer phosphorylierten Form pERK<sub>1/2</sub> zu untersuchen.

Folgende Schritte wurden durchgeführt:

#### 3.6.1.1. Vorbereitung (Isolierung von Proteinen)

Aus den Reaktionsansätzen der Stimulationsversuche wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweifach mit PBS gespült. Pro Ansatz wurden dann 100 µl Lysispuffer hinzugefügt und die Zellen mit einem sterilen Zellschaber mechanisch vom Boden abgelöst. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren erfolgte die Homogenisierung des Zelllysates, woraufhin sich die Überführung in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße anschloss.

#### 3.6.1.2. Proteinquantifizierung mit dem BCA-Kit

Die Proteinquantifizierung erfolgte mit Hilfe eines BCA-Kits (*bicinchoninic acid*, Bicinchoninsäure). Diese Methode basiert auf der Fähigkeit von Peptidbindungen und einigen Aminosäuren, Cu<sup>2+</sup> in alkalischen pH-Bereichen zu Cu<sup>+</sup> zu reduzieren. Das entstandene Cu<sup>+</sup> bildet anschließend mit BCA einen photometrisch messbaren Farbkomplex.

Zunächst wurde eine BSA-Verdünnungsreihe mit BSA-Konzentrationen von 0 bis 2000 µg/ml erstellt, wobei die Verdünnung in PBS erfolgte. Im Anschluss daran wurde das Arbeitsreagenz hergestellt, welches aus Reagenz A und Reagenz B des BCA-Kits im Verhältnis 50:1 bestand. Je 200 µl dieses Arbeitsreagenzes wurden mit je 10 µl der zu analysierenden Proteinprobe vermischt und auf eine 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die anfangs erstellte BSA-Reihe wurde ebenfalls auf die 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Proteinquantifizierung erfolgte photometrisch bei 562 nm, wobei die mitgeführte BSA-Reihe als Abgleichwert diente. Nach Abschluss der Quantifizierung wurden die Proben so mit SDS-Probenpuffer verdünnt, dass sich eine Proteinkonzentration von 5 µg/ml ergab.

#### 3.6.1.3. Herstellung der Gele

Zwei Glasplatten wurden nach gründlicher Reinigung mit 70% Ethanol in die entsprechende Halterung des Gelgießstandes eingesetzt. Jedes Gel besteht aus einem Trenn- und Sammelgel. Zunächst erfolgte die Herstellung des Trenngels (10% Polyacrylamidgehalt), welches daraufhin zwischen die Glasplatten gegossen und in der Folge mit Propanol überschichtet wurde. Nach 15-minütiger Polymerisationszeit konnte das Propanol abgesaugt werden und die

Sammelgel-Lösung wurde auf das Trenngel gegossen. In das Sammelgel (4,5% Polyacrylamidgehalt) wurde ein Kamm zur Formung der Geltaschen eingesetzt, der nach weiteren 15 Minuten entnommen werden konnte. Das Gel wurde dann ausgespannt und in die mit Elektrodenpuffer gefüllte Laufkammer eingebaut.

#### *3.6.1.4. Elektrophorese und Blotting*

Die Proteinproben wurden mit je 10 µl 3×-Proteinpuffer sowie Bromphenolblau versetzt, für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Je 20 µl aus diesen Proteinproben wurden in die durch den Kamm vorgeformten Taschen des Sammelgels pipettiert, wobei die erste Tasche ausschließlich mit 6 µl eines Proteinstandards befüllt wurde. Anschließend wurde der Deckel auf die Kammer gesetzt und das Laufprogramm (180 V, 340 mA) gestartet. Die Trennung der Proteine war abgeschlossen, nachdem die Bromphenolblau-Linie nach etwa 30-45 Minuten das untere Ende des Trenngels erreicht hatte. Im Anschluss daran wurde die PVDF-Membran für das Blotting vorbereitet. Dafür wurde die Membran für eine Minute in Methanol aktiviert und in der Folge für 15 Minuten in Transferpuffer eingeweicht.

Anschließend wurde die PVDF-Membran auf zwei ebenfalls in Transferpuffer eingeweichte Whatman-Pappen auf der Blotterplatte des „Trans-Blot Turbo“ platziert. Das Gel wurde nach Abschluss der SDS-PAGE aus der Halterung zwischen den Glasplatten entfernt, auf die PVDF-Membran gelegt und wiederum mit zwei Whatman-Pappen bedeckt. Nachdem Luftblasen durch Verstreichen entfernt wurden, wurde die zweite mit Transferpuffer angefeuchtete Blotterplatte aufgesetzt und der Blotting-Vorgang gestartet. Der Proteintransfer vom Gel auf die PVDF-Membran erfolgte entlang eines elektrischen Feldes in Richtung Anode und fand bei 25 V und 1 A für 30 Minuten im „Trans-Blot Turbo“ statt.

#### *3.6.1.5. Immundetektion*

Um die Immundetektion der gesuchten Proteine vorzubereiten wurde die Membran eine Stunde lang in einem 2% Kasein-TBST-Puffer (2% Magermilchpulver in TBST-Puffer) behandelt, wodurch freie Bindungsstellen der Membran geblockt wurden.

Im Anschluss folgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper Anti-MAP Kinase 2/Erk2 (1:1000 in 2% Kasein-TBST-Puffer). Dafür wurden 5 ml dieser Primärantikörper-Lösung auf die PVDF-Membran pipettiert und in einem 50 ml-Röhrchen auf dem Rollmischer über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch anschließendes dreimaliges 15-minütiges Waschen in TBST-Puffer wurden ungebundene Primärantikörper entfernt. Anschließend wurde die Membran mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:10000

in 2% Kasein-TBST-Puffer) für eine Stunde inkubiert und anschließend dreimalig für 15 Minuten in TBST-Puffer gespült.

Zur optischen Darstellung der detektierten Proteinbanden wurden 300 µl des „SuperSignal™ West Femto-Kits“ auf die PVDF-Membran gegeben. Die Lösung bestand zu gleichen Teilen aus Luminol-Reagenz (Solution B des Kits) und Peroxid-Lösung (Solution A des Kits), bei der die Meerrettich-Peroxidase eine Oxidation des Luminols bei gleichzeitiger Reduktion des Wasserstoffperoxids katalysiert, wobei Chemilumineszenz freigesetzt wird. Diese wurde mit Hilfe des Chemilumineszenz-Detektors „Fusion Vilber Lourmat“ detektiert und mit der Software „FusionCapt Advance“ quantifiziert.

Um auf derselben Membran die Inkubation mit dem Antikörper gegen phosphoryliertes ERK<sub>1/2</sub> durchzuführen, wurden zunächst die gebundenen Antikörper von der Membran entfernt. Dies erfolgte mit dem sogenannten Strippen. Dazu wurde die PVDF-Membran bei Raumtemperatur unter Bewegung für zehn Minuten mit 0,2 M NaOH gespült und anschließend für mindestens eine Stunde in 2% Kasein-TBST-Puffer geschwenkt. Darauf folgend wurde die Membran nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit dem anderen Primärantikörper (Rabbit Phospho-p44/42 MAPK (ERK<sub>1/2</sub>), verdünnt 1:1000 in 2% Kasein-TBST-Puffer) behandelt, um das phosphorylierte ERK<sub>1/2</sub> in oben beschriebener Weise zu detektieren und anschließend zu quantifizieren.

### **3.6.2. Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis vom Transkriptionsfaktor NFκB**

Der Transkriptionsfaktor NFκB, der in Mikroglia und vielen anderen Zellen in die Transkription inflammatorisch relevanter Gene eingebunden ist, transloziert nach seiner Aktivierung vom Zytoplasma in den Zellkern. Anhand der Lokalisation des NFκB im Zellkern bzw. Zytoplasma wurde daher in dieser Arbeit auf seine Transkriptionsaktivität geschlossen.

Zum Nachweis der Lokalisation des NFκB wurden die auf Deckgläser ausgesäten Mikroglia nach in Kapitel 3.2 beschriebener Weise stimuliert und danach in eiskaltem Azeton fixiert sowie drei Mal mit PBS gespült. Im nächsten Schritt wurden die freien Bindungsstellen für 30 Minuten in einer BSA-Lösung (1% BSA in PBS) bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde die Blockier-Lösung abpipettiert und die Zellen für 60 Minuten mit je 50 µl des 1:50 in Antibody Diluent verdünnten Primärantikörpers (Anti-NFκB (p65)) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Deckgläser drei Mal mit PBS gespült. Es folgte die Hinzugabe von je 100 µl des Sekundärantikörpers (Alexa Fluor A 31620), welcher 1:700 in Antibody Diluent verdünnt war. Nach einer 45-60-minütigen

Inkubation, welche bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss erfolgte, wurden die Deckgläser erneut dreimalig mit PBS gewaschen. Zur Detektion der Zellkerne wurde jedes Deckglas mit 50 µl Bisbenzimid (gelöst in PBS), das DNA anfärbt, versetzt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss. Das Bisbenzimid wurde danach abpipettiert und die Deckgläser drei Mal mit PBS gewaschen und abschließend in A. dest. gespült. Das Eindecken der Deckgläser erfolgte luftblasenfrei mit ImmuMount-Eindeckmedium. Dafür wurden die Deckgläser auf Objektträger überführt, auf denen sich je ein Tropfen ImmuMount befand. Nach Aushärten des Eindeckmediums erfolgte die Analyse am Fluoreszenzmikroskop.

### 3.6.3. Sandwich-ELISA

Der Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist neben dem Western-Blot eine weitere Methode zum gezielten Proteinnachweis in einem Proteingemisch. Dazu werden zwei Antikörper verwendet, welche an unterschiedlichen Stellen an das gesuchte Protein binden. Zunächst bindet ein Capture-Antikörper das nachzuweisende Protein aus dem Zellkulturüberstand. Nach Entfernen des restlichen Überstandes wird der zweite, sogenannte Detection-Antikörper hinzugegeben. Dieser bindet ebenfalls das Protein, allerdings an einer anderen Bindungsstelle. Der Sekundärantikörper wird anschließend zudem mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert, welches über eine Reaktion mit ebenfalls hinzugegebenem Tetramethylbenzidin (TMB) und Schwefelsäure für einen Farbumschlag sorgt. Die Intensität des Farbumschlages kann photometrisch quantifiziert werden und gibt Aufschluss über die Menge des gesuchten Proteins.

Um die IL-6-, TNF- $\alpha$ - und IL-10-Freisetzung aus den Mikroglia zu quantifizieren, wurden die Zellkulturüberstände der Stimulationsversuche mittels Sandwich-ELISA untersucht. Hierfür wurden zunächst je 100 µl des entsprechenden Capture-Antikörpers in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Antikörper gegen IL-6 waren dabei im Verhältnis 1:125 in PBS, jene gegen TNF- $\alpha$  und IL-10 1:250 in PBS verdünnt. Die so beschichtete 96-Well-Platte wurde anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die Vertiefungen der Platte fünf Mal mit dem ELISA-Waschpuffer gewaschen. Es folgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen, indem jede Vertiefung der 96-Well-Platte mit 200 µl Assay Diluent (PBS mit 10% FKS) versetzt und die Platte dann bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert wurde. Im Anschluss daran erfolgte erneutes fünfmaliges Waschen sowie die Zugabe der Zellkulturüberstände. Hierbei wurden bei der Untersuchung auf TNF- $\alpha$  die Versuchsansätze, die LPS enthielten 1:10 verdünnt, jene Versuchsansätze ohne LPS blieben

unverdünnt. Bei der Untersuchung auf IL-6 erfolgte keine Verdünnung der Kulturüberstände. Zur Untersuchung der IL-10-Proteinmenge wurden alle Versuchsansätze 1:10 verdünnt. Anschließend wurden je 100 µl der Zellkulturüberstände in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der 96-Well-Platte pipettiert. Es erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur (TNF- $\alpha$ , IL-10) bzw. 37°C (IL-6), die von erneutem fünfmaligem Waschen beendet wurde. Nach Hinzugabe des Biotin-konjugierten Detection-Antikörpers, verdünnt in Assay Diluent, wurde die Platte erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ein erneuter Waschschrift entfernte überschüssige Detection-Antikörper. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 100 µl HRP-konjugiertem Streptavidin (1:250 in Assay Diluent) befüllt und die 96-Well-Platte für 30 Minuten inkubiert, wobei das Streptavidin eine hochaffine Bindung an das Biotin des Detection-Antikörpers herstellte. Nach erneutem Waschen der Vertiefungen erfolgte die Zugabe von je 100 µl TMB-Substrat, welches zu gleichen Teilen aus TMB (0,4 g/l in Wasser) und Wasserstoffperoxid (0,02%) bestand. Es folgte eine 30-minütige Inkubation unter Lichtabschirmung, woraufhin durch die Hinzugabe von je 50 µl Schwefelsäure ein Farbumschlag induziert wurde. Die photometrische Auswertung fand bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 550 nm statt und wurde mit dem Gerät GENios der Firma Tecan durchgeführt.

### **3.7. Statistische Auswertung**

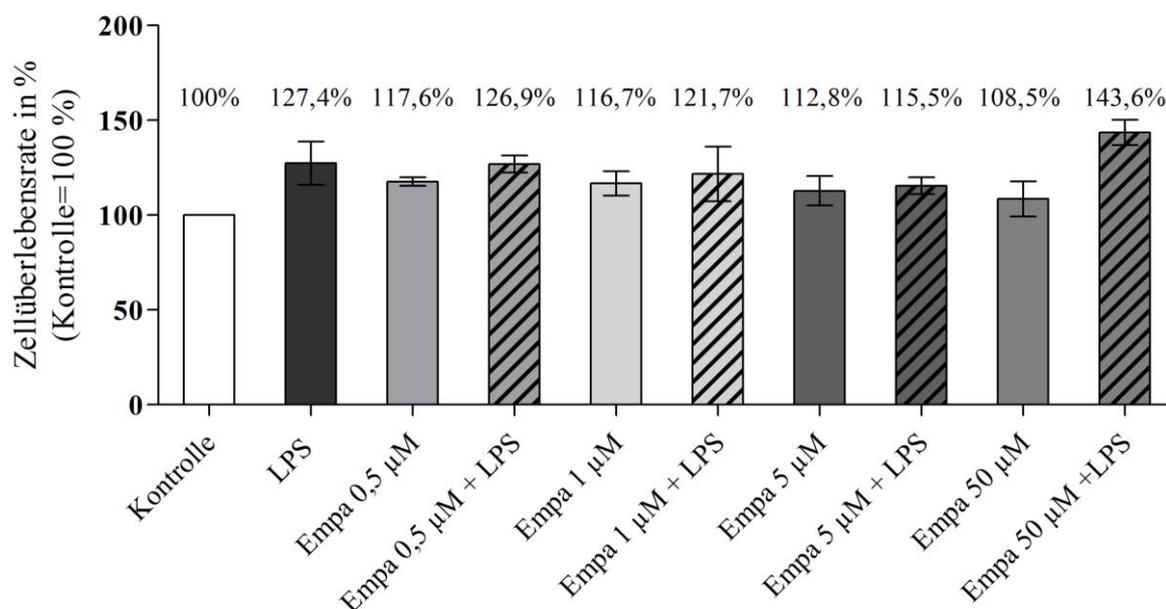
Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism (Version 5.04) verwendet. Die Berechnung erfolgte durch Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließender Bonferroni-Korrektur, wobei eine Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  als signifikant angenommen wurde. Alle Experimente erfolgten in mindestens dreifacher Ausführung.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Einfluss von Empagliflozin auf das Zellüberleben der Mikroglia

Um eine zytotoxische Wirkung der in dieser Arbeit eingesetzten Empagliflozin-Konzentrationen auszuschließen, wurde ein MTT-Test angewendet. Bei diesem Verfahren wird von der Menge an intrazellulär gebildetem Formazan auf den Anteil vitaler Zellen geschlossen, da das Formazan nur in vitalen Zellen mit entsprechender Enzymausstattung gebildet wird.

Es wurden verschiedene Empagliflozin-Konzentrationen untersucht und die Zellüberlebensrate in Prozent angegeben, wobei die Überlebensrate der unbehandelten Kontrollzellen auf 100 % festgelegt wurde. Alle Einzel- als auch Simultanstimulationen erhöhten die Zellüberlebensrate im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen. Daraus lässt sich schließen, dass die Substanz in keiner der untersuchten Konzentrationen zytotoxisch wirkt. In den sich anschließenden Untersuchungen wurden sowohl die höchste als auch die geringste im MTT-Test untersuchte Empagliflozin-Konzentration (nachfolgend in den Abbildungen Empa 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. Empa 50  $\mu\text{M}$  genannt) verwendet, um einen möglichen konzentrationsabhängigen Effekt deutlich erkennen zu können.



**Abbildung 4.1.: Einfluss von Empagliflozin auf das Zellüberleben der Mikroglia.** Der MTT-Test zeigte, dass Empagliflozin im Bereich von 0,5-50  $\mu\text{M}$  allein oder auch in Simultanstimulation mit LPS nach einer 24-stündigen Inkubation keine zytotoxische Wirkung hatte. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=3$ ).

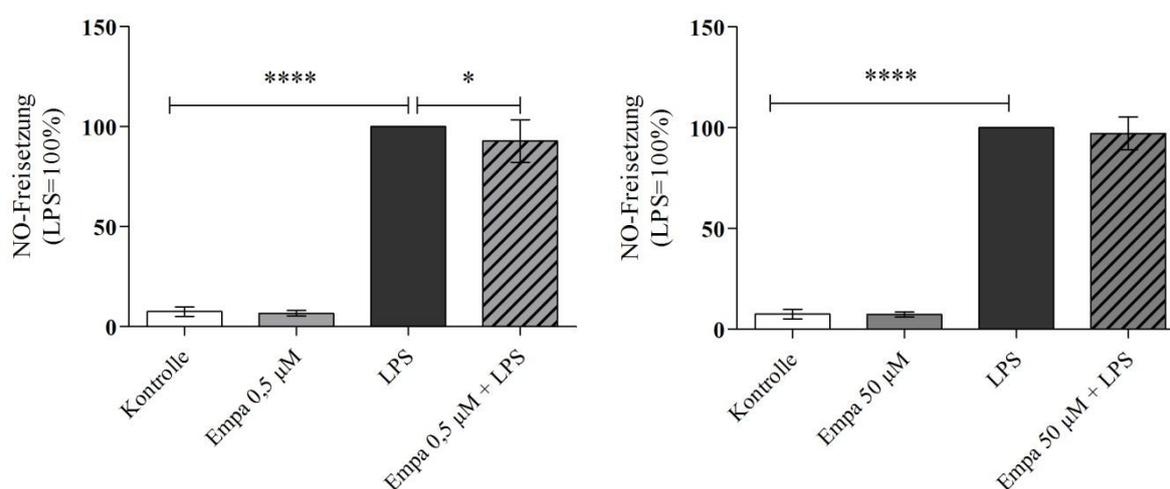
## 4.2. Einfluss von Empagliflozin auf die Radikalbildung

Eine Beteiligung Stickstoffmonoxids (NO) an der Pathogenese des M. Parkinson wurde in Kapitel 1.2.2. dargelegt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Empagliflozin die Freisetzung von NO aus LPS-aktivierten Mikroglia sowie die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) beeinflusst.

### 4.2.1. NO-Freisetzung

Die Mikroglia wurden für 24 Stunden stimuliert, NO wurde anschließend indirekt mittels Griess-Reagenz gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2. dargestellt, wobei die NO-Freisetzung aus den allein mit LPS stimulierten Mikroglia auf 100 % genormt wurde. Die Werte der übrigen Stimulationsversuche wurden relativ zu den Ergebnissen der mit LPS behandelten Zellen angegeben.

Die Inkubation mit Empagliflozin allein zeigte nach 24 Stunden keine Veränderung der NO-Freisetzung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Durch LPS-Stimulation wurde die NO-Freisetzung der Mikroglia in allen Versuchen signifikant gesteigert (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Durch gleichzeitige Inkubation mit 0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin und LPS erfolgte eine signifikante Reduktion der durch LPS stark erhöhten NO-Freisetzung um 7,19 % (\* $p \leq 0,05$ ). Bei Steigerung der Konzentration auf 50  $\mu\text{M}$  zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der NO-Freisetzung.



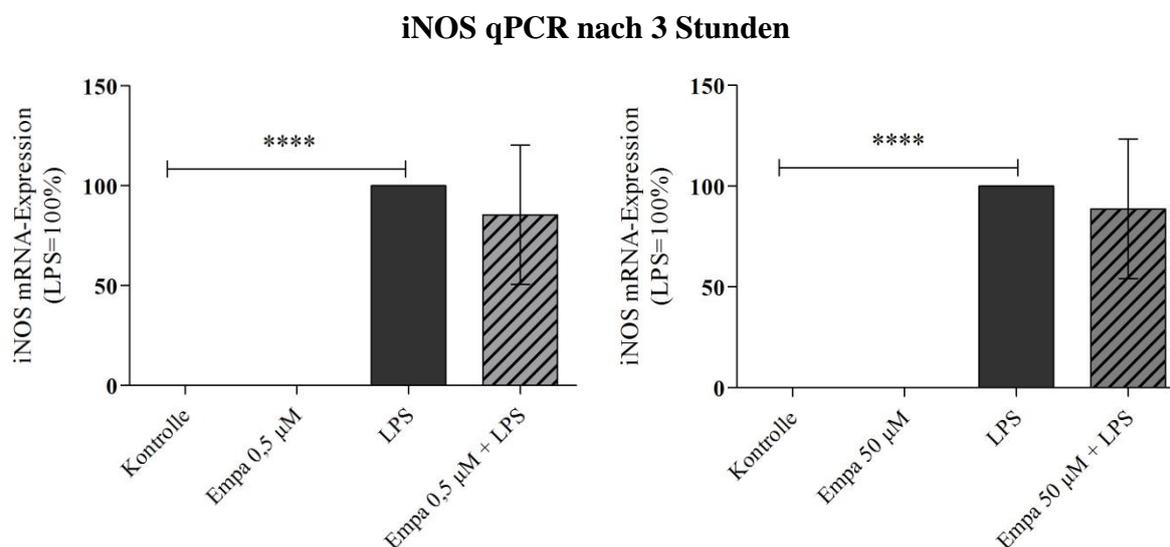
**Abbildung 4.2.: Einfluss von Empagliflozin auf die NO-Freisetzung nach 24 Stunden.** Die NO-Freisetzung wurde nach 24 Stunden indirekt mittels Griess-Reagenz gemessen. LPS erhöhte in allen Versuchen die NO-Freisetzung aus Mikroglia im Vergleich zu den Kontrollen. Eine Inkubation von 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin mit LPS reduzierte die NO-Freisetzung leicht um 7,19 % (0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin) bzw. 2,83 % (50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=12; \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

#### 4.2.2. iNOS-mRNA-Synthese

Die mRNA-Expression der iNOS wurde in dieser Arbeit nach drei- bzw. 24-stündiger Stimulation mittels qPCR quantifiziert. Die iNOS-mRNA-Expressionsrate bei LPS-stimulierten Mikroglia wurde auf 100 % festgelegt und die Ergebnisse in Relation dazu angegeben. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.3. (Versuche nach drei Stunden) und 4.4. (Versuche nach 24 Stunden) dargestellt. Die iNOS-mRNA-Synthese zeigte sowohl nach drei als auch nach 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und den allein mit Empagliflozin behandelten Zellen. Nach LPS-Stimulation wurde die Expressionsrate in allen durchgeführten Versuchen signifikant gesteigert ( $****p \leq 0,0001$ ).

