

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
Klinik für Orthopädie & Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Rolle des Neuropeptids Calcitonin Gene-Related Peptide alpha  
in der molekularen Interaktion zwischen Gehirn, Fett- und  
Knochenstoffwechsel**

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Paul Christoph Köhli  
aus Braunschweig

Datum der Promotion: 03.12.2021

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Kurzzusammenfassung.....  | 3  |
| Abstract.....   | 4  |
| 1. Einleitung .....   | 5  |
| 1.1 Knochenmetabolismus und -heilung .....  | 5  |
| 1.2 Knochen in Interaktion mit dem zentralen Nervensystem und Fettstoffwechsel .....  | 8  |
| 1.3 Calcitonin gene-related peptide $\alpha$ .....  | 10 |
| 1.4 $\alpha$ -CGRP: Einfluss auf Fett- und Knochengewebe? .....   | 12 |
| 2. Methodik.....  | 15 |
| 2.1 In vivo Experimente .....   | 15 |
| 2.1.1 Pharmakologischer CGRP-Rezeptor-Antagonismus - Knochenmetabolismus und Energiestoffwechsel.....   | 15 |
| 2.2 In vitro Experimente.....   | 17 |
| 2.3 Statistik .....   | 18 |
| 3. Ergebnisse .....   | 18 |
| 3.1 Die CGRP-Rezeptorinhibition führt unter HFD zu geringen Alterationen der Parameter des Metabolischen Syndroms .....                         | 18 |
| 3.2 Die CGRP-Rezeptorinhibition führt zu einem osteopenen Knochenaspekt und geht mit einer Reduktion der Knochenformationsparameter einher..... | 20 |
| 4. Diskussion.....  | 22 |
| 4.1 Der Einfluss des CGRP-Rezeptorantagonismus auf den Metabolismus unter HFD ....  | 22 |
| 4.2 Der Einfluss des CGRP-Rezeptorantagonismus auf die Knochenhomöostase .....  | 23 |
| 4.3 Limitationen .....  | 26 |
| 5. Schlussfolgerungen und Ausblick .....  | 26 |
| 6. Referenzen.....  | 28 |
| 7. Eidesstattliche Versicherung.....  | 39 |
| 8. Ausführliche Anteilserklärung an den ausgewählten Publikationen im Rahmen der Promotionsverfahren zum Dr. med. ....                          | 40 |
| 9. Auszug aus der Journal Summary (ISI Web of Knowledge) - Publikation 1 .....  | 41 |
| 10. Druckexemplar der ausgewählten Publikation .....  | 43 |
| 11. Publikationsliste .....   | 57 |
| 12. Danksagung .....  | 59 |

## Kurzzusammenfassung

**Hintergrund:** Knochen- und Energiestoffwechsel beeinflussen einander endokrin und unterliegen beide dem Einfluss des zentralen Nervensystems (ZNS). Ein Mediator des ZNS, der die Pathophysiologie der Migräne beeinflusst, im Skelettsystem die Aktivität der knochenbildenden Osteoblasten stimuliert und sich auch nachhaltig auf den Energiestoffwechsel auswirkt, ist das von Nervenenden ausgeschüttete Neuropeptid Calcitonin gene-related peptide alpha ( $\alpha$ -CGRP). Der pharmakologische CGRP-Antagonismus wird zunehmend zur Migränetherapie und -prophylaxe klinisch eingesetzt, allerdings sind die Auswirkungen einer längerfristigen Anwendung auf Knochen- und Energiestoffwechsel unklar. Darüber hinaus fehlen bisher mechanistische Studien darüber, inwiefern  $\alpha$ -CGRP die Knochenheilung reguliert. In einem murinen Modell der nahrungsinduzierten Adipositas sollen daher im Rahmen der Arbeit die Folgen einer längerfristigen CGRP-Rezeptorinhibition auf die Entwicklung relevanter Parameter des Metabolischen Syndroms und des Knochenstoffwechsels analysiert werden.

**Methodik:** Pellets mit dem CGRP-Rezeptorinhibitor Olcegepant oder Kontrollpellets wurden randomisiert 20 weiblichen, 12 Wochen alten Mäusen nach acht Wochen Diät mit hohem Fettanteil (HFD) subkutan implantiert. Die HFD wurde hiernach acht Wochen fortgeführt. Es erfolgten wöchentliche Gewichtskontrollen und orale Glukosetoleranztests (oGTT) nach vier und acht Wochen CGRP-Rezeptorinhibition. Anschließend erfolgte die Probenasservation von Knochen, Serum und immunologisch und metabolisch aktiven Geweben mit anschließender laborchemischer, histomorphometrischer sowie molekularbiologischer Analyse.