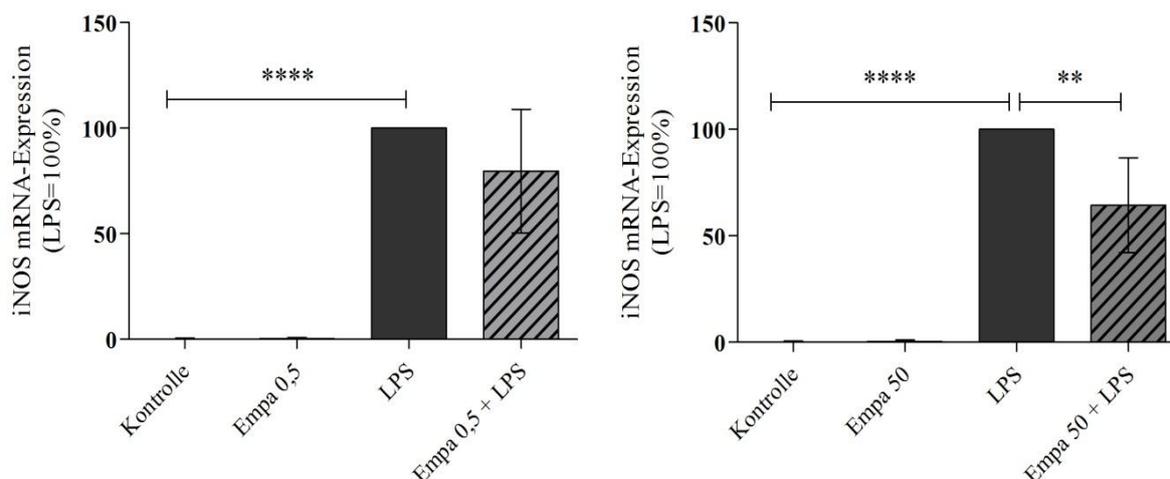
Die Simultanstimulation mit LPS und Empagliflozin zeigte nach drei Stunden im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation eine insgesamt leichte Minderung der Expressionsrate um 14,5 % (0,5  $\mu$ M) bzw. 11,28 % (50  $\mu$ M).

Nach 24 Stunden ergaben die Versuche mit 0,5  $\mu$ M Empagliflozin eine Reduktion um 20,36 %. Bei Simultanstimulation mit LPS und 50  $\mu$ M Empagliflozin wurde die iNOS-mRNA-Expressionsrate signifikant um 35,61 % gesenkt ( $**p \leq 0,01$ ).



**Abbildung 4.3.: Einfluss von Empagliflozin auf die iNOS-mRNA-Expression in Mikroglia nach drei Stunden.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die iNOS-mRNA-Expression signifikant. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin und LPS wurde diese um 14,5 % (0,5  $\mu$ M Empagliflozin) bzw. 11,28 % (50  $\mu$ M Empagliflozin) reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $****p \leq 0,0001$ ;  $n=5$ ).

## iNOS qPCR nach 24 Stunden



**Abbildung 4.4.: Einfluss von Empagliflozin auf die iNOS-mRNA-Expression in Mikroglia nach 24 Stunden.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die iNOS-mRNA-Expression signifikant. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin und LPS wurde diese um 20,36 % (0,5 µM Empagliflozin) bzw. 35,61 % (50 µM Empagliflozin) reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ;  $n=5$ ).

### 4.3. Einfluss von Empagliflozin auf die Genexpression proinflammatorischer Zytokine

In dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression der proinflammatorische Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in LPS-aktivierten Mikroglia nach drei und 24 Stunden mittels qPCR unter dem Einfluss von Empagliflozin untersucht. Da eine Stimulation mit LPS zu einer Mikroglia-Aktivierung und in der Folge zur Erhöhung der Genexpression proinflammatorischer Zytokine führt, wurde die mRNA-Synthese nach LPS-Stimulation auf 100 % festgelegt und die mRNA-Expression aus den übrigen Stimulationsansätzen in Relation dazu angegeben.

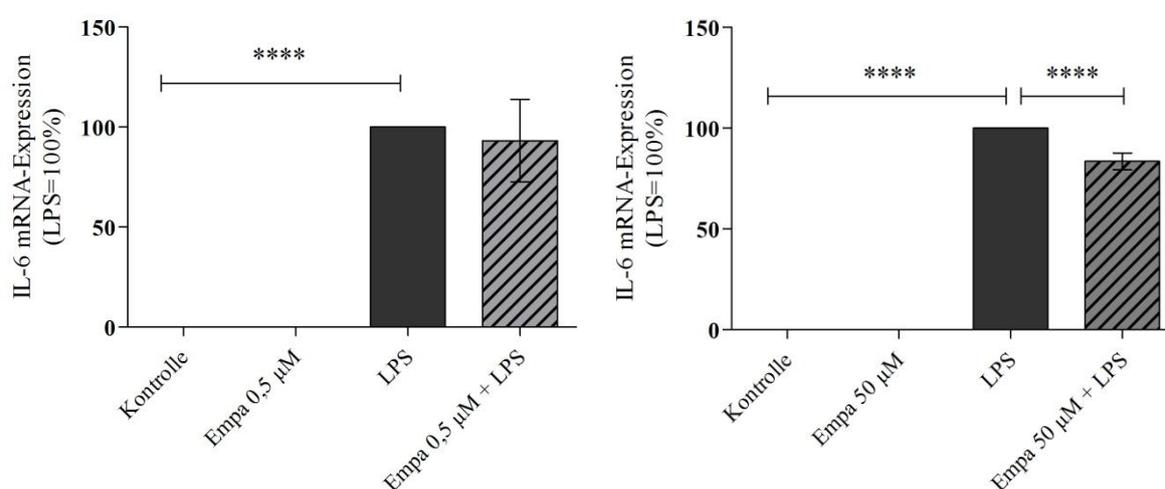
#### 4.3.1. IL-6-mRNA-Synthese

Eine Inkubation mit 0,5 bzw. 50 µM Empagliflozin ergab sowohl bei den drei- als auch bei den 24-stündigen Versuchen keine Veränderungen der IL-6-mRNA-Synthese im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen. Nach einer Stimulationszeit von drei Stunden erfolgte nach LPS-Aktivierung der Mikroglia eine signifikante Steigerung der IL-6-mRNA-Expression (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Eine gemeinsame Inkubation von LPS und 0,5 µM Empagliflozin führte zu einer leichten Reduktion der LPS-induzierten mRNA-Expression um 6,79 %. Die dreistündige, simultane Stimulation mit LPS und 50 µM Empagliflozin erbrachte eine

signifikante Reduktion der IL-6-mRNA-Expression um 16,5 % (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Die Ergebnisse der dreistündigen Stimulationsversuche sind in Abbildung 4.5. dargestellt.

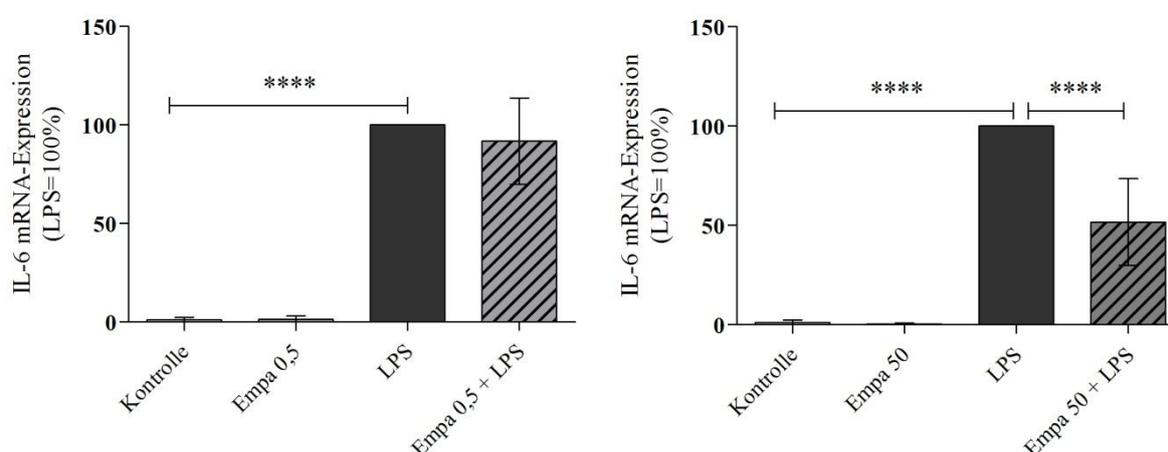
Auch nach 24 Stunden war die IL-6-mRNA-Menge in den Kontrollen sowie den nur mit Empagliflozin stimulierten Versuchsansätzen signifikant niedriger im Vergleich zu den mit LPS stimulierten Mikroglia (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Die Zugabe von 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin zu den LPS-stimulierten Zellen ergab eine Reduktion der IL-6-Expression um 8,15 % bzw. 48,26 % (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Die Ergebnisse der 24-stündigen Stimulationsversuche sind in Abbildung 4.6. dargestellt.

### IL-6 qPCR nach 3 Stunden



**Abbildung 4.5.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-6-mRNA-Expression in Mikroglia nach drei Stunden.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die IL-6-mRNA-Expression signifikant. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin und LPS wurde diese bei Verwendung von 0,5  $\mu\text{M}$  um 6,79 % und bei 50  $\mu\text{M}$  um 16,5 % reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ;  $n=5$ ).

### IL-6 qPCR nach 24 Stunden

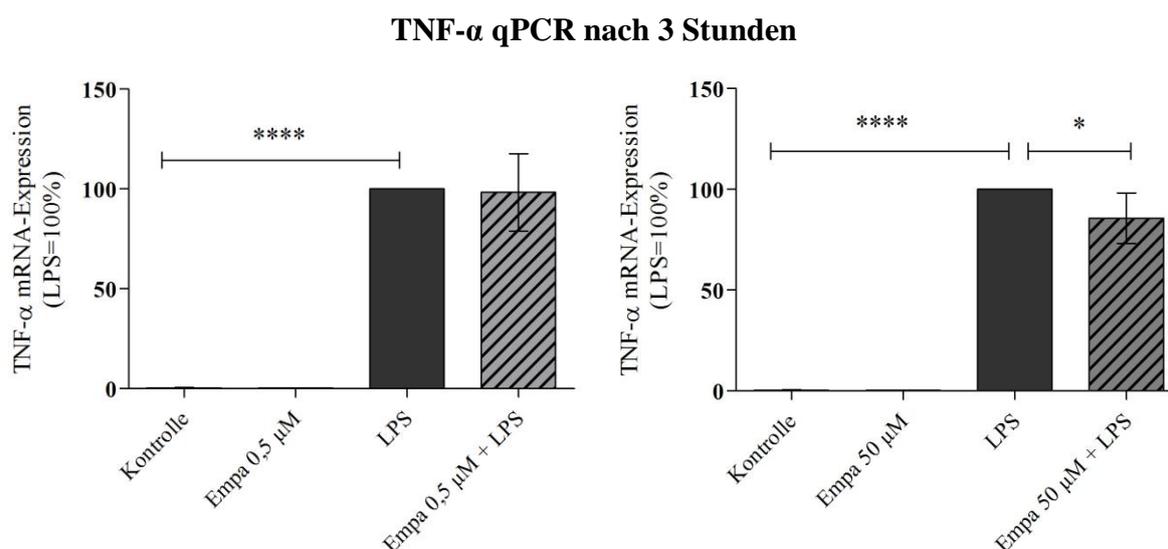


**Abbildung 4.6.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-6-mRNA-Expression in Mikroglia nach 24 Stunden.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die IL-6-mRNA-Expression signifikant. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin und LPS wurde diese um 8,15 % (0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin) bzw. 48,26 % (50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin) reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ;  $n=5$ ).

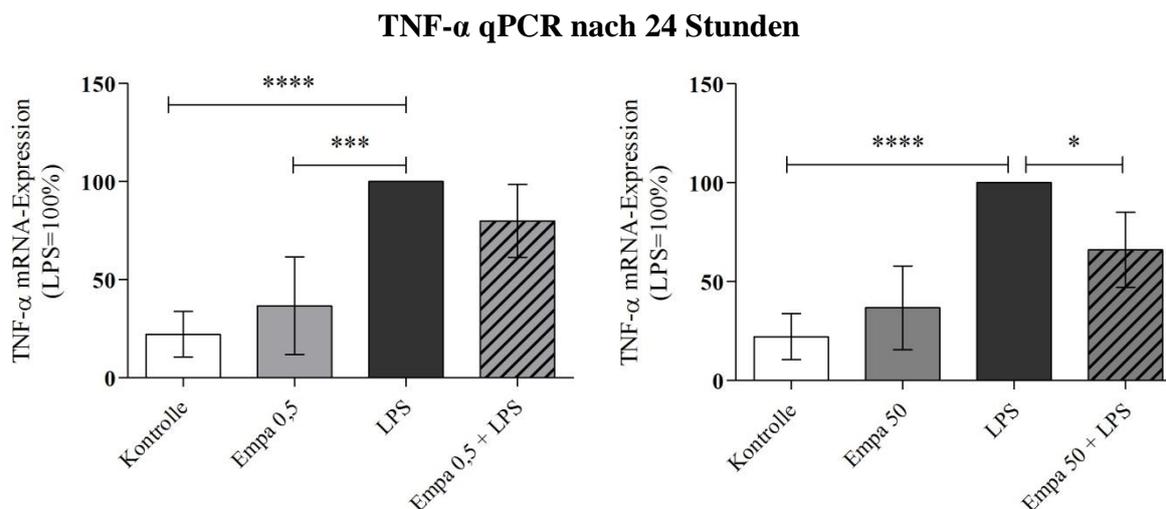
### 4.3.2. TNF- $\alpha$ -mRNA-Synthese

Die mRNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  wurde mittels qPCR nach drei bzw. 24 Stunden quantifiziert. Nach dreistündiger Stimulation war die mRNA-Menge in den Kontrollzellen sowie in den allein mit Empagliflozin behandelten Ansätzen signifikant niedriger als in den nur mit LPS stimulierten Zellen (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Die gleichzeitige Stimulation von Empagliflozin und LPS ergab nach drei Stunden bei Verwendung von 0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin keine Änderung der TNF- $\alpha$ -Expression im Vergleich zu den LPS-aktivierten Mikroglia. Bei Verwendung von 50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin wurde die Expressionsrate signifikant um 14,34 % gesenkt (\* $p \leq 0,05$ ). Die Ergebnisse der dreistündigen Stimulationsversuche sind in Abbildung 4.7. dargestellt.

Nach 24-stündiger Stimulation war bereits in den unstimulierten oder allein mit Empagliflozin stimulierten Ansätzen eine leicht erhöhte TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression feststellbar. In der Kontrolle betrug die mRNA-Synthese bereits 22,24 %, darüber hinaus bewirkte eine alleinige Inkubation mit Empagliflozin eine Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Expressionsrate auf 36,72 % (0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin) bzw. 36,8 % (50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin). Die Stimulation mit LPS führte zu einer signifikanten Erhöhung der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression. Durch gleichzeitige Stimulation mit LPS und 0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin wurde diese Erhöhung der mRNA-Synthese um 20,01 % reduziert. Die Simultanstimulation mit LPS und 50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin ergab eine signifikante Reduktion der TNF- $\alpha$ -mRNA-Synthese um 33,88 % (\* $p \leq 0,05$ ). Die Ergebnisse der 24-stündigen Stimulationsversuche sind in 4.8. dargestellt.



**Abbildung 4.7.: Einfluss von Empagliflozin auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression in Mikroglia nach drei Stunden.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression signifikant. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin und LPS wurde diese nicht verändert (0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin) bzw. um 14,34 % (50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin) reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p \leq 0,05$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ;  $n=5$ ).



**Abbildung 4.8.: Einfluss von Empagliflozin auf die TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression in Mikroglia nach 24 Stunden.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die TNF- $\alpha$ -Expression signifikant. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin und LPS wurde diese um 20,01 % (0,5  $\mu$ M Empagliflozin) bzw. 33,88 % (50  $\mu$ M Empagliflozin) reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ;  $n=5$ ).

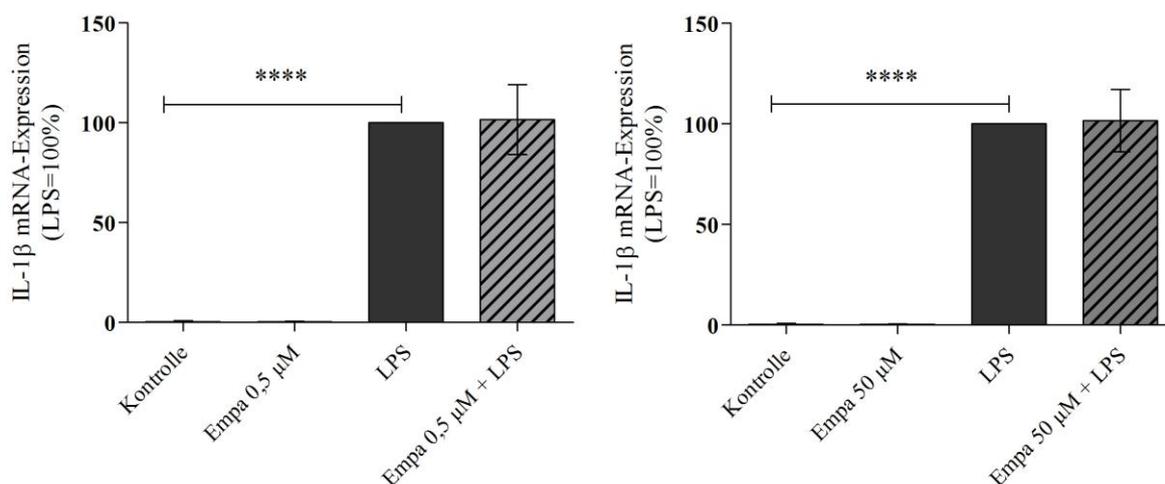
### 4.3.3. IL-1 $\beta$ -mRNA-Synthese

Die Quantifizierung der IL-1 $\beta$ -Expression ergab nach drei und 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppen und den allein mit 0,5  $\mu$ M bzw. 50  $\mu$ M Empagliflozin stimulierten Zellen. Eine LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die Basisexpressionsrate in beiden untersuchten Zeiträumen signifikant (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

Nach dreistündiger Simultaninkubation von 0,5 bzw. 50  $\mu$ M Empagliflozin mit LPS ergab die qPCR eine leichte Erhöhung der Genexpression um 1,5 % im Vergleich zu den mit LPS stimulierten Mikroglia. Die Ergebnisse der dreistündigen Stimulationsversuche sind in Abbildung 4.9. veranschaulicht.

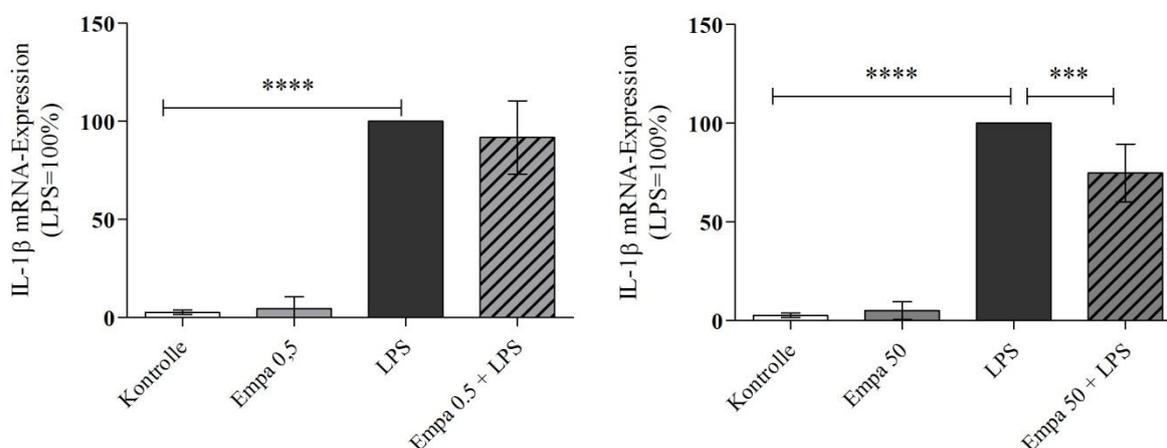
Die Durchführung der 24-stündigen Versuche erbrachte bei Simultaninkubation von 0,5  $\mu$ M Empagliflozin zusammen mit LPS eine leichte Minderung der mRNA-Synthese um 8,19 %. Eine Steigerung der Empagliflozin-Konzentration auf 50  $\mu$ M erbrachte eine deutlichere Reduktion der IL-1 $\beta$ -Expression um 25,19 % (\*\*\* $p \leq 0,001$ ). Die Ergebnisse der 24-stündigen Versuche sind in Abbildung 4.10. dargestellt.

### IL-1 $\beta$ qPCR nach 3 Stunden



**Abbildung 4.9.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression in Mikroglia nach drei Stunden.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die IL-1 $\beta$ -Expression signifikant. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin (0,5 und 50  $\mu$ M) und LPS wurde diese um 1,5 % erhöht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ;  $n=5$ ).

### IL-1 $\beta$ qPCR nach 24 Stunden



**Abbildung 4.10.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression in Mikroglia nach 24 Stunden.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die IL-1 $\beta$ -Expression signifikant. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin und LPS wurde diese um 8,19 % (0,5  $\mu$ M Empagliflozin) bzw. 25,19 % (50  $\mu$ M Empagliflozin) reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ;  $n=5$ ).

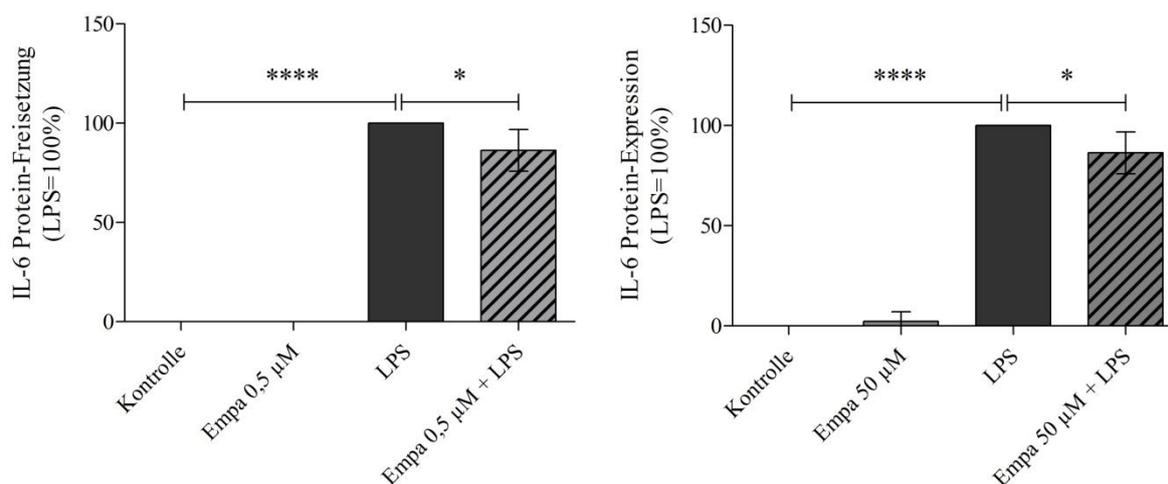
## 4.4. Einfluss von Empagliflozin auf die Zytokin-Freisetzung aus Mikroglia

In dieser Arbeit erfolgte die Analyse der Zellkulturüberstände der Stimulationsversuche mittels ELISA, wobei die Freisetzung der proinflammatorisch wirksamen Zytokine IL-6 und

TNF- $\alpha$  sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 aus Mikroglia in den Überstand nach 24 Stunden gemessen wurde. In Analogie zu den bereits gezeigten Ergebnissen wurden die Protein-Expressionsraten nach LPS-Stimulation auf 100 % genormt und die Protein-Expression der übrigen Stimulationsansätze in Relation dazu angegeben.

#### 4.4.1. IL-6-Freisetzung

Nach 24 Stunden Stimulationszeit war die IL-6-Sekretion aus den Kontroll- bzw. Empagliflozin-Mikroglia signifikant geringer als in den mit LPS stimulierten Zellen (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Die Zugabe von 0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin zu den LPS-aktivierten Mikroglia führte eine signifikante Reduzierung der IL-6-Freisetzung um 13,68 % herbei (\* $p \leq 0,05$ ). Eine Erhöhung der Empagliflozin-Konzentration auf 50  $\mu\text{M}$  erbrachte ein ähnliches Ergebnis: Die Reduktion betrug hier 13,62 % (\* $p \leq 0,05$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11. dargestellt.

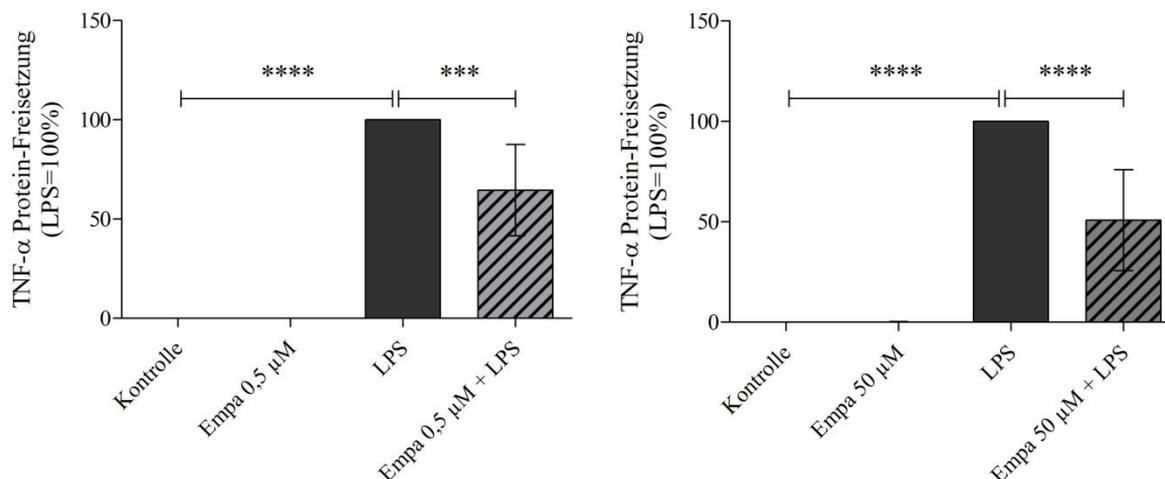


**Abbildung 4.11.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-6-Freisetzung aus Mikroglia nach 24 Stunden.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die IL-6-Freisetzung aus den Mikroglia signifikant. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin und LPS wurde diese um 13,68 % (0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin) bzw. 13,62 % (50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin) reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ; \* $p \leq 0,05$ ;  $n=4$ ).

#### 4.4.2. TNF- $\alpha$ -Freisetzung

Bei den durchgeführten Versuchen war, verglichen mit den LPS-aktivierten Zellen, in den Kontrollansätzen eine signifikant niedrigere TNF- $\alpha$ -Sekretion in den Überstand feststellbar (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Auch die Inkubation mit Empagliflozin alleine erbrachte keine Steigerung der TNF- $\alpha$ -Freisetzung. Die Simultaninkubation von 0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin mit LPS reduzierte die TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Mikroglia um 35,40 % (\*\*\* $p \leq 0,001$ ). Die Erhöhung der Empagliflozin-Konzentration auf 50  $\mu\text{M}$  verstärkte diese Reduktion, welche bei dieser

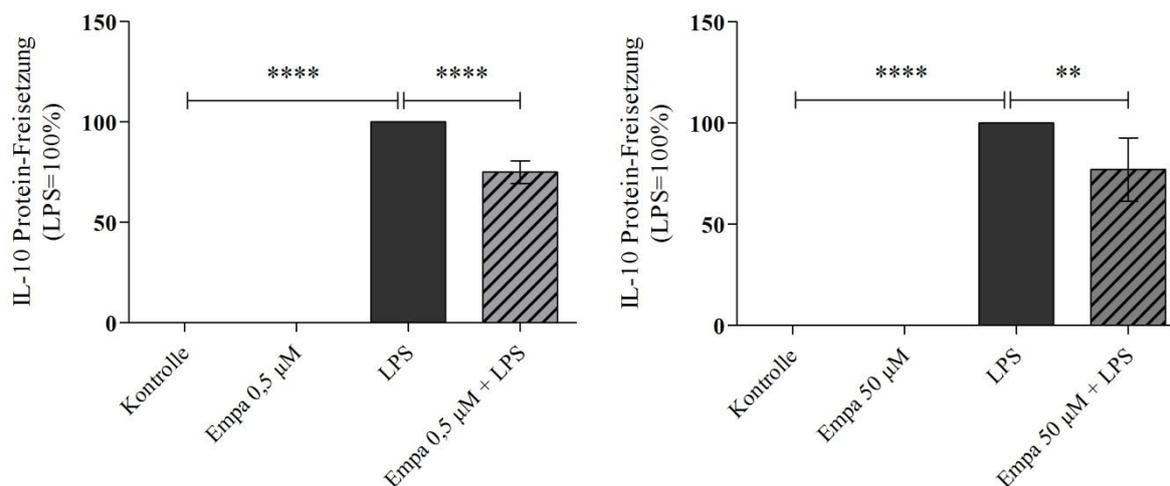
Konzentration 49,23 % betrug ( $****p \leq 0,0001$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.12. dargestellt.



**Abbildung 4.12.: Einfluss von Empagliflozin auf die TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Mikroglia nach 24 Stunden.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus den Mikroglia signifikant. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin und LPS wurde diese um 35,40 % (0,5  $\mu$ M Empagliflozin) bzw. 49,23 % (50  $\mu$ M Empagliflozin) reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $***p \leq 0,001$ ;  $****p \leq 0,0001$ ;  $n=6$ ).

#### 4.4.3. IL-10-Freisetzung

In Abbildung 4.13. sind die Ergebnisse, wie Empagliflozin die IL-10-Freisetzung aus Mikroglia beeinflusst, grafisch dargestellt. Sowohl 0,5 als auch 50  $\mu$ M Empagliflozin erbrachten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Änderung der IL-10-Freisetzung in den Zellkulturüberstand. Erst die Inkubation mit LPS steigerte diese deutlich ( $****p \leq 0,0001$ ). Die gleichzeitige Stimulierung mit Empagliflozin und LPS erbrachte im Vergleich zu den LPS-Stimulationen eine signifikante Minderung der IL-10-Freisetzung. Bei Verwendung von 0,5  $\mu$ M Empagliflozin betrug diese Reduktion 24,90 % ( $****p \leq 0,0001$ ), mit 50  $\mu$ M Empagliflozin 22,97 % ( $**p \leq 0,01$ ).



**Abbildung 4.13.: Einfluss von Empagliflozin auf die IL-10-Freisetzung aus Mikroglia nach 24 Stunden.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia erhöhte die IL-10-Freisetzung aus den Mikroglia signifikant. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin und LPS wurde diese um 24,90 % (0,5 µM Empagliflozin) bzw. 22,97 % (50 µM Empagliflozin) reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ;  $n=5$ )

#### 4.5. Untersuchung potentieller Signalwege von Empagliflozin

In die komplexe Regulation der mikroglialen Inflammation sind u.a. die *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK<sub>1/2</sub>) involviert. In dieser Arbeit wurden daher die MAP-Kinasen ERK<sub>1/2</sub> sowie deren aktivierte Formen pERK<sub>1/2</sub> aus mit LPS und/oder Empagliflozin inkubierten Mikroglia isoliert. In der Folge wurde das Verhältnis der mittels Western Blot gemessenen Bandenintensitäten von pERK<sub>1/2</sub> zu ERK<sub>1/2</sub> gebildet, was Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad dieser Kaskade zulässt. Dabei war eine Erhöhung des pERK<sub>1/2</sub>-Anteils gleichbedeutend mit einer Aktivierung des Signalweges.

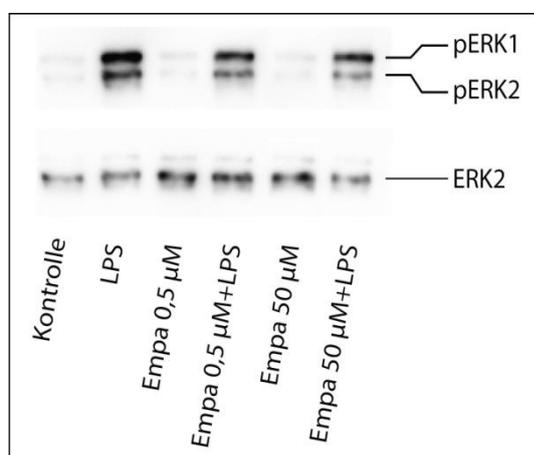
Neben intrazellulären Proteinkinasen regulieren Transkriptionsfaktoren, insbesondere der Transkriptionsfaktor NFκB, Entzündungsprozesse in diversen Zellen, darunter auch in Mikroglia. Mittels immunzytochemischer Färbungen wurde daher zusätzlich der Transkriptionsfaktor NFκB dargestellt und anhand seiner Lokalisation die inflammatorische Transkriptionsaktivität der Mikroglia beurteilt. Eine starke Anreicherung des NFκB in den Zellkernen der Mikroglia wurde in dieser Arbeit als Zeichen einer vermehrten inflammatorischen Transkriptionsaktivität gewertet. Es wurde untersucht, ob Empagliflozin das Verteilungsmuster des NFκB beeinflusst.

##### 4.5.1. Beeinflussung des ERK<sub>1/2</sub>-Signalweges durch Empagliflozin

Der Nachweis der MAP-Kinasen ERK<sub>1/2</sub> und pERK<sub>1/2</sub> erfolgte mittels Western Blot nach 30-minütiger Stimulation. Der Quotient der Bandenintensitäten aus den nur mit LPS stimulierten

Mikroglia wurde auf 100 % festgelegt und die Quotienten der übrigen Stimulationsversuche im Verhältnis dazu angegeben.

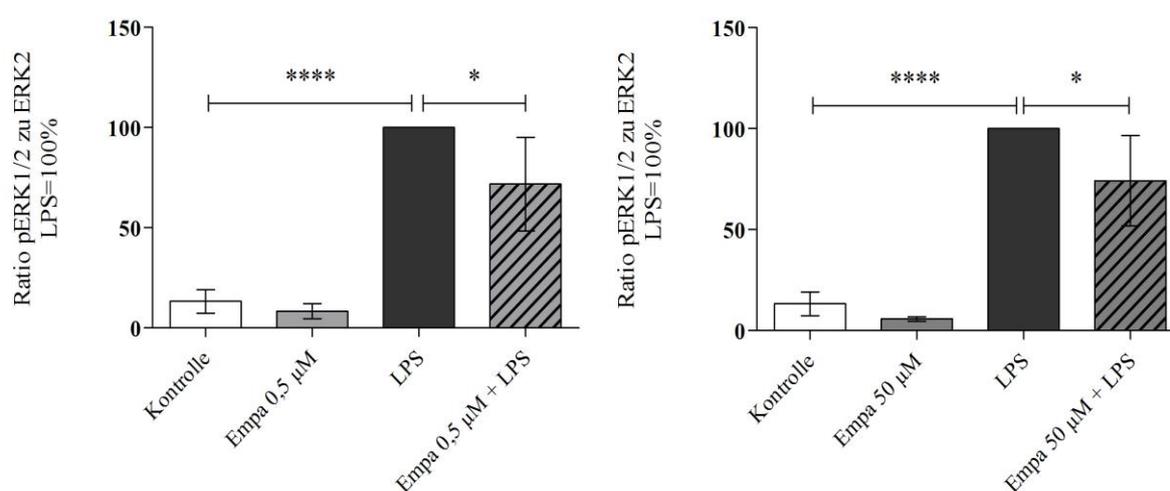
Nach 30-minütiger Stimulation war der Anteil von phosphoryliertem ERK<sub>1/2</sub> in den Kontrollen sowie nur mit Empagliflozin behandelten Ansätzen signifikant geringer als in den mit LPS stimulierten Mikroglia (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Die Simultaninkubation von LPS mit 0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin ergab eine signifikante Reduktion der pERK<sub>1/2</sub>-Aktivierung um 28,22 % (\* $p \leq 0,05$ ). Die höhere Empagliflozin-Konzentration zeigte in der Simultaninkubation mit LPS ebenfalls eine signifikante Verringerung des pERK<sub>1/2</sub>-Anteils um 25,77 % (\* $p \leq 0,05$ ). Die Ergebnisse der 30-minütigen Stimulationsversuche sind in Abbildung 4.14. dargestellt.



**Abbildung 4.14.: Repräsentativer Western-Blot nach 30-minütiger Stimulation.**

Die Western Blots dienen zur Untersuchung einer möglichen Modulation des ERK<sub>1/2</sub>-Signalweges in Mikroglia durch Empagliflozin. Die Intensitäten der Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet.

#### Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen



**Abbildung 4.15.: Einfluss von Empagliflozin auf die ERK<sub>1/2</sub>-Phosphorylierung in Mikroglia nach 30 Minuten.** Die LPS-Aktivierung der Mikroglia bewirkte einen starken Anstieg des pERK<sub>1/2</sub>-Anteils. Durch Simultaninkubation mit Empagliflozin und LPS wurde dieser um 28,22 % (0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin) bzw. 25,77 % (50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin) reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\* $p \leq 0,05$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ; n=4).

#### 4.5.2. Beeinflussung des NFκB-Signalweges durch Empagliflozin

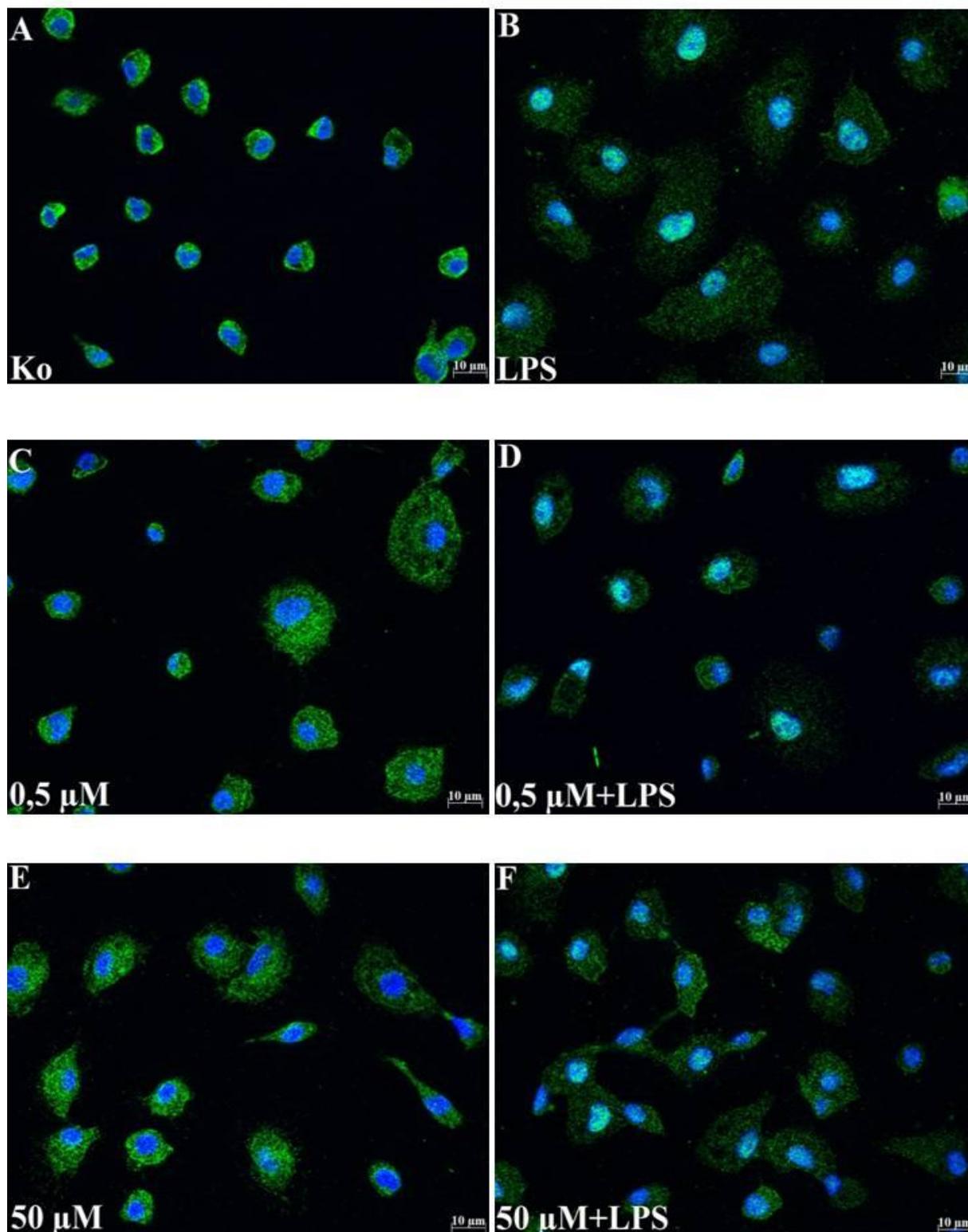
Der immunzytochemische Nachweis von NFκB erfolgte nach 30- bzw. 60-minütiger Stimulation der Mikroglia mit LPS, Empagliflozin sowie Empagliflozin und LPS.

Abbildung 4.15. zeigt repräsentative Bilder einer 30-minütigen, Abbildung 4.16. einer 60-minütigen Stimulation. Die unstimulierten Kontrollzellen (**A**) wiesen NFκB (grün) überwiegend im Zytoplasma auf, während die Zellkerne (blau) so gut wie keine grüne Fluoreszenz zeigten. Durch LPS-Stimulation änderte sich das Verteilungsmuster des fluoreszenzmarkierten Transkriptionsfaktors deutlich mit einer stark vermehrten Grün-Fluoreszenz der Zellkerne als Ausdruck einer im Zuge der Mikroglia-Aktivierung stattfindenden NFκB-Translokation (**B**).