**Ergebnisse:** Die längerfristige, pharmakologische CGRP-Rezeptorinhibition unter HFD führte, abgesehen von einer erhöhten Genexpression pro-inflammatorischer Mediatoren in der Leber und einer tendenziell verbesserten oralen Glukosetoleranz nach acht Wochen, zu keinen signifikanten Veränderungen der adressierten metabolischen Parameter im Vergleich zur Kontrolle. Femoral und lumbal zeigte sich nach der Behandlung mit Olcegepant histomorphometrisch und laborchemisch ein osteopener Knochenaspekt mit reduzierten Knochenformationsparametern bei unveränderten Knochenresorptionsparametern.

**Diskussion:** Die pharmakologische CGRP-Rezeptorinhibition führte im o.g. Modell zu einer Reduktion der Knochenqualität einhergehend mit einer Reduktion der Knochenformationsparameter. In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe im murinen Femurosteotomiemodell im  $\alpha$ -Cgrp-Defizienzmodell zeigte eine signifikant verschlechterte Knochenheilung mit hohem Pseudarthrosenanteil im Vergleich zum Wildtyp. Da die CGRP-Rezeptorinhibition klinisch zunehmend zur Migränetherapie angewandt wird, sollten folgende Studien die Knochengesundheit und Knochenheilung unter dieser Therapie adressieren.  $\alpha$ -CGRP und sein Rezeptor stellen potentielle Zielstrukturen für osteoanabole Therapien zur Augmentation der Knochenheilung dar.

## Abstract

**Background:** Bone and energy metabolism have an endocrine influence on each other and are both influenced by the central nervous system (CNS). A CNS mediator that influences both migraine pathophysiology and bone and energy metabolism is the neuropeptide calcitonin gene-related peptide  $\alpha$  ( $\alpha$ -CGRP). Pharmacological CGRP-antagonism is increasingly used clinically for migraine therapy and prophylaxis, however, the effects of longer-term use on bone and energy metabolism remain unclear. Furthermore, there is a lack of mechanistic studies on the role of osteoanabolic  $\alpha$ -CGRP in bone healing. Therefore, in a murine model of food-induced obesity, this study will analyze the consequences of long-term CGRP receptor inhibition on the development of relevant parameters of the metabolic syndrome and bone metabolism.

**Methods:** Subcutaneous pellets containing the CGRP-receptor inhibitor olcegepant or vehicle were randomly implanted into 20 female, 12-week-old mice after eight weeks of high fat diet (HFD). HFD was continued for eight weeks thereafter. Weekly weighing and oral glucose tolerance tests (oGTT) were performed after four and eight weeks of CGRP receptor inhibition. Samples of bone, serum, immunologically and metabolically active tissues were collected after the end of the trial for laboratory, chemical, histomorphometric and molecular biological analyses.

**Results:** Long-term pharmacological CGRP receptor inhibition under HFD did not result in significant changes in addressed metabolic parameters compared to control, apart from increased gene expression of pro-inflammatory mediators in the liver and a trend towards improved oral glucose tolerance after eight weeks. Femoral and lumbar bone histomorphometry showed an osteopenic bone aspect with reduced bone formation parameters in bone histomorphometry as well as in serum with unchanged bone resorption parameters.

**Discussion:** Pharmacological CGRP receptor inhibition resulted in a reduction of bone quality accompanied by a reduction of bone formation parameters in the above-mentioned model. Furthermore, our group investigated the role of CGRP in bone healing using a femoral osteotomy model in the murine  $\alpha$ -CGRP knockout. The  $\alpha$ -CGRP knockout model showed significantly worsened bone healing with a high proportion of pseudarthrosis compared to the wild-type. As CGRP receptor inhibition is increasingly used clinically for migraine therapy, subsequent studies should address bone health and bone healing under this therapy. CGRP and its receptor represent potential targets for osteoanabolic therapies in bone healing.

Die hier dargestellten Forschungsarbeiten beinhalten Ergebnisse der eingereichten Publikation [1].