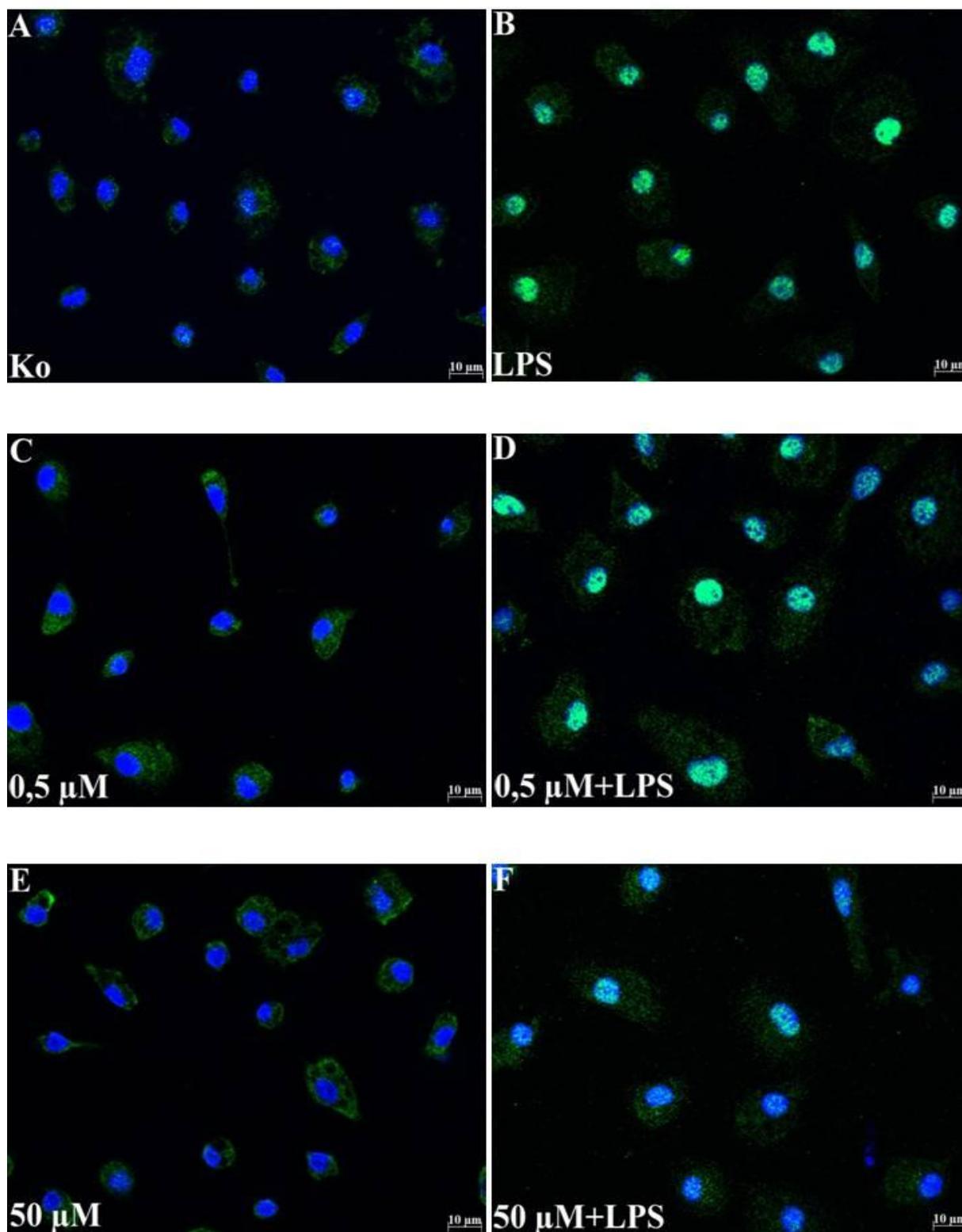
Die Inkubation mit 0,5 μM (**C**) bzw. 50 μM (**E**) Empagliflozin alleine zeigte in beiden untersuchten Konzentrationen keine Aktivierung des NFκB-Signalweges auf. Das Verteilungsmuster von NFκB ähnelte dem der unbehandelten Kontrollzellen.

Eine Simultaninkubation von 0,5 μM Empagliflozin und LPS (**D**) zeigte sowohl nach 30 als auch nach 60 Minuten keine sicher ersichtliche Fluoreszenzänderung in den Zellkernen im Vergleich zu den nur mit LPS stimulierten Mikroglia. Für eine niedrige Empagliflozin-Konzentration konnte mit den verwendeten Methoden somit keine erkennbare Beeinflussung der NFκB-Signalkaskade festgestellt werden.

Die Untersuchung der mit 50 μM Empagliflozin und LPS stimulierten Zellen ergab in beiden untersuchten Zeiträumen eine Veränderung des Fluoreszenzmusters, mit einem stärkeren Effekt nach 60-minütiger Stimulationsdauer (**F**). Die Fluoreszenzintensität von NFκB in den Zellkernen war etwas geringer im Vergleich zu den nur mit LPS stimulierten Zellen, obgleich auch in diesen Mikroglia die Kerne nicht komplett frei von NFκB waren und sich dadurch von den Kontrollen unterschieden. Die Verwendung von 50 μM Empagliflozin konnte somit eine Beeinflussung des NFκB-Verteilungsmusters herbeiführen, wahrscheinlich mit einem stärker ausgeprägten Effekt nach längerer Stimulationsdauer.



**Abbildung 4.16.: Einfluss von Empagliflozin auf den NFκB-Signalweg nach 30 Minuten in Mikroglia.** Die unstimulierten Kontrollzellen wiesen eine minimale NFκB-Kernfärbung auf (A), hingegen führte die LPS-Stimulation zu einer deutlichen NFκB-Translokation in die Kerne (B). Während die Simultaninkubation mit 0,5 μM und LPS keine eindeutig erkennbare Veränderung bewirkte (D), zeigte sich bei Verwendung von 50 μM Empagliflozin und LPS eine schwache Minderung der NFκB-Translokation in die Zellkerne (F). Eine Stimulation mit Empagliflozin allein bewirkte keine Änderung des NFκB-Verteilungsmusters im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen (C und E) (n=3).



**Abbildung 4.17.: Einfluss von Empagliflozin auf den NFκB-Signalweg nach 60 Minuten in Mikroglia.** Die unstimulierten Kontrollzellen wiesen eine minimale NFκB-Kernfärbung auf (A), hingegen führte die LPS-Stimulation zu einer deutlichen NFκB-Translokation in die Kerne (B). Während die Simultaninkubation mit 0,5 μM und LPS keine eindeutig erkennbare Veränderung bewirkte (D), zeigte sich bei Verwendung von 50 μM Empagliflozin und LPS eine deutlichere Minderung der NFκB-Translokation in die Zellkerne (F). Eine Stimulation mit Empagliflozin allein bewirkte keine Änderung des NFκB-Verteilungsmusters im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen (C und E) (n=3).

## 5. Diskussion

Die Annahme eines proinflammatorischen Phänotyps durch Mikroglia, z.B. in der Folge von Kontakt zu pathogenen Proteinaggregaten oder Mikroorganismen, ist unter physiologischen Bedingungen streng reguliert und zeitlich begrenzt, wodurch die proinflammatorischen Effekte wenig Schaden am gesunden Gewebe hinterlassen und trotzdem ein effektiver Schutz des ZNS vor z.B. Mikroorganismen erreicht wird. Beim M. Parkinson führen die Umgebungsbedingungen einschließlich Untergang dopaminerger Neurone und Freisetzung der  $\alpha$ -Synuclein-haltigen Proteinaggregate zu einer chronischen Annahme des M1-Phänotyps mit entsprechender Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und NO, resultierend in der Schädigung umliegender Neurone. Eine Aufhebung dieser Dysregulation durch eine antiinflammatorische Therapiestrategie oder gar einen Phänotypen-„Switch“ hin zu neuroregenerativen M2-Mikroglia kann daher neurodegenerative Prozesse entschleunigen und stellt somit einen möglichen Therapieansatz bei Erkrankungen wie dem M. Parkinson dar (Tang und Le, 2016).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in der durchgeführten Arbeit eine mögliche modulierende Wirkung des SGLT2-Inhibitors Empagliflozin auf die mikrogliale Inflammation untersucht.

### 5.1. Einfluss von Empagliflozin auf die Radikalbildung

Die im Zuge des M. Parkinsons stattfindende Dysregulation der mikroglialen Inflammation beinhaltet die stark erhöhte Bildung Stickstoffmonoxids (NO), das anschließend auf verschiedenen Ebenen oxidative Stressmechanismen induziert und so zur weiteren Neurodegeneration beiträgt. Zum einen kann NO selbst die Nitrosylierung zellulärer Proteine verursachen. Zum anderen bildet es mit reaktiven Sauerstoffspezies Peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), das Enzyme der mitochondrialen Atmungskette inhibiert und darüber einen zytotoxischen Effekt generiert (Steinert *et al.*, 2010). Dabei sind die verschiedenen Herstellungsenzyme des Stickstoffmonoxids offenbar in unterschiedlichem Maße für dessen toxische Wirkung verantwortlich. So zeigte die selektive Hemmung der iNOS, jedoch nicht der nNOS, am MPTP-Modell der Parkinson-Erkrankung *in vitro* eine neuroprotektive Wirkung (Brzozowski *et al.*, 2015). Auch *in vivo* bewirkte eine Inhibition der iNOS nach LPS-Injektionen in die SN eine verminderte Neurodegeneration (Arimoto und Bing, 2003). Eine Reduzierung der NO-Bildung und des Herstellungsenzyms iNOS kann somit einen therapeutischen Ansatz darstellen, um die Progression der Erkrankung aufzuhalten.

In dieser Arbeit wurde in allen durchgeführten Versuchen sowohl die NO-Freisetzung aus Mikroglia als auch die iNOS-mRNA-Expression durch LPS-Stimulation stark gesteigert. Empagliflozin reduzierte die NO-Freisetzung aus LPS-aktivierten Mikroglia nach 24 Stunden signifikant, jedoch zeigte sich dieser Effekt nur leicht ausgeprägt bei der Verwendung von 0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin, während 50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin keine Verringerung der NO-Freisetzung bewirkte. Neben der Messung der NO-Freisetzung aus Mikroglia wurde in dieser Arbeit auch die mRNA-Expression der iNOS nach drei und 24 Stunden beurteilt. Eine kurze Stimulationsdauer von drei Stunden beeinflusste die iNOS-mRNA-Synthese nicht signifikant. Zudem unterlagen die Ergebnisse bei den dreistündigen Versuchen Ergebnisschwankungen, sodass in diesem Stimulationszeitraum ein Effekt Empagliflozins auf die iNOS-mRNA-Synthese nicht sicher erkennbar war. In den Versuchen dieser Arbeit zeigte sich erst nach einer 24-stündigen Stimulation ein reduzierender Effekt auf die iNOS-mRNA-Synthese, der wiederum erst bei der Verwendung von 50  $\mu\text{M}$  signifikant war. Auffallend war die nur schwache Reduktion der NO-Freisetzung aus den Mikroglia bei gleichzeitig stärkerer Senkung der iNOS-mRNA-Synthese. Möglicherweise wird diese Inkongruenz durch Modifikationen, die erst nach der iNOS-mRNA-Synthese stattfinden, erklärt, wie z. B. Veränderungen des fertigen Proteins. Denkbar wäre hier eine Steigerung der katalytischen Aktivität des Enzyms durch Interaktionen mit anderen Proteinen oder ein verlangsamter intrazellulärer Abbau der iNOS (Aktan, 2004; Zhang *et al.*, 2003). Ebenfalls möglich ist, dass andere NO-Herstellungsenzyme durch die Inkubation mit Empagliflozin vermehrt in Mikroglia exprimiert werden. *In vivo*-Untersuchungen zeigten eine derartige Beeinflussung durch Empagliflozin am myokardialen Gewebe von Ratten. Dabei führte Empagliflozin zu einer signifikant vermehrten Expression der eNOS und nNOS bei gleichzeitiger Minderung der iNOS-Expression und somit trotz verringerter iNOS-Expression zu erhöhten NO-Werten (Asensio Lopez *et al.*, 2020). Zukünftig sinnvoll wäre daher zu untersuchen, ob eine ähnliche Beeinflussung auch in Mikroglia vollzogen wird. Auch eine weitere *in vivo*-Studie zeigte eine signifikant niedrigere iNOS-mRNA-Expression in ischämischem Myokard-Gewebe von Mäusen nach Empagliflozin-Verabreichung (Andreadou *et al.*, 2017). Somit sind die Ergebnisse dieser Arbeit prinzipiell mit den beiden vorgestellten Studien vereinbar. Da es sich in den beiden beschriebenen Arbeiten um *in vivo*-Experimente am myokardialen Gewebe handelt und nicht um *in vitro*-Studien an isolierten Zellen, ist die genaue Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse der Arbeiten jedoch erschwert. Eine bessere Vergleichsmöglichkeit bieten daher *in vitro*-Studien an Makrophagen, da neben Gemeinsamkeiten im Versuchsaufbau auch eine ontogenetische Verwandtschaft zwischen Mikroglia und

Makrophagen besteht (Prinz *et al.*, 2014). Eine andere Arbeitsgruppe wies bei diesen Versuchen an LPS-aktivierten Makrophagen eine starke Reduktion der NO-Freisetzung durch Hinzugabe von 1  $\mu$ M Empagliflozin nach, zudem zeigte sich in dieser Arbeit auch eine signifikante Herabregulierung der iNOS-mRNA-Expression in LPS-aktivierten Kardiomyozyten (Koyani *et al.*, 2020). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte ebenfalls eine signifikant geringere iNOS-Expression in LPS-stimulierten Makrophagen auf, die mit Empagliflozin behandelt wurden (Lee *et al.*, 2021).

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse sprechen in Zusammenschau mit den vorgestellten Experimenten anderer Arbeitsgruppen für eine iNOS-reduzierende Wirkung Empagliflozins. Da, wie oben dargelegt, vor allem die iNOS entscheidend zu sein scheint für die NO-vermittelte Neurotoxizität, könnte sich die Minderung der iNOS-Expression prinzipiell auch im Rahmen einer Mikroglia-Modulierung beim M. Parkinson therapeutisch nutzen lassen.

## **5.2. Einfluss von Empagliflozin auf die Expression und Freisetzung inflammatorischer Zytokine**

### **5.2.1. IL-6**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Empagliflozin die mRNA-Expression von IL-6 in aktivierten Mikroglia zu reduzieren vermochte, mit einem deutlicheren Effekt bei höheren Konzentrationen sowie nach längerer Stimulationsdauer. In niedrigeren Konzentrationsbereichen zeigte sich allein nach 24-stündiger Stimulationsdauer eine schwach ausgeprägte Reduktion. Die Analyse der Zellkulturüberstände der Stimulationsversuche ergab nach 24 Stunden ebenfalls eine Minderung der IL-6-Freisetzung aus LPS-aktivierten Mikroglia durch beide untersuchte Empagliflozin-Konzentrationen.

Nach Empagliflozin-Gabe wurde *in vivo* sowohl in diabetischen als auch nicht-diabetischen Tiermodellen eine signifikante IL-6-Reduktion nachgewiesen (Maayah *et al.*, 2020; Andreadou *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019). Experimente mit Empagliflozin in einer Konzentration von 40 und 60  $\mu$ M zeigten darüber hinaus auch *in vitro* eine signifikante Verringerung der IL-6-Expression an mit LPS aktivierten Makrophagen auf (Xu *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2021). Andere *in vitro*-Versuche an LPS-aktivierten humanen Endothelzellen wiesen hingegen für Empagliflozin (1  $\mu$ M) bei einer Stimulationsdauer von drei Stunden keine signifikante Änderung der IL-6-Expression nach (Uthman *et al.*, 2020). Die Ergebnisse dieser *in vitro*- und *in vivo*-Studien stimmen damit gut mit den hier ermittelten Resultaten

überein und lassen einen konzentrations- und zeitabhängigen Effekt Empagliflozins auf die IL-6-Expression vermuten.

Beim M. Parkinson wurden erhöhte IL-6-Werte in den Gehirnen von Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen (Mogi *et al.*, 1994). Zudem scheinen hohe IL-6-Spiegel mit der Schwere der motorischen Symptome zu korrelieren (Green *et al.*, 2019). Dessen ungeachtet wird die Rolle dieses Zytokins im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen kontrovers beurteilt. So zeigten Untersuchungen an IL-6-*knockout*-Mäusen im MPTP-Modell des M. Parkinsons einen signifikant stärkeren neuronalen Zelluntergang als die Tiere, die das Zytokin exprimierten (Bolin *et al.*, 2002). Auch in *in vitro*-Experimenten am MPTP-Modell schien IL-6 dopaminerge Neurone vor dem Zelltod schützen zu können (Akaneya *et al.*, 1995). Eine erhöhte IL-6-Expression kann daher alleine betrachtet nicht eindeutig als neurotoxisch oder -protektiv klassifiziert werden. Vielmehr scheinen andere Aspekte wie die verschiedenen Arten der IL-6-Signalübermittlung oder die gleichzeitige Präsenz anderer inflammatorischer Zytokine über die Wirkung dieses Zytokins auf Neurone mitzuentcheiden (Rothaug *et al.*, 2016; Hanisch, 2002).

Neben der direkten Wirkung auf Neurone ist auch die Involvierung weiterer Zellen neben den Mikroglia für die IL-6-Effekte *in vivo* relevant. So resultiert eine erhöhte Konzentration von IL-6 im ZNS auch in einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  aus anderen Gliazellen (Di Santo *et al.*, 1996). Eine erhöhte Freisetzung von IL-6 aus Mikroglia bewirkt somit durch eine Forcierung neuroinflammatorischer Prozesse wahrscheinlich zumindest auf indirektem Weg neurotoxische Effekte.

Zusammenfassend wird am Beispiel des Zytokins IL-6 deutlich, dass die mikrogliale Inflammation immer in ihrem Gesamtkontext, einschließlich des vorliegenden Mikroglia-Phänotyps, betrachtet werden sollte und dass eine alleinige Hemmung einzelner inflammatorischer Mediatoren in Mikroglia daher nicht zielführend zu sein scheint, um die Neurodegeneration beim M. Parkinson positiv zu beeinflussen (Heimke, 2018; Hanisch, 2002; Tang und Le, 2016).

Therapeutisch nutzbar ist die in dieser Arbeit festgestellte IL-6-Reduktion wahrscheinlich nur, wenn sie auch mit der Reduktion weiterer proinflammatorischer Marker sowie der Förderung neuroregenerativer Signalwege einhergeht und im Optimalfall nur in solchen Mikroglia zum Tragen kommt, bei denen die IL-6-Sekretion einen Baustein der toxischen Aktivierungsschleife aus Neurodegeneration und -inflammation repräsentiert. Da eine LPS-Stimulation diesen neurotoxischen Phänotyp in Mikroglia induziert (Gao *et al.*, 2002), kann die IL-6-Herabregulierung im Rahmen dieser Arbeit für eine neuroprotektive M2-Polarisation

des mikroglialen Phänotyps durch Empagliflozin und damit für eine „sinnvolle“ IL-6-Herabregulierung sprechen. Nur anhand der IL-6-Expression kann dies jedoch nicht abschließend beurteilt werden und wird daher an anderer Stelle diskutiert.

### 5.2.2. IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$

Die Konsequenzen des IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Einflusses auf Neurone sind, ähnlich wie bei IL-6, differenziert zu betrachten. So scheinen auch hier die Dauer der Exposition sowie die vorherrschende Konzentration der beiden Zytokine relevant für die weiteren Effekte auf Neurone zu sein. Akute, einmalige IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Expositionen induzieren wahrscheinlich keine Neurotoxizität (Castaño *et al.*, 2002). Für TNF- $\alpha$  wurde zudem eine neuroprotektive Wirkung postuliert, sofern dieses Zytokin über längere Zeiträume in niedrigen Konzentrationen auf nigrostriatale Neurone einwirkte (Chertoff *et al.*, 2011). Chronische Exposition gegenüber höheren IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen scheinen jedoch eine irreversible Schädigung dopaminerger Neurone zu induzieren (Ferrari *et al.*, 2006; Chertoff *et al.*, 2011). *In vivo*-Experimente zeigten dementsprechend auch einen gesteigerten Zelluntergang dopaminerger Neurone nach Injektion beider Zytokine, einzeln oder in Kombination, in das Vorderhirn (Carvey *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2013).

Neben der direkten Wirkung auf Neurone beeinflussen beide Zytokine auch andere Zellen im ZNS. So können TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  beispielsweise in Astrozyten die iNOS-vermittelte NO-Produktion steigern (Chao *et al.*, 1995; Brown und Vilalta, 2015; Jana *et al.*, 2005). In Analogie zum simplifizierten M1/M2-Modell der Mikroglia wird auch den Astrozyten die Fähigkeit zur Phänotypenvariation zugeschrieben (Kwon und Koh, 2020). Unter pathologischen Umgebungsbedingungen wie beim M. Parkinson führt die dauerhaft erhöhte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren durch Mikroglia zu einer Annahme des A1-Phänotyps, der durch verminderte phagozytische Aktivität, beeinträchtigte Überwachung synaptischer Funktionen sowie Induzierung der Apoptose in umliegenden Neuronen charakterisiert wird (Liddelow *et al.*, 2017).

Trotz zahlreicher physiologischer Funktionen im gesunden ZNS (Kap. 1.2.1.) sowie möglicher neuroprotektiver Effekte in niedrigen Konzentrationsbereichen können beiden Zytokinen daher im Rahmen einer mikroglialen Dysregulation und der damit einhergehenden, langfristig erhöhten Zytokinfreisetzung eine schädigende Komponente zugeschrieben werden, die zur Neurodegeneration beiträgt (Leal *et al.*, 2013). Eine Reduktion der erhöhten Freisetzung beider Zytokine aus neurotoxisch aktivierten Mikroglia kann daher bei Erkrankungen wie dem M. Parkinson eine Protektion dopaminerger Neurone bewirken.

In den hier durchgeführten *in vitro*-Versuchen an LPS-aktivierten Mikroglia wurde die stark erhöhte IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression in Mikroglia signifikant reduziert, jedoch erst bei Verwendung von 50  $\mu$ M Empagliflozin und einer Stimulationsdauer von 24 Stunden. Niedrigere Konzentrationsbereiche sowie ein kürzerer Stimulationszeitraum beeinflussten die IL-1 $\beta$ -mRNA-Synthese nicht signifikant. In Bezug auf TNF- $\alpha$  wurde bereits nach drei Stunden eine signifikante Minderung der mRNA-Expression festgestellt, ebenfalls erst bei der Verwendung von 50  $\mu$ M Empagliflozin. Deutlicher wurde diese Reduktion auch hier mit Erhöhung der Stimulationsdauer, sodass nach 24-stündiger Stimulation beide untersuchten Konzentrationen eine Minderung der TNF- $\alpha$ -Expression bewirkten. Im Einklang mit der verringerten TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression ergab die Analyse der Zellkulturüberstände nach 24 Stunden eine signifikant geminderte TNF- $\alpha$ -Sekretion aus Mikroglia für beide Empagliflozin-Konzentrationen, wobei sich erneut eine Verstärkung dieses Effektes mit Erhöhung der Konzentration zeigte.

*In vitro*-Experimente einer anderen Arbeitsgruppe untersuchten den Einfluss von verschiedenen Empagliflozin-Konzentrationen (1, 10 und 100  $\mu$ M) auf die IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Expression in MAC-Zellen (*myeloid angiogenic cell*), welche einen molekularen Phänotyp ähnlich zu den monozytären Zellen, genauer gesagt M2-Makrophagen aufweisen (Medina *et al.*, 2011). Die MAC-Zellen wurden durch einen Entzündungsreiz aktiviert und zeigten eine signifikante Erhöhung der IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression. Nach Applikation von Empagliflozin mit einer Stimulationsdauer von 3 bzw. 6 Stunden gelang eine signifikante Reduktion der IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression, allerdings erst bei Verwendung der höchsten getesteten Konzentration von 100  $\mu$ M (Spigoni *et al.*, 2020). Auch an LPS-aktivierten Makrophagen wurde *in vitro* durch verschiedene Arbeitsgruppen eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -Expression durch Empagliflozin (1  $\mu$ M für 9 Stunden und 40  $\mu$ M für 12 Stunden) beschrieben (Koyani *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2018). In einem weiteren *in vitro*-Modell mit LPS-aktivierten Makrophagen senkte Empagliflozin zudem ebenfalls die IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Expression (Lee *et al.*, 2021). Diese in der Literatur beschriebenen Effekte Empagliflozins auf die IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Expression decken sich somit weitestgehend mit den hier ermittelten Ergebnissen an Mikroglia, insbesondere zeigten sich auch in den Versuchen anderer Arbeitsgruppen die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Empagliflozin-Effekte. Zudem wies eine weitere Arbeitsgruppe auch *in vivo* an Mäusen eine signifikante Reduktion der Expression beider Zytokine nach, nachdem durch LPS-Verabreichung eine systemische inflammatorische Reaktion hervorgerufen wurde, was weitere Anhaltspunkte für eine antiinflammatorische Einflussnahme Empagliflozins liefert (Maayah *et al.*, 2020).

### 5.2.3. IL-10

Eine Bindung von IL-10 an seine Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Mikroglia oder Astrozyten vermittelt u. a. durch eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und Steigerung der Aktivität von SOCS-Proteinen (*suppressor of cytokine signaling*) eine Modulation der Zytokinfreisetzung, insbesondere eine Minderung der Expression proinflammatorischer Zytokine (Kwilasz *et al.*, 2015). Im Vergleich zu den zahlreichen proinflammatorischen Mediatoren wird das antiinflammatorische Zytokin IL-10 erst relativ spät, also nach längerer Konfrontation der Mikroglia mit einem Entzündungsreiz, freigesetzt. Somit wird IL-10 allgemein als regulierendes Zytokin charakterisiert, das nach einer schnellen proinflammatorischen Reaktion der Mikroglia die Terminierung der Entzündungsreaktion einleiten soll, um eine überschießende Inflammation zu verhindern (Ledeboer *et al.*, 2002; Tang und Le, 2016). Dementsprechend wurden bei Parkinson-Patienten als Ausdruck permanent ablaufender Entzündungsprozesse erhöhte Zytokinspiegel, darunter IL-10, im peripheren Blut und im Liquor festgestellt (Qin *et al.*, 2016; Karpenko *et al.*, 2018). Die IL-10-Erhöhung ist also wahrscheinlich ein Ausdruck einer kontinuierlichen Mikroglia-Aktivierung sowie deren Versuch, die normalerweise strikt regulierten Entzündungsprozesse zu antagonisieren.

In Tiermodellen des M. Parkinson konnte durch Gabe von IL-10 ein verminderter Zelltod dopaminergischer Neurone sowie eine geringere mikrogliale Entzündungsreaktion erreicht werden. Diese Modelle basierten z. B. auf LPS-Injektionen in die *Substantia nigra*, das die dortigen Neurone schädigt, und einer anschließenden IL-10-Gabe in diese Region (Arimoto *et al.*, 2007; Kwilasz *et al.*, 2015). In ähnlicher Weise zeigten Versuche an mesenzephalen Neuron-Glia Ko-Kulturen *in vitro* eine neuroprotektive Wirkweise dieses Zytokins auf, die mit der reduzierten Expression und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Sauerstoffradikalen aus Mikroglia erklärt wurde (Qian *et al.*, 2006; Kwilasz *et al.*, 2015). Als therapeutisches Ziel bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem M. Parkinson gilt daher, in den dysregulierten Mikroglia neben einer Reduktion der proinflammatorischen Mediatoren auch die Förderung der Freisetzung neuroregenerativer Faktoren, wie z.B. IL-4 oder IL-10 zu induzieren (Tang und Le, 2014). Diese Modulation des Phänotyps von M1 zu M2 kann die sich gegenseitig verstärkenden Mechanismen aus Neurodegeneration und -inflammation durchbrechen und den Krankheitsverlauf somit positiv beeinflussen.

Eine Mikroglia-Stimulation mittels LPS wurde in dieser Arbeit als *in vitro*-Simulation der inflammatorischen Aktivierung der Zellen beim M. Parkinson genutzt. Die IL-10-Freisetzung aus den Zellen in den Zellkulturüberstand galt hierbei als Parameter für die Fähigkeit

Empagliflozins, neuroregenerative Signalwege zu fördern. Es zeigte sich, dass die durch LPS-Stimulation erhöhte IL-10-Freisetzung durch Hinzugabe von Empagliflozin in beiden Konzentrationen signifikant gesenkt wurde. Der reduzierende Einfluss von Empagliflozin auf proinflammatorische Mediatoren, der in dieser Arbeit beobachtet wurde, scheint sich also in ähnlicher Weise auch bei der IL-10-Freisetzung aus Mikroglia zu wiederholen.

In *in vivo*-Experimenten an Mäusen zeigte sich nach sechswöchiger Empagliflozin-Einnahme eine signifikante Reduktion der IL-10-Serum-Werte im Vergleich zu den Tieren ohne Empagliflozin-Einnahme (Liu *et al.*, 2021), was somit vereinbar wäre mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen an Mikroglia. Im Gegensatz dazu offenbarte eine Untersuchung an menschlichen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, welche über 24 Wochen Empagliflozin erhielten, signifikant höhere Serum-Werte von IL-10 als an den Patienten, die den SGLT2-Inhibitor nicht erhielten (Iannantuoni *et al.*, 2019). Möglicherweise spielt bei der Wirkung Empagliflozins auf die IL-10-Freisetzung also die Dauer der Einnahme eine relevante Rolle. In den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Versuchen wurde eine zeitabhängige Verstärkung der Effekte Empagliflozins auf proinflammatorische Zytokine bereits angedeutet. Eventuell kann daher eine langfristige Empagliflozin-Einwirkung auf Mikroglia auch zu einer Steigerung der IL-10-Freisetzung führen. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass die Mikroglia durch Empagliflozin einzig in ihrer proinflammatorischen Aktivierung gebremst werden, ohne jedoch gleichzeitig antiinflammatorische oder neuroregenerative Mediatoren vermehrt freizusetzen und somit eine M2-Polarisation des mikroglialen Phänotyps zu bewirken.

### 5.3. Einfluss von Empagliflozin auf ausgewählte Signalwege

Die MAP-Kinasen ERK<sub>1/2</sub> katalysieren die Phosphorylierung und damit die Aktivierung einer Vielzahl anderer Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Außer Entzündungsreaktionen organisieren sie somit diverse zelluläre Funktionen in Mikroglia, Neuronen und weiteren Zelltypen (Sun und Nan, 2017). Als zentraler „Hauptschalter“ entzündlicher Reaktionen in fast allen Zelltypen gilt zudem der Transkriptionsfaktor NFκB (Singh *et al.*, 2020). Im Zusammenhang mit dem M. Parkinson sind wahrscheinlich beide Signalwege in die proinflammatorische Mikroglia-Aktivierung durch z. B. α-Synuclein involviert (Wilms *et al.*, 2009; Klegeris *et al.*, 2008). Passend hierzu stellten *post mortem*-Analysen an Parkinson-Patienten eine vermehrte NFκB-Expression im Vergleich zu nicht betroffenen Kontrollpersonen fest, als Anzeichen für eine gesteigerte Aktivität dieses Signalweges (Mogi

*et al.*, 2007). In verschiedenen *in vitro*-Experimenten wurden entzündungshemmende Effekte an Mikroglia, wie z. B. eine reduzierte Expression inflammatorischer Mediatoren, über eine Aktivitätsminderung der ERK<sub>1/2</sub>- und/oder der NFκB-Kaskade herbeigeführt (Li *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2020). Eine Herabregulierung sowohl der ERK<sub>1/2</sub>- als auch der NFκB-Kaskade in Mikroglia könnte somit über eine Reduktion der Neuroinflammation eine neuroprotektive Wirkung entfalten.

In den hier durchgeführten Experimenten wurde der Einfluss Empagliflozins auf den Aktivierungsgrad der MAP-Kinasen ERK<sub>1/2</sub> untersucht. Nach 30-minütiger Stimulationsdauer konnte Empagliflozin in beiden untersuchten Konzentrationen eine signifikante Minderung des Aktivierungsgrades dieser Kinasen bewirken. In der Literatur finden sich bezüglich des Einflusses Empagliflozins auf diesen Signalweg keine eindeutigen Angaben. So führte eine Empagliflozin-Verabreichung in einem Mausmodell zur Kardiomyopathie *in vivo* ebenfalls eine signifikante Aktivitätsminderung der ERK<sub>1/2</sub>-Kaskade im kardialen Gewebe herbei (Sabatino *et al.*, 2020). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an *in vivo*-Tiermodellen des Diabetes mellitus Typ 2 ergaben im Gegensatz dazu keine signifikante Aktivitätsminderung des ERK<sub>1/2</sub>-Signalweges im kardialen Gewebe nach Empagliflozin-Verabreichung an die Versuchstiere (Zhang *et al.*, 2020; Habibi *et al.*, 2017). Interessanterweise ließ sich aber auch in Vorversuchen dieser Arbeit in anderen Stimulationszeiträumen keine signifikante Beeinflussung des ERK<sub>1/2</sub>-Aktivierungsgrades in Mikroglia feststellen (Ergebnisse in dieser Arbeit nicht gezeigt). Möglicherweise hängt die Beeinflussung der ERK<sub>1/2</sub>-Aktivität damit von der Dauer der Empagliflozin-Einwirkung ab. Denkbar ist zum Beispiel, dass die Inhibierung der ERK<sub>1/2</sub>-Kaskade durch Empagliflozin in einem engen Zeitfenster und nicht mehr zu späteren Zeitpunkten vollzogen wird, womit es sich daher nur um eine kurzfristige Herabregulierung dieser Kaskade handeln würde.

Die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte bei der Verwendung von 0,5 μM Empagliflozin in mehreren Versuchen nach 30 und 60 Minuten keine deutlich sichtbare Beeinflussung des NFκB-Verteilungsmusters zeigen. In *in vitro*-Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe wurde mittels *High-Mobility-Group-Protein B1* (HMGB1) eine Induktion des NFκB-Signalweges an proximalen Tubuluszellen der Niere veranlasst. Eine Koinkubation mit 0,5 μM Empagliflozin erbrachte hier ebenfalls keine Minderung der NFκB-Aktivität (Panchapakesan *et al.*, 2013), womit diese Versuchsergebnisse auch mit den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Versuchen an LPS-aktivierten Mikroglia in Übereinstimmung gebracht werden können. Eine andere Arbeitsgruppe hingegen zeigte sowohl in *in vivo*-Versuchen an Mäusen als auch *in vitro* an humanen Endothelzellen neben

weiteren antiinflammatorischen Effekten auch eine signifikante Inhibierung der NFκB-Aktivität durch Empagliflozin (3 μM) (Ortega *et al.*, 2019). Verschiedene *in vivo*-Studien sowohl an diabetischen als auch an nicht-diabetischen Tiermodellen ergaben ebenfalls eine signifikante Minderung der NFκB-Aktivierung nach Empagliflozin-Gabe an die Versuchstiere (Jigheh *et al.*, 2019; Abdelhamid *et al.*, 2020; Byrne *et al.*, 2020). In den hier durchgeführten Versuchen an Mikroglia erbrachte die fluoreszenzmikroskopische Analyse erst bei 50 μM Empagliflozin eine sichtbare Minderung der NFκB-Translokation in die Zellkerne als Ausdruck einer geringeren Aktivierung dieses Signalweges. In Zusammenschau mit den in der Literatur und in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen scheint somit eine Beeinflussung des NFκB durch Empagliflozin gut denkbar, auch wenn in dieser Arbeit erst bei der hohen Empagliflozin-Konzentration ein Effekt erkennbar wurde. In den hier vollzogenen Versuchen erfolgte zudem keine genaue Quantifizierung der NFκB-Expression, sodass die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie nur eine mögliche Tendenz aufzeigen können und durch genauere, weiterführende Untersuchungen an Mikroglia in Zukunft ergänzt werden sollten.

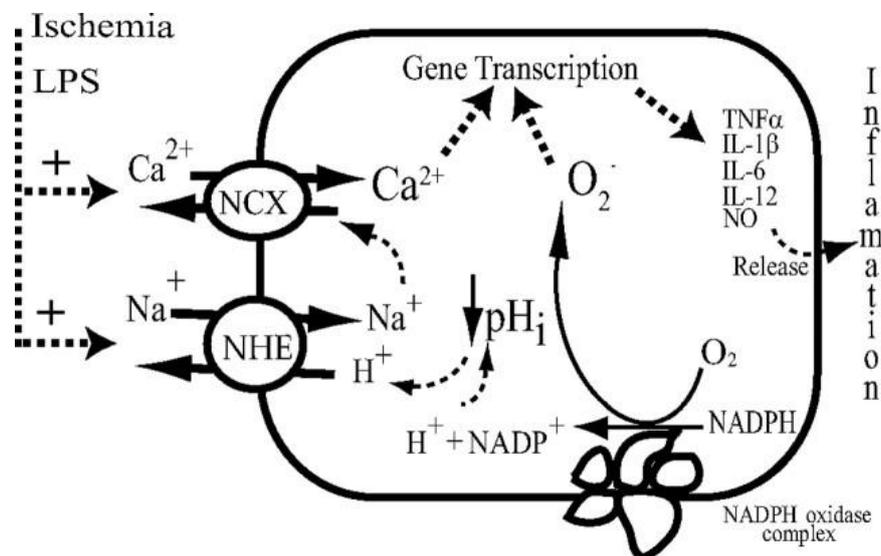
Zusammenfassend können die für 0,5 μM Empagliflozin beobachteten Effekte (Reduktion der IL-6-, TNF-α- sowie IL-10-Expression) an Mikroglia zumindest teilweise mit einer zeitlich begrenzten Verminderung der Aktivität der ERK<sub>1/2</sub>-Kaskade erklärt werden, da dieser Signalweg auch in die Regulation der Zytokinexpression eingebunden ist (Saraiva und O'Garra, 2010; Sun und Nan, 2017). Für die Verwendung von 50 μM Empagliflozin, bei denen die Expression aller untersuchten Zytokine stärker herabreguliert wurde, erscheint darüber hinaus auch ein NFκB-abhängiger Mechanismus denkbar.

#### **5.4. Wie interagiert Empagliflozin mit den Mikroglia?**

Bisher offen geblieben ist die Frage, auf welche Weise Empagliflozin mit den Mikroglia interagiert. Gibt es auf der Zelloberfläche oder im Zytosol Moleküle, nach deren Aktivierung oder Inhibierung eine Beeinflussung intrazellulärer Signalwege zu einer Änderung der Transkription inflammatorischer Mediatoren führt? Im Folgenden sollen Möglichkeiten vorgestellt werden, auf welche Weise Empagliflozin seine Wirkung an Mikroglia entfalten könnte.

Für Empagliflozin und weitere SGLT2-Inhibitoren wurde gezeigt, dass sie in der Lage sind, den Natrium-Protonen-Austauscher 1 (NHE-1) an Herzmuskelzellen hochaffin zu binden und zu blockieren (Uthman *et al.*, 2018b; Baartscheer *et al.*, 2017). Zurzeit sind zehn NHE-

Isoformen bekannt, wobei der NHE-1 neben Herzmuskelzellen auch von Mikroglia auf der Plasmamembran exprimiert wird (Shi *et al.*, 2013; Karmazyn, 2013). In mit LPS aktivierten Mikroglia ist der NHE-1 vor allem in die pH-Regulation involviert, da intrazellulär entstehende Protonen über den NHE-1 im Austausch mit  $\text{Na}^+$ -Ionen aus den Mikroglia transportiert werden. Die daraus resultierende Erhöhung des intrazellulären  $\text{Na}^+$  führt über eine Aktivierung von  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern (NCX) zur Normalisierung des intrazellulären Natriums und Erhöhung des Calciums. Dementsprechend geht eine LPS-Aktivierung von Mikroglia mit einer Erhöhung des intrazellulären Calciums einher (Hoffmann *et al.*, 2003). Das erhöhte Calcium wirkt intrazellulär als eine Art Stimulator, der über andere Signalmoleküle die Expression inflammatorischer Moleküle verstärkt (Liu *et al.*, 2010).



**Abbildung 5.1.:** Darstellung der Involvement des NHE-1 in die mikrogliale Inflammation (aus Liu *et al.*, 2010). Die in Folge einer LPS-Aktivierung in Mikroglia verursachten Ionenverschiebungen werden u. a. durch den NHE an der Zellmembran vollzogen und tragen zur Genexpression proinflammatorischer Mediatoren bei.

Aufgrund der Einbindung des NHE-1 in die zelluläre Reaktion auf inflammatorische Stimuli führte dessen Blockade in verschiedenen Geweben und Zellarten zu einer verminderten inflammatorischen Antwort, bei der sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine signifikant geringer exprimiert wurden (Zhang *et al.*, 2018; Rolfe *et al.*, 1992; Németh *et al.*, 2002; X. Lin *et al.*, 2014). In manchen dieser Versuche wurde auch eine Herabregulierung der MAP-Kinasen ERK<sub>1/2</sub> sowie des Transkriptionsfaktors NFκB für die in Folge einer NHE-1-Inhibition eintretenden Effekte mitverantwortlich gemacht (Zhang *et al.*, 2018; Németh *et al.*, 2002). Da neben einer reduzierten Expression inflammatorischer Zytokine in dieser Arbeit auch der ERK<sub>1/2</sub>- sowie NFκB-Signalweg zeit- und konzentrationsabhängig herabreguliert wurden, wären diese Ergebnisse daher prinzipiell vereinbar mit einer NHE-1-Blockade als

möglicher Interaktionspunkt zwischen Empagliflozin und den Mikroglia. Empagliflozin zeigte zudem bereits in einem Tiermodell zur nicht-diabetischen Herzinsuffizienz einen antiinflammatorischen Effekt über die Aktivitätsminderung Calcium-abhängiger Signalwege im kardialen Gewebe (Byrne *et al.*, 2020).

Die anfangs erwähnte Fähigkeit Empagliflozins, den NHE-1 an Kardiomyozyten *in vitro* zu blockieren, wurde bei einer Empagliflozin-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  gezeigt (Uthman *et al.*, 2018b). In einer weiteren *in vitro*-Studie, bei der antiinflammatorische Effekte von Empagliflozin auf eine NHE-1-Blockade zurückgeführt wurden, fanden die Versuche unter der Verwendung deutlich höherer Empagliflozin-Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) statt (Spigoni *et al.*, 2020). Möglicherweise reichen die in dieser Arbeit verwendeten 0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin daher nur für eine schwächer ausgeprägte NHE-1-Blockade an Mikroglia, während 50  $\mu\text{M}$  Empagliflozin diese Blockade stärker ausüben. Untersuchungen zu Calcium-abhängigen Signalwegen in Mikroglia zeigten allerdings auch, dass verschiedene inflammatorische Zytokine unterschiedlich stark durch Änderungen des Calcium-Spiegels beeinflusst werden und dass es neben den Änderungen des intrazellulären Calcium-Spiegels auch viele andere Steuerungselemente der Zytokinexpression gibt (Hoffmann *et al.*, 2003). Denkbar ist daher ebenfalls, dass auch bei 0,5  $\mu\text{M}$  Empagliflozin eine NHE-1-Blockade stattfindet, diese aber das Expressionsmuster nur von einem Teil der untersuchten Mediatoren beeinflusst und bei Erhöhung der Empagliflozin-Konzentration auf 50  $\mu\text{M}$  neben der NHE-1-Blockade auch weitere Signalwege in den Mikroglia in ihrer Aktivität moduliert werden.

Zur genaueren Beantwortung der Frage, ob die NHE-1-Blockade für die hier ermittelten Ergebnisse verantwortlich ist, wären jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig, z. B. wie Empagliflozin die intrazellulären Calcium-Konzentrationen beeinflusst oder ob die hier gewonnenen Versuchsergebnisse durch eine Inkubation mit NHE-1-Blockern reproduziert werden können. Zudem wurden mit dem ERK<sub>1/2</sub>- und NF $\kappa$ B-Signalweg nur zwei Signalwege untersucht, die in die Regulation der mikroglialen Inflammation eingebunden sind. Hingegen wird für Empagliflozin in der Literatur auch eine Stimulation der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) beschrieben (Koyani *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2018), dessen Aktivierung an Mikroglia eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine nach sich ziehen kann (Zhou *et al.*, 2020). Zudem geht eine Stimulierung der AMPK-Kaskade in Mikroglia offenbar auch mit einer Hemmung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B einher (Chen *et al.*, 2014), womit also auch die AMPK als mögliche „Schnittstelle“ zwischen Mikroglia und Empagliflozin in Frage käme.

## 5.5. Bewertung der Ergebnisse

### 5.4.1. Das *in vitro*-Modell als vereinfachte Betrachtung der Mikroglia

In dieser Arbeit wurden LPS-aktivierte Mikroglia der Ratte als Modell für den Aktivitätszustand dieser Zellen beim M. Parkinson angenommen. Da Mikroglia in Folge einer LPS-Stimulation, insbesondere bei LPS-Konzentrationen von 0,1-10 ng/ml (in dieser Arbeit 5 ng/ml), einen für dopaminerge Neurone neurotoxischen Phänotyp annehmen (Gao *et al.*, 2002), gilt dies als etablierte Simulation der mikroglialen Inflammation beim M. Parkinson. Die *in vitro*-Kultivierung der Zellen stellt dennoch nur einen vereinfachten Betrachtungsansatz dar, der die Zellaktivität *in vivo* nicht vollständig rekonstruieren kann, da zahlreiche weitere Faktoren, die in die *in vivo*-Regulation der Mikroglia involviert sind, in dem hier verwendeten Modell keine Berücksichtigung finden. In diesem Zusammenhang sollte beispielsweise die Regulation der mikroglialen Neuroinflammation durch umgebende Neurone erwähnt werden, welche über unterschiedliche Rezeptoren auf Mikroglia und den entsprechenden Liganden auf Neuronen gewährleistet wird (Bajramovic, 2011; Cardona *et al.*, 2006). In Abwesenheit dieser neuronaler Liganden entwickeln Mikroglia eine Hyperreagibilität auf pathogene Stimuli wie LPS oder apoptotischen Zelldebris (Carson *et al.*, 2008). In ähnlicher Weise steuern beim M. Parkinson auch andere Immunzellen, wie z. B. T-Lymphozyten, die mikrogliale Inflammation (Appel *et al.*, 2010). Diese Beispiele sollen verdeutlichen, dass Mikroglia *in vivo* auch von umgebenden Zellen reguliert werden. Da diese Interaktionen *in vitro* unberücksichtigt bleiben, ist eine exakte *in vitro*-Rekonstruktion des mikroglialen Phänotyps nie gänzlich möglich, wodurch eine einfache Translation der hier ermittelten Versuchsergebnisse auf das Verhalten der Mikroglia *in vivo* nicht vollumfänglich möglich ist.

In den Experimenten dieser Arbeit wurden Mikroglia der Ratte verwendet. Dies gilt als weit verbreiteter Versuchsansatz, da grundlegende Eigenschaften, wie z.B. die Fähigkeit zur M1/M2-Phänotypenvariation oder die Reaktion auf Stimuli wie LPS, von Mikroglia aus Nagetieren mit dem menschlichen Äquivalent weitestgehend übereinstimmen (Smith und Dragunow, 2014). Somit liefern die hier ermittelten Ergebnisse Anhaltspunkte, wie Empagliflozin auch menschliche Mikroglia beeinflussen könnte. Da jedoch auch Unterschiede zwischen den Zellen verschiedener Spezies bestehen, wie zum Beispiel die Ausstattung mit manchen Zelloberflächenmolekülen, ist für einen Großteil der mikroglialen Funktionen noch nicht abschließend geklärt, ob menschliche Mikroglia in derselben Weise reagieren wie ihr Äquivalent aus Ratten oder Mäusen (Smith und Dragunow, 2014). Da die Mikroglia in dieser Arbeit aus neugeborenen Ratten isoliert wurden, fehlt zudem die

Berücksichtigung des Zellverhaltens im gealterten Gehirn. Sowohl für menschliche als auch für Mikroglia aus Nagetieren wurden Veränderungen mit voranschreitendem Alter beschrieben (Galatro *et al.*, 2017). So werden die Mikroglia im alternden Gehirn mit einer erhöhten basalen Produktion proinflammatorischer Zytokine charakterisiert, was wahrscheinlich eine Überreaktion der Zellen auf neuronale Schäden oder andere inflammatorische Stimuli herbeiführt (Niraula *et al.*, 2017; Harry, 2013). Von einigen Autoren wird diese chronische, niedriggradige Inflammation im Alter daher auch mit dem Begriff „*inflammaging*“ beschrieben (Di Benedetto *et al.*, 2017). Es wäre somit gerade bei Betrachtung von Erkrankungen des fortgeschrittenen Alters wie dem M. Parkinson aufschlussreich, wie diese „proinflammatorisch vorprogrammierten“ Mikroglia auf Empagliflozin reagieren.

#### **5.4.2. Wie geeignet ist Empagliflozin zur Anwendung als Mikroglia-Modulator beim M. Parkinson? Abschließendes Fazit und Ausblick**

Die in dieser Arbeit festgestellte *in vitro*-Reduktion der mikroglialen Inflammation war häufig erst bei der Kombination aus hohen Empagliflozin-Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  mit langen Stimulationszeiträumen deutlich sichtbar. Dies gilt vor allem für die Herabregulierung der Expression von IL-1 $\beta$  sowie der iNOS in den Mikroglia. Eine signifikante Reduktion der proinflammatorischen Mediatoren gelang mit 0,5  $\mu\text{M}$  nur in schwächer ausgeprägtem Maße für die Freisetzung von IL-6, TNF- $\alpha$  sowie NO in den Überstand. Gerade aber diese niedrigere Empagliflozin-Konzentration scheint bezüglich der Übertragung auf *in vivo*-Prozesse beim Menschen relevanter zu sein, da angenommen wird, dass die Plasmakonzentration unter normaler Dosierung etwa in diesem Bereich liegt (Heise *et al.*, 2013; Friedrich *et al.*, 2013). Allerdings verwendeten auch andere Arbeitsgruppen bei ihren Untersuchungen mit bis zu 150  $\mu\text{M}$  deutlich höhere Empagliflozin-Konzentrationen (Shi *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019). Hinsichtlich einer möglichen Toxizität erwies sich Empagliflozin in dieser Arbeit auch in hohen Konzentrationen in Bezug auf Mikroglia als unbedenklich, da alle verwendeten Konzentrationen das Zellüberleben sogar steigerten. Trotzdem ist es schwer vorstellbar, dass diese sehr hohe Konzentration im Plasma erreicht und über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten wird. So führte die orale Gabe von bis zu 800 mg Empagliflozin (Vgl. Maximaldosis in der Diabetes-Therapie: 25 mg/Tag, Europäische Arzneimittelagentur) an gesunden Probanden zu Plasmakonzentrationen von bis zu 7,9  $\mu\text{M}$ , interessanterweise ohne dass trotz dieser hohen Dosierung vermehrt Nebenwirkungen auftraten (Seman *et al.*, 2013).

Neben dem Erlangen der für die hier beobachteten Effekte notwendigen Plasmakonzentration ist auch die Passierbarkeit der Blut-Hirn-Schranke (BHS) durch Empagliflozin ungeklärt. Verglichen mit BHS-gängigen Medikamenten wie Antidepressiva oder Neuroleptika weist Empagliflozin ein höheres Molekulargewicht auf, was gegen eine BHS-Gängigkeit spricht. Manche Autoren postulieren allerdings für einen weiteren SGLT2-Inhibitor, Dapagliflozin, aufgrund seiner Lipophilie eine BHS-Penetration (Bakris *et al.*, 2009). Dieser Hypothese widersprechen Untersuchungen in Ratten, in denen die Verteilung des Medikaments nach intravenöser Gabe mittels Positronen-Emissions-Tomografie (PET) geprüft wurde. Dabei ergab sich keine Ansammlung Dapagliflozins in den Gehirnen der Versuchstiere (Ghezzi *et al.*, 2017). Denkbar ist, dass Empagliflozin sich aufgrund der Zugehörigkeit zur selben Stoffklasse ähnlich verhält und daher nicht die BHS passieren kann. Auch wenn beim M. Parkinson eine Erhöhung der BHS-Permeabilität in von der Neurodegeneration betroffenen Hirnregionen nachgewiesen wurde (Gray und Woulfe, 2015), kann daraus nicht zwangsläufig auf eine Permeabilitätssteigerung geschlossen werden, die sich auch zur Beförderung neuer Medikamente über die BHS nutzen lässt. So kommt es im Zuge der pathologischen Prozesse an der BHS perivaskulär auch zur Ablagerung toxischer Substanzen, die eine zusätzliche Beeinträchtigung des Stofftransports zum Gehirn darstellen (Sweeney *et al.*, 2018). Manche Autoren nehmen trotzdem an, dass eine geschädigte BHS für Empagliflozin eine therapeutisch nutzbare Eintrittsstelle in das ZNS darstellt (Amin *et al.*, 2020). Zum jetzigen Zeitpunkt ist daher eine Penetration Empagliflozins ins ZNS unklar, weshalb sich diesbezüglich weiterführende Untersuchungen anschließen sollten, um die Möglichkeit einer klinischen Anwendung im ZNS zu evaluieren.

Entscheidender noch als durch die Problematiken der Empagliflozin-Konzentration sowie der BHS-Passierbarkeit wird die Eignung von Empagliflozin zur therapeutischen Modulation der Mikroglia beim M. Parkinson durch die wahrscheinlich fehlende Induktion neuroregenerativer Signalwege eingeschränkt. In dieser Arbeit konnte zwar ein antiinflammatorischer Effekt des SGLT2-Inhibitors festgestellt werden. Jedoch beinhaltet die von Mikroglia ausgehende Neuroinflammation außer einer Beteiligung an neurodegenerativen Erkrankungen auch einen physiologischen Hintergrund, nämlich den Schutz der Neurone, weshalb sich vordringlich die langfristig anhaltende Neuroinflammation schädlich und neurodegenerativ auswirkt (Hickman *et al.*, 2018). In der Vergangenheit hat sich im Bezug auf die mikrogliale Neuroinflammation deshalb die Bezeichnung des „zweischneidigen Schwertes“ etabliert (Hickman *et al.*, 2018; Marchetti und Abbraccio, 2005). Somit ist die bloße Dämpfung und Herabregulierung der entzündlichen Mediatoren kein erstrebenswertes

therapeutisches Ziel (Tansey und Goldberg, 2010). Eine therapeutische Strategie sollte stets die Balance zwischen einer Unterdrückung der schädlichen Mikroglia-Effekte und der Förderung neuroprotektiver Funktionen beinhalten. Die in diesen Versuchen festgestellte Reduktion der IL-10-Freisetzung durch Empagliflozin deutet allerdings darauf hin, dass eine derartige Beeinflussung der Mikroglia in dieser Arbeit nicht gelang. Eine diesbezüglich endgültige Aussage kann mit den vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht getroffen werden, da der Einfluss Empagliflozins auf andere neuroregenerative Moleküle oder antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 sowie Wachstumsfaktoren (Kap. 1.2.1) in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Dementsprechend können weitere Experimente aufschlussreich sein, die die Beeinflussung des Expressionsprofils durch Empagliflozin tiefergehend untersuchen, gerade im Hinblick auf die Expression neuroregenerativer Mediatoren. Zumindest nach Betrachtung den hier erzielten Ergebnisse führt Empagliflozin wahrscheinlich nicht zu einer Induktion des M2-Phänotyps an Mikroglia, was eine zukünftige therapeutische Verwendung zur Mikroglia-Modulation bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem M. Parkinson unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Für Empagliflozin wurde an Tiermodellen des Diabetes mellitus Typ 2 neben einer verbesserten kognitiven Leistungsfähigkeit auch eine Reduktion oxidativen Stresses sowie inflammatorischer Prozesse in den Gehirnen der Versuchstiere aufgezeigt (B. Lin *et al.*, 2014). In dieser Arbeit konnte bei plasmarelevanten Empagliflozin-Konzentrationen zudem ein schwacher, direkter antiinflammatorischer Effekt an Mikroglia festgestellt werden. Dieser allein rechtfertigt, wie oben dargelegt, nicht den gezielten Einsatz zur Mikroglia-Modulation bei neurodegenerativen Erkrankungen, jedoch kann in Zusammenschau mit den systemischen Wirkungen eine neuroprotektive Wirkung Empagliflozins im diabetischen Gehirn postuliert werden. Zukünftig von Interesse wäre daher, ob diese neuroprotektive Wirkung selektiv beim Diabetes mellitus Typ 2 zum Tragen kommt oder ob eine Eignung auch bei nicht-diabetischen Stoffwechsellagen besteht. So könnten von einer Eindämmung der peripheren Inflammation auch positive Effekte auf das Überleben dopaminerger Neurone ausgehen (Kustrimovic *et al.*, 2018). Aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich mit den pathophysiologischen Gemeinsamkeiten des M. Parkinson sowie Diabetes mellitus Typ 2. Die eingangs erwähnten ätiologischen Faktoren beim M. Parkinson, u.a. mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress und Entzündungsprozesse, sind auch in die Pathogenese des Diabetes mellitus involviert (Kim *et al.*, 2017; Hassan *et al.*, 2020). Hyperglykämie Stoffwechsellagen sind möglicherweise auch für eine Glykierung des  $\alpha$ -Synucleins und eine darüber gesteigerte Toxizität der Proteinaggregate verantwortlich (Vicente Miranda *et al.*, 2016). Passend dazu rückten auch

epidemiologische Zusammenhänge wie das erhöhte Erkrankungsrisiko für M. Parkinson bei vorbestehendem Diabetes mellitus Typ 2 in den Fokus der Forschung (Hassan *et al.*, 2020). Die Hoffnung liegt darin, zukünftig durch genauere Untersuchungen der verantwortlichen Signalwege therapeutische Zielstrukturen für beide Erkrankungen identifizieren zu können. Nach Identifizierung dieser Signalwege kann es zukünftig sinnvoll sein, eine eventuelle Beeinflussung durch Empagliflozin oder andere Antidiabetika zu untersuchen und darüber gegebenenfalls andere, neue Therapiestrategien zur Behandlung des M. Parkinson zu erschließen.

## 6. Zusammenfassung

Der M. Parkinson wird im Zuge des demografischen Wandels eine zunehmende Bedeutung für den klinischen Alltag entwickeln und wird heute vor allem durch Substitution des Neurotransmitters Dopamin und tiefe Hirnstimulation therapiert. Eine kausale Therapie, die den Untergang dopaminerger Neurone verhindert, ist bisher nicht möglich. Im Zuge der Erforschung der Mechanismen, die zu Entstehung und Progression des M. Parkinson beitragen, sind auch die Mikroglia in den Fokus gerückt. Für diese Zellen wurde im Zusammenhang mit dem M. Parkinson eine Dysregulation nachgewiesen, die sich in der stark erhöhten Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie u. a. IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und NO darstellt. Über die daraus resultierende Neurotoxizität wird die mikrogliale Dysregulation daher für die weitere Progression der Erkrankung mitverantwortlich gemacht. Als mögliche Therapiestrategie gilt daher, den proinflammatorischen Mikroglia-Phänotyp in Richtung eines neuroregenerativen Phänotyps zu modifizieren, welcher sich durch vermehrte Produktion und Freisetzung antiinflammatorischer Moleküle, wie z.B. IL-10, auszeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde *in vitro* untersucht, ob der SGLT2-Inhibitor Empagliflozin die Mikroglia auf diese Weise beeinflussen kann und sich daher als mögliches Therapeutikum für neurodegenerative Erkrankungen wie den M. Parkinson eignet.

Empagliflozin hat in großen klinischen Studien an Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ein überraschend gutes kardiovaskuläres und renales Outcome ergeben, das nicht allein über dessen blutzuckersenkende Wirkung erklärt werden kann. Zudem wurden für andere SGLT2-Inhibitoren direkte antiinflammatorische Effekte auf Zellen, die den Mikroglia entwicklungsbiologisch verwandt sind, festgestellt. Denkbar ist daher, dass Empagliflozin neben seiner systemischen blutzuckersenkenden Wirkung auch eine direkte Modulierung inflammatorischer Prozesse vollzieht.

Dieser Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig an isolierten Mikroglia der Ratte *in vitro* nachgegangen, wobei die Mikroglia durch eine Behandlung mit LPS in einen ähnlichen Aktivitätszustand wie beim M. Parkinson versetzt wurden. Dabei zeigte sich in verschiedenen Konzentrationen keine Zytotoxizität auf die Zellen. In einer zeit- und konzentrationsabhängigen Wirkung vermochte Empagliflozin zudem die mRNA-Expression und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Enzyme signifikant zu reduzieren. Auf Seiten der antiinflammatorischen Mediatoren wurde die Sekretion des Zytokins IL-10 aus den Mikroglia ebenfalls reduziert. Es war eine allenfalls leichte Reduktion der NO-Freisetzung erkennbar. Signalwege der Neuroinflammation, wie die MAP-Kinasen ERK<sub>1/2</sub> und der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, wurden in ihrem Aktivitätsgrad herabreguliert, wobei die

Beeinflussung der ERK<sub>1/2</sub>-Kaskade in einem begrenzten Zeitfenster stattfand. Die antiinflammatorischen Effekte waren zudem häufig erst bei hohen Empagliflozin-Konzentrationen und/oder langen Stimulationszeiträumen stark ausgeprägt. Als Erklärung für die Beeinflussung der Zytokinexpression durch Empagliflozin ist eine Inhibition des NHE-1 auf der Zelloberfläche der Mikroglia oder ein Anstoßen der AMP-Kinase denkbar.

Insgesamt konnte Empagliflozin *in vitro* zwar die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren, insbesondere bei Verwendung hoher Konzentrationen, reduzieren. Es war jedoch hinsichtlich des ebenfalls reduzierten IL-10 in den hier durchgeführten Versuchen wahrscheinlich nicht in der Lage, einen neuroregenerativen Mikroglia-Phänotyp zu induzieren und somit eine bei neurodegenerativen Erkrankungen wünschenswerte Modulation des mikroglialen Phänotyps zu bewirken. Zudem stehen weitere ungeklärte Fragen, wie beispielsweise die fragliche Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität, einer weiteren Evaluierung der Substanz zur therapeutischen Beeinflussung der mikroglialen Neuroinflammation beim M. Parkinson im Weg und lassen eine zukünftige alleinige therapeutische Anwendung beim M. Parkinson unwahrscheinlich erscheinen.

## 7. Literaturverzeichnis

- N. A. T. Abbas, A. El. Salem und M. M. Awad (2018) ‘Empagliflozin, SGLT2 inhibitor, attenuates renal fibrosis in rats exposed to unilateral ureteric obstruction: potential role of klotho expression’, *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, 391, pp. 1347–1360.
- A. M. Abdelhamid, A. R. Elsheakh, R. R. Abdelaziz und G. M. Suddek (2020) ‘Empagliflozin ameliorates ethanol-induced liver injury by modulating NF- $\kappa$ B/Nrf-2/PPAR- $\gamma$  interplay in mice’, *Life Sciences*, 256, p. 117908.
- Y. Akaneya, M. Takahashi und H. Hatanaka (1995) ‘Interleukin-1 $\beta$  enhances survival and interleukin-6 protects against MPP<sup>+</sup>neurotoxicity in cultures of fetal rat dopaminergic neurons’, *Experimental Neurology*, 136(1), pp. 44–52.
- F. Aktan (2004) ‘iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation’, *Life Sciences*, 75(6), pp. 639–653.
- E. F. Amin, R. A. Rifaai und R. G. Abdel-latif (2020) ‘Empagliflozin attenuates transient cerebral ischemia/reperfusion injury in hyperglycemic rats via repressing oxidative–inflammatory–apoptotic pathway’, *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 34, pp. 548–558.
- I. Andreadou, P. Efentakis, E. Balafas, G. Togliatto, C. H. Davos, A. Varela, C. A. Dimitriou, P. E. Nikolaou, E. Maratou, V. Lambadiari, I. Ikonomidis, N. Kostomitsopoulos, M. F. Brizzi, G. Dimitriadis und E. K. Iliodromitis (2017) ‘Empagliflozin limits myocardial infarction in vivo and cell death in vitro: Role of STAT3, mitochondria, and redox aspects’, *Frontiers in Physiology*, 8, p. 1077.
- S. H. Appel, D. R. Beers und J. S. Henkel (2010) ‘T cell-microglial dialogue in Parkinson’s disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening?’, *Trends in Immunology*, 31, pp. 7–17.
- T. Arimoto, D. Y. Choi, X. Lu, M. Liu, X. V. Nguyen, N. Zheng, C. A. Stewart, H. C. Kim und G. Bing (2007) ‘Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra’, *Neurobiology of Aging*, 28, pp. 894–906.
- T. Arimoto und G. Bing (2003) ‘Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration’, *Neurobiology of Disease*, 12, pp. 35–45.
- M. del C. Asensio Lopez, A. Lax, A. Hernandez Vicente, E. Saura Guillen, A. Hernandez-Martinez, M. J. Fernandez del Palacio, A. Bayes Genis und D. A. Pascual Figal (2020) ‘Empagliflozin improves post-infarction cardiac remodeling through GTP enzyme cyclohydrolase 1 and irrespective of diabetes status’, *Scientific Reports*, 10(1), p. 13553.

- A. Baartscheer, C. A. Schumacher, R. C. I. Wüst, J. W. T. Fiolet, G. J. M. Stienen, R. Coronel und C. J. Zuurbier (2017) 'Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na<sup>+</sup> through inhibition of the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in rats and rabbits', *Diabetologia*, 60(3), pp. 568–573.
- J. J. Bajramovic (2011) 'Regulation of innate immune responses in the central nervous system', *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 10, pp. 4–24.
- G. L. Bakris, V. A. Fonseca, K. Sharma und E. M. Wright (2009) 'Renal sodium-glucose transport: Role in diabetes mellitus and potential clinical implications', *Kidney International*, 75, pp. 1272–1277.
- A. Bal-Price und G. C. Brown (2001) 'Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(17), pp. 6480–6491.
- C. Barcia, A. Sánchez Bahillo, E. Fernández-Villalba, V. Bautista, M. Poza Y Poza, A. Fernández-Barreiro, E. C. Hirsch und M. T. Herrero (2004) 'Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure', *GLIA*, 46(4), pp. 402–409.
- J. Beckman und W. Koppenol (1996) 'Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.', *The American journal of physiology*, 271(73), pp. C1424–C1437.
- S. Di Benedetto, L. Müller, E. Wenger, S. Düzel und G. Pawelec (2017) 'Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 75, pp. 114–128.
- L. M. Bolin, I. Strycharska-Orczyk, R. Murray, J. W. Langston und D. Di Monte (2002) 'Increased vulnerability of dopaminergic neurons in MPTP-lesioned interleukin-6 deficient mice', *Journal of Neurochemistry*, 83, pp. 167–175.
- H. Braak, K. Del Tredici, U. Rüb, R. A. I. De Vos, E. N. H. Jansen Steur und E. Braak (2003) 'Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease', *Neurobiology of Aging*, 24(2), pp. 197–211.
- G. C. Brown und A. Vilalta (2015) 'How microglia kill neurons', *Brain Research*, 1628, pp. 288–297.
- M. J. Brzozowski, P. Jenner und S. Rose (2015) 'Inhibition of i-NOS but not n-NOS protects rat primary cell cultures against MPP<sup>+</sup>-induced neuronal toxicity', *Journal of Neural Transmission*, 122(6), pp. 779–788.
- O. Butovsky, A. E. Talpalar, K. Ben-Yaakov und M. Schwartz (2005) 'Activation of

microglia by aggregated  $\beta$ -amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN- $\gamma$  and IL-4 render them protective', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 29(3), pp. 381–393.

N. J. Byrne, N. Matsumura, Z. H. Maayah, M. Ferdaoussi, S. Takahara, A. M. Darwesh, J. L. Levasseur, J. W. S. Jahng, D. Vos, N. Parajuli, A. O. S. El-Kadi, B. Braam, M. E. Young, S. Verma, P. E. Light, G. Sweeney, J. M. Seubert und J. R. B. Dyck (2020) 'Empagliflozin blunts worsening cardiac dysfunction associated with reduced NLRP3 (nucleotide-binding domain-like receptor protein 3) inflammasome activation in heart failure', *Circulation: Heart Failure*, 13, p. 6277.

A. E. Cardona, E. P. Pioro, M. E. Sasse, V. Kostenko, S. M. Cardona, I. M. Dijkstra, D. R. Huang, G. Kidd, S. Dombrowski, R. Dutta, J. C. Lee, D. N. Cook, S. Jung, S. A. Lira, D. R. Littman und R. M. Ransohoff (2006) 'Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor', *Nature Neuroscience*, 9, pp. 917–924.

M. J. Carson, J. Crane und A. X. Xie (2008) 'Modeling CNS microglia: the quest to identify predictive models', *Drug Discovery Today: Disease Models*, 5, pp. 19–25.

P. M. Carvey, E. Y. Chen, J. W. Lipton, C. W. Tong, Q. A. Chang und Z. D. Ling (2005) 'Intra-parenchymal injection of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 1- $\beta$  produces dopamine neuron loss in the rat', *Journal of Neural Transmission*, 112, pp. 601–612.

A. Castaño, A. J. Herrera, J. Cano und A. Machado (2002) 'The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  IFN- $\gamma$ ', *Journal of Neurochemistry*, 81, pp. 150–157.

C. C. Chao, S. X. Hu, L. Ehrlich und P. K. Peterson (1995) 'Interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  synergistically mediate neurotoxicity: Involvement of nitric oxide and of n-methyl-d-aspartate receptors', *Brain Behavior and Immunity*, 9(4), pp. 355–365.

C. C. Chen, J. T. Lin, Y. F. Cheng, C. Y. Kuo, C. F. Huang, S. H. Kao, Y. J. Liang, C. Y. Cheng und H. M. Chen (2014) 'Amelioration of LPS-induced inflammation response in microglia by AMPK activation', *BioMed Research International*, 2014, pp. 1–9.

M. Chertoff, N. Di Paolo, A. Schoeneberg, A. Depino, C. Ferrari, W. Wurst, K. Pfizenmaier, U. Eisel und F. Pitossi (2011) 'Neuroprotective and neurodegenerative effects of the chronic expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice', *Experimental Neurology*, 227(2), pp. 237–251.

M. Colonna und O. Butovsky (2017) 'Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration', *Annual Review of Immunology*, 35(1), pp. 441–468.

- C. A. Colton (2009) 'Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain', *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4(4), pp. 399–418.
- C. L. Cunningham, V. Martinez-Cerdeno und S. C. Noctor (2013) 'Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex', *Journal of Neuroscience*, 33(10), pp. 4216–4233.
- G. D'Arcangelo, V. Tancredi, F. Onofri, M. D'Antuono, S. Giovedì und F. Benfenati (2000) 'Interleukin-6 inhibits neurotransmitter release and the spread of excitation in the rat cerebral cortex', *European Journal of Neuroscience*, 12, pp. 1241–1252.
- G. Deuschl, W. Oertel und H. Reichmann (2016) 'S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom', *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*.
- V. Dias, E. Junn und M. M. Mouradian (2013) 'The role of oxidative stress in parkinson's disease', *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), pp. 461–491.
- D. W. Dickson (2012) 'Parkinson's disease and parkinsonism: Neuropathology', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), pp. a009258–a009258.
- E. Dorsey, R. Constantinescu, J. Thompson, K. Biglan, R. Holloway und K. Kieburtz (2007) 'Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030', *Neurology*, 68, pp. 384–386.
- C. C. Ferrari, M. C. Pott Godoy, R. Tarelli, M. Chertoff, A. M. Depino und F. J. Pitossi (2006) 'Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1 $\beta$  in the substantia nigra', *Neurobiology of Disease*, 24, pp. 183–193.
- S. A. Ferreira und M. Romero-Ramos (2018) 'Microglia response during Parkinson's disease: Alpha-synuclein intervention', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, p. 247.
- J. E. Frampton (2018) 'Empagliflozin: A review in type 2 diabetes', *Drugs*, 78(10), pp. 1037–1048.
- C. Friedrich, K. Metzmann, P. Rose, M. Mattheus, S. Pinnetti und H. J. Woerle (2013) 'A randomized, open-label, crossover study to evaluate the pharmacokinetics of Empagliflozin and Linagliptin after coadministration in healthy male volunteers', *Clinical Therapeutics*, 35, pp. A33-42.
- T. F. Galatro, I. R. Holtman, A. M. Lerario, I. D. Vainchtein, N. Brouwer, P. R. Sola, M. M. Veras, T. F. Pereira, R. E. P. Leite, T. Möller, P. D. Wes, M. C. Sogayar, J. D. Laman, W. Den Dunnen, C. A. Pasqualucci, S. M. Oba-Shinjo, E. W. G. M. Boddeke, S. K. N. Marie und B. J. L. Eggen (2017) 'Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes', *Nature Neuroscience*, 20, pp. 1162–1171.
- H.-M. Gao, B. Liu, Z. Wanqin und J.-S. Hong (2003) 'Critical role of microglial NADPH

oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease', *The FASEB Journal*, 17, pp. 1954–1956.

H. M. Gao, J. Jiang, B. Wilson, W. Zhang, J. S. Hong und B. Liu (2002) 'Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: Relevance to Parkinson's disease', *Journal of Neurochemistry*, 81(6), pp. 1285–1297.

T. Gaspari, I. Spizzo, H. Bin Liu, Y. Hu, R. W. Simpson, R. E. Widdop und A. E. Dear (2018) 'Dapagliflozin attenuates human vascular endothelial cell activation and induces vasorelaxation: A potential mechanism for inhibition of atherogenesis', *Diabetes and Vascular Disease Research*, 15, pp. 64–73.

A. Gerhard, N. Pavese, G. Hotton, F. Turkheimer, M. Es, A. Hammers, K. Eggert, W. Oertel, R. B. Banati und D. J. Brooks (2006) 'In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease', *Neurobiology of Disease*, 21, pp. 404–412.

C. Ghezzi, A. S. Yu, B. A. Hirayama, V. Kepe, J. Liu, C. Scafoglio, D. R. Powell, S.-C. Huang, N. Satyamurthy, J. R. Barrio und E. M. Wright (2017) 'Dapagliflozin binds specifically to sodium-glucose cotransporter 2 in the proximal renal tubule', *Journal of the American Society of Nephrology*, 28, pp. 802–810.

M. T. Gray und J. M. Woulfe (2015) 'Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(5), pp. 747–750.

H. F. Green, S. Khosousi und P. Svenningsson (2019) 'Plasma IL-6 and IL-17A correlate with severity of motor and non-motor symptoms in parkinson's disease', *Journal of Parkinson's Disease*, 9, pp. 705–709.

D. L. Gruol (2015) 'IL-6 regulation of synaptic function in the CNS', *Neuropharmacology*, 96, pp. 42–54.

J. Habibi, A. R. Aroor, J. R. Sowers, G. Jia, M. R. Hayden, M. Garro, B. Barron, E. Mayoux, R. S. Rector, A. Whaley-Connell und V. G. DeMarco (2017) 'Sodium glucose transporter 2 (SGLT2) inhibition with empagliflozin improves cardiac diastolic function in a female rodent model of diabetes', *Cardiovascular Diabetology*, 16, p. 9.

J. H. Han, T. J. Oh, G. Lee, H. J. Maeng, D. H. Lee, K. M. Kim, S. H. Choi, H. C. Jang, H. S. Lee, K. S. Park, Y. B. Kim und S. Lim (2017) 'The beneficial effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on atherosclerosis in ApoE  $-/-$  mice fed a western diet', *Diabetologia*, 60, pp. 364–376.

U. K. Hanisch (2002) 'Microglia as a source and target of cytokines', *GLIA*, 40(2), pp. 140–155.

- G. J. Harry (2013) 'Microglia during development and aging', *Pharmacology and Therapeutics*, 139, pp. 313–326.
- A. Hassan, R. Sharma Kandel, R. Mishra, J. Gautam, A. Alaref und N. Jahan (2020) 'Diabetes mellitus and parkinson's disease: shared pathophysiological links and possible therapeutic implications', *Cureus*, 12, p. e9853.
- M. Heimke (2018) 'Antiinflammatorische Wirkung von Honokiol auf Mikroglia und Astrozyten', *Med. Diss.*, Kiel.
- T. Heise, L. Seman, S. Macha, P. Jones, A. Marquart, S. Pinnetti, H. J. Woerle und K. Dugi (2013) 'Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of multiple rising doses of empagliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus', *Diabetes Therapy*, 4, pp. 331–345.
- S. Hickman, S. Izzy, P. Sen, L. Morsett und J. El Khoury (2018) 'Microglia in neurodegeneration', *Nature Neuroscience*, 21, pp. 1359–1369.
- E. C. Hirsch und S. Hunot (2009) 'Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?', *The Lancet Neurology*, 8(4), pp. 382–397.
- A. Hoffmann, O. Kann, C. Ohlemeyer, U.-K. Hanisch und H. Kettenmann (2003) 'Elevation of basal intracellular calcium as a central element in the activation of brain macrophages (microglia): suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function', *The Journal of neuroscience*, 23, pp. 4410–4419.
- F. Iannantuoni, A. M. de Marañon, N. Diaz-Morales, R. Falcon, C. Bañuls, Z. Abad-Jimenez, V. M. Victor, A. Hernandez-Mijares und S. Rovira-Llopis (2019) 'The SGLT2 inhibitor Empagliflozin ameliorates the inflammatory profile in type 2 diabetic patients and promotes an antioxidant response in leukocytes', *Journal of Clinical Medicine*, 8, p. 1814.
- C. S. Jack, N. Arbour, J. Manusow, V. Montgrain, M. Blain, E. McCrea, A. Shapiro und J. P. Antel (2005) 'TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes', *The Journal of Immunology*, 175, pp. 4320–4330.
- M. Jana, J. A. Anderson, R. N. Saha, X. Liu und K. Pahan (2005) 'Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes', *Free Radic Biol Med*, 38, pp. 655–664.
- Z. A. Jigheh, A. G. Haghjo, H. Argani, L. Roshangar, N. Rashtchizadeh, D. Sanajou, S. N. S. Ahmad, J. Rashedi, S. Dastmalchi und M. M. Abbasi (2019) 'Empagliflozin alleviates renal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats partly by repressing HMGB1-TLR4 receptor axis', *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22, pp. 384–390.
- L. V. Kalia und A. E. Lang (2015) 'Parkinson's disease', *The Lancet*, 386(9996), pp. 896–

912.

M. Karmazyn (2013) 'NHE-1: Still a viable therapeutic target', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 61, pp. 77–82.

M. N. Karpenko, A. A. Vasilishina, E. A. Gromova, Z. M. Muruzheva und A. Bernadotte (2018) 'Interleukin-1 $\beta$  interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in CSF and serum in relation to the clinical diversity of Parkinson's disease', *Cellular Immunology*, 327, pp. 77–82.

P. M. Keeney (2006) 'Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled', *Journal of Neuroscience*, 26(19), pp. 5256–5264.

H. Kettenmann, U.-K. Hanisch, M. Noda und A. Verkhratsky (2011) 'Physiology of Microglia', *Physiological Reviews*, 91(2), pp. 461–553.

T. K. Khoo, A. J. Yarnall, G. W. Duncan, S. Coleman, J. T. O'Brien, D. J. Brooks, R. A. Barker und D. J. Burn (2013) 'The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease', *Neurology*, 80(3), pp. 276–281.

D. S. Kim, H. Il Choi, Y. Wang, Y. Luo, B. J. Hoffer und N. H. Greig (2017) 'A new treatment strategy for Parkinson's disease through the gut–brain axis: the glucagon-like peptide-1 receptor pathway', *Cell Transplantation*, 26(9), pp. 1560–1571.

A. Klegeris, S. Pelech, B. I. Giasson, J. Maguire, H. Zhang, E. G. McGeer und P. L. McGeer (2008) ' $\alpha$ -Synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia', *Neurobiology of Aging*, 29(5), pp. 739–752.

V. Kothari, J. A. Galdo und S. T. Mathews (2016) 'Hypoglycemic agents and potential anti-inflammatory activity', *Journal of Inflammation Research*, 9, pp. 27–38.

A. Kouli, C. B. Horne und C. H. Williams-Gray (2019) 'Toll-like receptors and their therapeutic potential in Parkinson's disease and  $\alpha$ -synucleinopathies', *Brain, Behavior, and Immunity*, 81, pp. 41–51.

C. N. Koyani, I. Plastira, H. Sourij, S. Hallström, A. Schmidt, P. P. Rainer, H. Bugger, S. Frank, E. Malle und D. von Lewinski (2020) 'Empagliflozin protects heart from inflammation and energy depletion via AMPK activation', *Pharmacological Research*, 158, p. 104870.

N. Kustrimovic, F. Marino und M. Cosentino (2018) 'Peripheral immunity, immunoaging and neuroinflammation in Parkinson's disease', *Current Medicinal Chemistry*, 26(20), pp. 3719–3753.

A. J. Kwilasz, P. M. Grace, P. Serbedzija, S. F. Maier und L. R. Watkins (2015) 'The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases', *Neuropharmacology*, 96,

pp. 55–69.

H. S. Kwon und S. H. Koh (2020) ‘Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes’, *Translational Neurodegeneration*, 9(1), p. 42.

S. Lahnwong, S. C. Chattipakorn und N. Chattipakorn (2018) ‘Potential mechanisms responsible for cardioprotective effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors’, *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), p. 101.

J. W. Langston, P. Ballard, J. W. Tetrud und I. Irwin (1983) ‘Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis’, *Science*, 219(4587), pp. 979–980.

J. W. Langston, L. S. Forno, J. Tetrud und G. Reeves (1999) ‘Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure’, *Annals of neurology*, 46, pp. 598–605.

L. M. de Lau und M. M. Breteler (2006) ‘Epidemiology of Parkinson’s disease’, *Lancet Neurology*, 5(6), pp. 525–535.

M. C. Leal, J. C. Casabona, M. Puntel und F. Pitossi (2013) ‘Interleukin-1beta and TNF-alpha: Reliable targets for protective therapies in Parkinson’s disease?’, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, p. 53.

A. Ledeboer, J. J. P. Brevé, A. Wierinckx, S. Van Der Jagt, A. F. Bristow, J. E. Leysen, F. J. H. Tilders und A. M. Van Dam (2002) ‘Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells’, *European Journal of Neuroscience*, 16(7), pp. 1175–1185.

N. Lee, Y. J. Heo, S.-E. Choi, J. Y. Jeon, S. J. Han, D. J. Kim, Y. Kang, K. W. Lee und H. J. Kim (2021) ‘Anti-inflammatory effects of Empagliflozin and Gemigliptin on LPS-stimulated macrophage via the IKK/NF- $\kappa$ B, MKK7/JNK, and JAK2/STAT1 signalling pathways’, *Journal of immunology research*, 2021, p. 9944880.

A. J. Lees, J. Hardy und T. Revesz (2009) ‘Parkinson’s disease’, *The Lancet*, 373(9680), pp. 2055–2066.

N. Li, B. W. Liu, W. Z. Ren, J. X. Liu, S. N. Li, S. P. Fu, Y. L. Zeng, S. Y. Xu, X. Yan, Y. J. Gao, D. F. Liu und W. Wang (2016) ‘GLP-2 attenuates LPS-induced inflammation in BV-2 cells by inhibiting ERK1/2, JNK1/2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways’, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), p. 190.

S. A. Liddel, K. A. Guttenplan, L. E. Clarke, F. C. Bennett, C. J. Bohlen, L. Schirmer, M. L. Bennett, A. E. Münch, W. S. Chung, T. C. Peterson, D. K. Wilton, A. Frouin, B. A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M. S. Buckwalter, D. H. Rowitch, V. L. Dawson, T. M. Dawson, B. Stevens und B. A. Barres (2017) ‘Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated

- microglia', *Nature*, 541(7638), pp. 481–487.
- B. Lin, N. Koibuchi, Y. Hasegawa, D. Sueta, K. Toyama, K. Uekawa, M. J. Ma, T. Nakagawa, H. Kusaka und S. Kim-Mitsuyama (2014) 'Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice', *Cardiovascular Diabetology*, 13, p. 148.
- X. Lin, J. A. Kraut und D. Wu (2014) 'Coadministration of a Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor and sodium bicarbonate for the treatment of asphyxia-induced cardiac arrest in piglets', *Pediatric Research*, 76(2), pp. 118–126.
- Y. Liu, D. B. Kintner, V. Chanana, J. Algharabli, X. Chen, Y. Gao, J. Chen, P. Ferrazzano, J. K. Olson und D. Sun (2010) 'Activation of microglia depends on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange-mediated H<sup>+</sup> homeostasis', *Journal of Neuroscience*, 30(45), pp. 15210–15220.
- Y. Liu, J. Xu, M. Wu, B. Xu und L. Kang (2021) 'Empagliflozin protects against atherosclerosis progression by modulating lipid profiles and sympathetic activity', *Lipids in health and disease*, 20(1), p. 5.
- K. J. Livak und T. D. Schmittgen (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method.', *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp. 402–408.
- Z. H. Maayah, M. Ferdaoussi, S. Takahara, S. Soni und J. R. B. Dyck (2020) 'Empagliflozin suppresses inflammation and protects against acute septic renal injury', *Inflammopharmacology*, 29(1), pp. 269–279.
- P. Mander und G. C. Brown (2005) 'Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: A dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration', *Journal of Neuroinflammation*, 2, p. 20.
- B. Marchetti und M. P. Abbracchio (2005) 'To be or not to be (inflamed) - Is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders?', *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(10), pp. 517–525.
- P. L. McGeer, S. Itagaki, B. E. Boyes und E. G. McGeer (1988) 'Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains', *Neurology*, 38(8), pp. 1285–1285.
- R. J. Medina, C. L. O'Neill, T. M. O'Doherty, H. Knott, J. Guduric-Fuchs, T. A. Gardiner und A. W. Stitt (2011) 'Myeloid angiogenic cells act as alternative M2 macrophages and modulate angiogenesis through interleukin-8.', *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(9–10), pp. 1045–1055.
- J. Van Meerloo, G. J. L. Kaspers und J. Cloos (2011) 'Cell sensitivity assays: The MTT

- assay', *Methods in Molecular Biology*, 731, pp. 237–245.
- D. A. Menassa und D. Gomez-Nicola (2018) 'Microglial dynamics during human brain development', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 1014.
- M. S. Moehle und A. B. West (2015) 'M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally?', *Neuroscience*, 302, pp. 59–73.
- M. Mogi, M. Harada, T. Kondo, P. Riederer, H. Inagaki, M. Minami und T. Nagatsu (1994) 'Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  are elevated in the brain from parkinsonian patients', *Neuroscience Letters*, 180(2), pp. 147–150.
- M. Mogi, T. Kondo, Y. Mizuno und T. Nagatsu (2007) 'p53 protein, interferon- $\gamma$ , and NF- $\kappa$ B levels are elevated in the parkinsonian brain', *Neuroscience Letters*, 414(1), pp. 94–97.
- D. W. Moss und T. E. Bates (2001) 'Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function', *European Journal of Neuroscience*, 13(3), pp. 529–538.
- S. Murphy (2000) 'Production of nitric oxide by glial cells: Regulation and potential roles in the CNS', *GLIA*, 29(1), pp. 1–13.
- T. Nagatsu, M. Mogi, H. Ichinose und A. Togari (2000) 'Cytokines in Parkinson's disease.', *Journal of neural transmission. Supplementum*, (58), pp. 143–51.
- Z. H. Németh, E. A. Deitch, Q. Lu, C. Szabó und G. Haskó (2002) 'NHE blockade inhibits chemokine production and NF- $\kappa$ B activation in immunostimulated endothelial cells', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 283(2), pp. C396-403.
- A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff und F. Helmchen (2005) 'Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo', *Science*, 308(5726), pp. 1314–1318.
- A. Niraula, J. F. Sheridan und J. P. Godbout (2017) 'Microglia priming with aging and stress', *Neuropsychopharmacology*, 42(1), pp. 318–333.
- W. Oertel und J. B. Schulz (2016) 'Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists', *Journal of Neurochemistry*, 139, pp. 325–337.
- A. Ojima, T. Matsui, Y. Nishino, N. Nakamura und S. Yamagishi (2015) 'Empagliflozin, an inhibitor of sodium-glucose cotransporter 2 exerts anti-inflammatory and antifibrotic effects on experimental diabetic nephropathy partly by suppressing AGEs-receptor axis', *Hormone and Metabolic Research*, 47(9), pp. 686–692.
- G. Olmos und J. Lladó (2014) 'Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity', *Mediators of Inflammation*, 2014, p. 861231.
- R. Ortega, A. Collado, F. Selles, H. Gonzalez-Navarro, M. J. Sanz, J. T. Real und L. Piqueras

- (2019) ‘SGLT-2 (sodium-glucose cotransporter 2)-inhibition reduces Ang II (angiotensin II)-induced dissecting abdominal aortic aneurysm in ApoE (apolipoprotein E) knockout mice’, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(8), pp. 1614–1628.
- M. Packer, S. D. Anker, J. Butler, G. Filippatos, S. J. Pocock, P. Carson, J. Januzzi, S. Verma, H. Tsutsui, M. Brueckmann, W. Jamal, K. Kimura, J. Schnee, C. Zeller, D. Cotton, E. Bocchi, M. Böhm, D.-J. Choi, V. Chopra, E. Chuquiure, N. Giannetti, S. Janssens, J. Zhang, J. R. Gonzalez Juanatey, S. Kaul, H.-P. Brunner-La Rocca, B. Merkely, S. J. Nicholls, S. Perrone, I. Pina, P. Ponikowski, N. Sattar, M. Senni, M.-F. Seronde, J. Spinar, I. Squire, S. Taddei, C. Wanner und F. Zannad (2020) ‘Cardiovascular and renal outcomes with Empagliflozin in heart failure’, *New England Journal of Medicine*, 383(15), pp. 1413–1424.
- M. Packer (2020) ‘SGLT2 inhibitors produce cardiorenal benefits by promoting adaptive cellular reprogramming to induce a state of fasting mimicry: A paradigm shift in understanding their mechanism of action’, *Diabetes Care*, 43(3), pp. 508–511.
- U. Panchapakesan, K. Pegg, S. Gross, M. G. Komala, H. Mudaliar, J. Forbes, C. Pollock und A. Mather (2013) ‘Effects of SGLT2 inhibition in human kidney proximal tubular cells- renoprotection in diabetic nephropathy?’, *PLoS ONE*, 8(2), p. e54442.
- R. C. Paolicelli, G. Bolasco, F. Pagani, L. Maggi, M. Scianni, P. Panzanelli, M. Giustetto, T. A. Ferreira, E. Guiducci, L. Dumas, D. Ragozzino und C. T. Gross (2011) ‘Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development’, *Science*, 333(6048), pp. 1456–1458.
- C. Perier, K. Tieu, C. Guégan, C. Caspersen, V. Jackson-Lewis, V. Carelli, A. Martinuzzi, M. Hirano, S. Przedborski, M. Vila, C. Guegan, C. Caspersen, V. Jackson-Lewis, V. Carelli, A. Martinuzzi, M. Hirano, S. Przedborski, M. Vila, C. Guégan, C. Caspersen, V. Jackson-Lewis, V. Carelli, A. Martinuzzi, M. Hirano, S. Przedborski und M. Vila (2005) ‘Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), pp. 19126–19131.
- P. Picón-Pagès, J. Garcia-Buendia und F. J. Muñoz (2019) ‘Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain’, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1865(8), pp. 1949–1967.
- M. H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe und R. L. Nussbaum (1997) ‘Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson’s disease’, *Science*, 276(5321), pp. 2045–2047.

- F. Prattichizzo, V. De Nigris, S. Micheloni, L. La Sala und A. Ceriello (2018) 'Increases in circulating levels of ketone bodies and cardiovascular protection with SGLT2 inhibitors: Is low-grade inflammation the neglected component?', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20(11), pp. 2515–2522.
- M. Prinz, T. L. Tay, Y. Wolf und S. Jung (2014) 'Microglia: Unique and common features with other tissue macrophages', *Acta Neuropathologica*, 128(3), pp. 319–331.
- L. Qian, M. L. Block, S. J. Wei, C. F. Lin, J. Reece, H. Pang, B. Wilson, J. S. Hong und P. M. Flood (2006) 'Interleukin-10 protects lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in primary midbrain cultures by inhibiting the function of NADPH oxidase', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(1), pp. 44–52.
- X. Y. Qin, S. P. Zhang, C. Cao, Y. P. Loh und Y. Cheng (2016) 'Aberrations in peripheral inflammatory cytokine levels in Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis', *JAMA Neurology*, 73(11), pp. 1316–1324.
- Z. Qiu, P. Lu, K. Wang, X. Zhao, Q. Li, J. Wen, H. Zhang, R. Li, H. Wei, Y. Lv, S. Zhang und P. Zhang (2020) 'Dexmedetomidine inhibits neuroinflammation by altering microglial M1/M2 polarization through MAPK/ERK pathway', *Neurochemical Research*, 45(2), pp. 345–353.
- M. W. Rolfe, S. L. Kunkel, B. Rowens, T. J. Standiford, E. J. Cragoe und R. M. Strieter (1992) 'Suppression of human alveolar macrophage-derived cytokines by amiloride.', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 6(6), pp. 576–582.
- M. Rothaug, C. Becker-Pauly und S. Rose-John (2016) 'The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(6), pp. 1218–1227.
- J. Sabatino, S. De Rosa, L. Tammè, C. Iaconetti, S. Sorrentino, A. Polimeni, C. Mignogna, A. Amorosi, C. Spaccarotella, M. Yasuda und C. Indolfi (2020) 'Empagliflozin prevents doxorubicin-induced myocardial dysfunction', *Cardiovascular diabetology*, 19(1), p. 66.
- E. Di Santo, T. Alonzi, E. Fattori, V. Poli, G. Ciliberto, M. Sironi, P. Gnocchi, P. Ricciardi-Castagnoli und P. Ghezzi (1996) 'Overexpression of interleukin-6 in the central nervous system of transgenic mice increases central but not systemic proinflammatory cytokine production', *Brain Research*, 740(1–2), pp. 239–244.
- M. Saraiva und A. O'Garra (2010) 'The regulation of IL-10 production by immune cells', *Nature Reviews Immunology*, 10(3), pp. 170–181.
- A. H. Schapira, J. M. Cooper, D. Dexter, P. Jenner, J. B. Clark und C. D. Marsden (1989) 'Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.', *Lancet*, 1(8649), p. 1269.

- A. H. Schapira, K. R. Chaudhuri und P. Jenner (2017) ‘Non-motor features of Parkinson disease’, *Nature Reviews Neuroscience*, 18(7), pp. 435–450.
- A. H. Schapira und P. Jenner (2011) ‘Etiology and pathogenesis of Parkinson’s disease’, *Movement Disorders*, 26(6), pp. 1049–1055.
- L. Seman, S. Macha, G. Nehmiz, G. Simons, B. Ren, S. Pinnetti, H. J. Woerle und K. Dugi (2013) ‘Empagliflozin (BI 10773), a potent and selective SGLT2 inhibitor, induces dose-dependent glucosuria in healthy subjects’, *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 2(2), pp. 152–161.
- X. Shi, S. Verma, J. Yun, K. Brand-Arzamendi, K. K. Singh, X. Liu, A. Garg, A. Quan und X. Y. Wen (2017) ‘Effect of empagliflozin on cardiac biomarkers in a zebrafish model of heart failure: clues to the EMPA-REG OUTCOME trial?’, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 433(1–2), pp. 97–102.
- Y. Shi, H. Yuan, D. Kim, V. Chanana, A. Baba, T. Matsuda, P. Cengiz, P. Ferrazzano und D. Sun (2013) ‘Stimulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 promotes microglial migration’, *PLoS ONE*, 8(8), p. e74201.
- S. S. Singh, S. N. Rai, H. Birla, W. Zahra, A. S. Rathore und S. P. Singh (2020) ‘NF-κB-mediated neuroinflammation in Parkinson’s disease and potential therapeutic effect of polyphenols’, *Neurotoxicity Research*, 37(3), pp. 491–507.
- A. M. Smith und M. Dragunow (2014) ‘The human side of microglia’, *Trends in Neurosciences*, 37(3), pp. 125–135.
- V. Spigoni, F. Fantuzzi, C. Carubbi, G. Pozzi, E. Masselli, G. Gobbi, A. Solini, R. C. Bonadonna und A. Dei Cas (2020) ‘Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors antagonize lipotoxicity in human myeloid angiogenic cells and ADP-dependent activation in human platelets: Potential relevance to prevention of cardiovascular events’, *Cardiovascular Diabetology*, 19(1), p. 46.
- M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M.-Y. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes und M. Goedert (1997) ‘α-Synuclein in Lewy bodies’, *Nature*, 388(6645), pp. 839–840.
- J. R. Steinert, T. Chernova und I. D. Forsythe (2010) ‘Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia’, *Neuroscientist*, 16(4), pp. 435–452.
- X. Su, K. A. Maguire-Zeiss, R. Giuliano, L. Prifti, K. Venkatesh und H. J. Federoff (2008) ‘Synuclein activates microglia in a model of Parkinson’s disease’, *Neurobiology of Aging*, 29(11), pp. 1690–1701.
- C. S. Subhramanyam, C. Wang, Q. Hu und S. T. Dheen (2019) ‘Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases’, *Seminars in Cell and Developmental*

*Biology*, 94, pp. 112–120.

S. R. Subramaniam und M. F. Chesselet (2013) ‘Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson’s disease’, *Progress in Neurobiology*, 106–107, pp. 17–32.

J. Sun und G. Nan (2017) ‘The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target (Review)’, *International Journal of Molecular Medicine*, 39(6), pp. 1338–1346.

M. D. Sweeney, A. P. Sagare und B. V. Zlokovic (2018) ‘Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders’, *Nature Reviews Neurology*, 14(3), pp. 133–150.

Y. Tang und W. Le (2014) “‘good” and “bad” microglia in parkinson’s disease: An understanding of homeostatic mechanisms in immunomodulation’, in *Thomas M. (eds) Inflammation in Parkinson’s Disease*, Springer-Verlag, pp. 105–126.

Y. Tang und W. Le (2016) ‘Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases’, *Molecular Neurobiology*, 53(2), pp. 1181–1194.

M. G. Tansey und M. S. Goldberg (2010) ‘Neuroinflammation in Parkinson’s disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention’, *Neurobiology of Disease*, 37(3), pp. 510–518.

I. Tikkanen, K. Narko, C. Zeller, A. Green, A. Salsali, U. C. Broedl und H. J. Woerle (2015) ‘Empagliflozin reduces blood pressure in patients with type 2 diabetes and hypertension’, *Diabetes Care*, 38(3), pp. 420–428.

D. Tsikas (2007) ‘Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research’, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 851(1–2), pp. 51–70.

L. Uthman, A. Baartscheer, B. Bleijlevens, C. A. Schumacher, J. W. T. Fiolet, A. Koeman, M. Jancev, M. W. Hollmann, N. C. Weber, R. Coronel und C. J. Zuurbier (2018b) ‘Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger, lowering of cytosolic Na<sup>+</sup> and vasodilation’, *Diabetologia*, 61(3), pp. 722–726.

L. Uthman, A. Baartscheer, C. A. Schumacher, J. W. T. Fiolet, M. C. Kuschma, M. W. Hollmann, R. Coronel, N. C. Weber und C. J. Zuurbier (2018a) ‘Direct cardiac actions of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors target pathogenic mechanisms underlying heart failure in diabetic patients’, *Frontiers in Physiology*, 9, p. 1575.

L. Uthman, M. Kuschma, G. Römer, M. Boomsma, J. Kessler, J. Hermanides, M. W. Hollmann, B. Preckel, C. J. Zuurbier und N. C. Weber (2020) ‘Novel anti-inflammatory

effects of Canagliflozin involving hexokinase II in lipopolysaccharide-stimulated human coronary artery endothelial cells', *Cardiovascular Drugs and Therapy*, <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07083-w>

V. Vallon, M. Rose, M. Gerasimova, J. Satriano, K. A. Platt, H. Koepsell, R. Cunard, K. Sharma, S. C. Thomson und T. Rieg (2013) 'Knockout of Na-glucose transporter SGLT2 attenuates hyperglycemia and glomerular hyperfiltration but not kidney growth or injury in diabetes mellitus', *AJP: Renal Physiology*, 304(2), pp. F156–F167.

H. Vicente Miranda, O. M. A. El-Agnaf und T. F. Outeiro (2016) 'Glycation in Parkinson's disease and Alzheimer's disease', *Movement Disorders*, 31(6), pp. 782–790.

N. P. Visanji, P. L. Brooks, L. N. Hazrati und A. E. Lang (2013) 'The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future', *Acta neuropathologica communications*, 1, p. 2.

K. Wakabayashi, K. Tanji, S. Odagiri, Y. Miki, F. Mori und H. Takahashi (2013) 'The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders', *Molecular Neurobiology*, 47(2), pp. 495–508.

C. Wanner, S. E. Inzucchi, J. M. Lachin, D. Fitchett, M. von Eynatten, M. Mattheus, O. E. Johansen, H. J. Woerle, U. C. Broedl und B. Zinman (2016) 'Empagliflozin and progression of kidney disease in type 2 diabetes', *New England Journal of Medicine*, 375(4), pp. 323–334.

H. Wilms, P. Rosenstiel, M. Romero-Ramos, A. Arlt, H. Schäfer, D. Seegert, P. J. Kahle, S. Odoy, J. H. Claasen, C. Holzknacht, L. O. Brandenburg, G. Deuschl, S. Schreiber, D. Kirik und R. Lucius (2009) 'Suppression of map kinases inhibits microglial activation and attenuates neuronal cell death induced by  $\alpha$ -synuclein protofibrils', *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 22(4), pp. 897–909.

S. A. Wolf, H. W. G. M. Boddeke und H. Kettenmann (2017) 'Microglia in physiology and disease', *Annual Review of Physiology*, 79(1), pp. 619–643.

M. L. Wong und J. F. Medrano (2005) 'Real-time PCR for mRNA quantitation', *BioTechniques*, 39(1), pp. 75–85.

D. C. Wu, V. Jackson-Lewis, M. Vila, K. Tieu, P. Teismann, C. Vadseth, D.-K. Choi, H. Ischiropoulos und S. Przedborski (2002) 'Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(5), pp. 1763–71.

C. Xu, W. Wang, J. Zhong, F. Lei, N. Xu, Y. Zhang und W. Xie (2018) 'Canagliflozin exerts anti-inflammatory effects by inhibiting intracellular glucose metabolism and promoting autophagy in immune cells', *Biochemical Pharmacology*, 152, pp. 45–59.

- L. Xu, N. Nagata, M. Nagashimada, F. Zhuge, Y. Ni, G. Chen, E. Mayoux, S. Kaneko und T. Ota (2017) ‘SGLT2 inhibition by Empagliflozin promotes fat utilization and browning and attenuates inflammation and insulin resistance by polarizing M2 macrophages in diet-induced obese mice’, *EBioMedicine*, 20, pp. 137–149.
- L. Xu, N. Nagata, G. Chen, M. Nagashimada, F. Zhuge, Y. Ni, Y. Sakai, S. Kaneko und T. Ota (2019) ‘Empagliflozin reverses obesity and insulin resistance through fat browning and alternative macrophage activation in mice fed a high-fat diet’, *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 7(1), p. e000783.
- C.-C. Yang, Y.-T. Chen, C. G. Wallace, K.-H. Chen, B.-C. Cheng, P.-H. Sung, Y.-C. Li, S.-F. Ko, H.-W. Chang und H.-K. Yip (2019) ‘Early administration of empagliflozin preserved heart function in cardiorenal syndrome in rat’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, pp. 658–670.
- Q. Yang und J. Zhou (2019) ‘Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells’, *GLIA*, 67(6), pp. 1017–1035.
- H. Yaribeygi, A. E. Butler, S. L. Atkin, N. Katsiki und A. Sahebkar (2018) ‘Sodium–glucose cotransporter 2 inhibitors and inflammation in chronic kidney disease: Possible molecular pathways’, *Journal of Cellular Physiology*, 234(1), pp. 223–230.
- L. Ye, Y. Huang, L. Zhao, Y. Li, L. Sun, Y. Zhou, G. Qian und J. C. Zheng (2013) ‘IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induce neurotoxicity through glutamate production: A potential role for neuronal glutaminase’, *Journal of Neurochemistry*, 125(6), pp. 897–908.
- Y. Ye, M. Bajaj, H. C. Yang, J. R. Perez-Polo und Y. Birnbaum (2017) ‘SGLT-2 inhibition with Dapagliflozin reduces the activation of the Nlrp3/ASC inflammasome and attenuates the development of diabetic cardiomyopathy in mice with type 2 diabetes. Further augmentation of the effects with Saxagliptin, a DPP4 inhibitor’, *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 31(2), pp. 119–132.
- H. Zhang, L. Uthman, D. Bakker, S. Sari, S. Chen, M. W. Hollmann, R. Coronel, N. C. Weber, S. M. Houten, M. van Weeghel und C. J. Zuurbier (2020) ‘Empagliflozin decreases lactate generation in an NHE-1 dependent fashion and increases  $\alpha$ -ketoglutarate synthesis from palmitate in type II diabetic mouse hearts’, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7, p. 592233.
- W. Zhang, T. Kunczewicz, Z. Y. Yu, L. Zou, X. Xu und B. C. Kone (2003) ‘Protein-protein interactions involving inducible nitric oxide synthase’, *Acta Physiologica Scandinavica*, 179(2), pp. 137–142.
- W. Zhang (2005) ‘Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to

disease progression in Parkinson's disease', *The FASEB Journal*, 19(6), pp. 533–542.

Y. Zhang, H. He, B. Zhang, Q. Chen, S. Yao und P. Gui (2018) 'Amelioration of Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats by Na-H exchanger-1 inhibitor amiloride is associated with reversal of ERK mitogen-activated protein kinase', *BioMed Research International*, 2018, p. 3560234.

H. Zhou, S. Wang, P. Zhu, S. Hu, Y. Chen und J. Ren (2018) 'Empagliflozin rescues diabetic myocardial microvascular injury via AMPK-mediated inhibition of mitochondrial fission', *Redox Biology*, 15, pp. 335–346.

Q. Zhou, D. Guo, X. Li, Y. Wang, X. Ye, S. Xue und X. Wang (2020) 'Anti-inflammatory effects of vinpocetine in LPS-stimulated microglia via activation of AMPK', *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 92(4), p. e20200241.

B. Zinman, C. Wanner, J. M. Lachin, D. Fitchett, E. Bluhmki, S. Hantel, M. Mattheus, T. Devins, O. E. Johansen, H. J. Woerle, U. C. Broedl und S. E. Inzucchi (2015) 'Empagliflozin, cardiovascular outcomes and mortality in type 2 diabetes', *New England Journal of Medicine*, 373(22), pp. 2117–2128.

## 8. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und selbständig angefertigt habe, dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe und dass ich die Arbeit gemäß den Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt habe. Weiter erkläre ich, dass ich nicht mit demselben Thema zeitgleich an einer anderen Hochschule oder Fakultät die Zulassung zur Promotion beantragt habe oder werde, ich an keiner anderen Hochschule oder an keiner anderen Fakultät dieser Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe und dass mir noch kein akademischer Grad entzogen wurde.

Kiel, den 30.07.2021

Florian Lenz

## 9. Danksagung

Zunächst bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralph Lucius für die Bereitstellung des Promotionsplatzes und die Nutzung der Labor-Räumlichkeiten für die Versuche. Insbesondere war und bin ich dafür dankbar, dass während des gesamten Zeitraums kein Zeitdruck aufgebaut wurde und ich stets einen interessierten Ansprechpartner bei Rückfragen oder der Planung von Versuchen hatte.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Betreuerin Frau Dr. Uta Rickert für die hervorragende Betreuung, wodurch mir meine ersten Erfahrungen im wissenschaftlichen Arbeiten ermöglicht wurden. Auch bedanken möchte ich mich für die Hilfe bei allen Phasen dieser Arbeit, von der Durchführung der Experimente über Formalitäten und organisatorische Dinge bis hin zur zeitaufwändigen Korrekturtätigkeit. Auch warst du trotz deines Studiums immer erreichbar und hast mir mit aufmunternden Worten und konstruktiven Lösungsvorschlägen auch durch schwierige Phasen dieser Arbeit geholfen.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Clemens Franke für die Hilfe bei der Erstellung der Western-Blot-Abbildung dieser Arbeit.

Zuletzt bedanken möchte ich mich auch bei den zahlreichen anderen Mitarbeitern im Labor, insbesondere Gaby Steinkamp und Monika Grell, die mich mit sehr viel Geduld an die Arbeit im Labor herangeführt haben und ohne deren Hilfe ich sicher deutlich länger für die Experimente benötigt hätte. Es herrschte durchweg eine angenehme Atmosphäre im gesamten Labor und ich konnte mich bei Problemen mit den Experimenten immer an euch wenden.