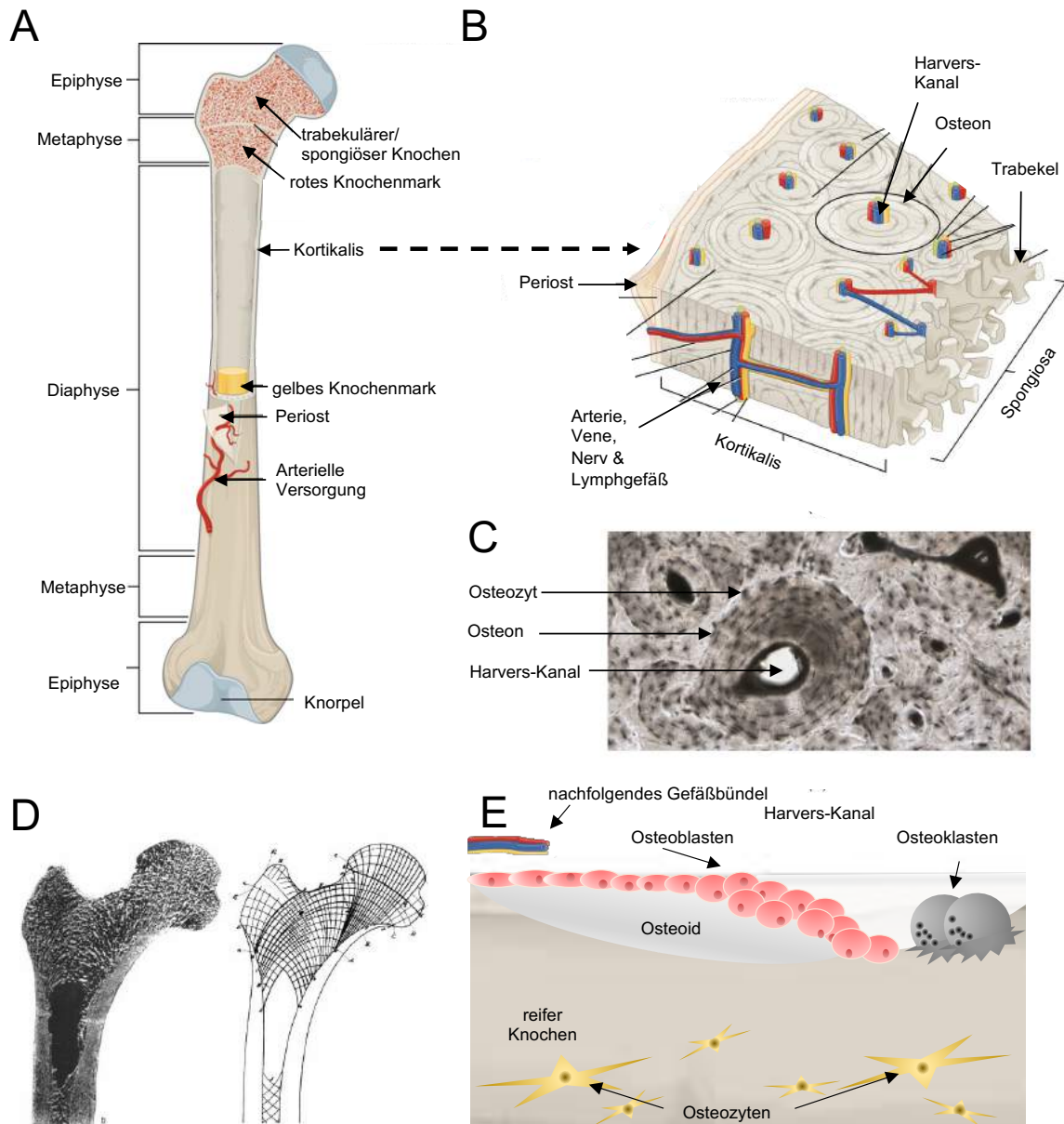
## 1. Einleitung

### 1.1 Knochenmetabolismus und -heilung

Knochen ist ein ausdauerndes, stabiles und anpassungsfähiges Gewebe, das als stützender Teil des muskuloskeletalen Systems für aufrechte Haltung, Fortbewegung, physische Interaktion mit der Umwelt und den Schutz innerer Organe essentiell ist (**Abb. 1 A – C**). Als eines der wenigen Gewebe besitzt es die Fähigkeit zur narbenfreien Heilung [2]. Zur Erhaltung und Anpassung seiner mechanischen Integrität ist es einem kontinuierlichen Umbauprozess aus Aufbau, Knochenformation und Abbau, der Knochenresorption, unterworfen. Dieser energieaufwändige Prozess ist physiologisch eng reguliert, zum einen durch lokale Faktoren und zum anderen durch systemische Einflüsse. Das Knochenremodeling ist ein dynamischer Vorgang, in dem Osteoblasten Knochen bilden, Osteoklasten diesen Knochen wieder abbauen und Osteozyten die mechanische Belastung des Knochens integrieren. Dementsprechend orchestrieren die Osteozyten die Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten und somit die Kopplung des Knochenaufbaus an den Knochenabbau [3]. Die Kopplung des Knochenstoffwechsels an die mechanische Belastung demonstriert eindrücklich die dynamische Adaptation des Knochens, z.B. unter körperlichem Training bei Läufern [4] oder auch bei Gladiatoren im antiken Römischen Reich [5] mit belastungsabhängigem Knochenaufbau. Der Knochenabbau unter reduzierter Belastung, z.B. unter Schwerelosigkeit [6], [7] oder bei Patientinnen und Patienten mit Bettruhe [8] unterstreicht dies weiter. Auf mikrostruktureller Ebene lässt sich die Ausrichtung der Fachwerkstruktur des Knochens (Trabekelstruktur) entlang der Wolff'schen Belastungslinien als Folge dieser Mechanismen beobachten (**Abb. 1 D**) [9]–[12].

Osteoblasten differenzieren aus mesenchymalen Vorläuferzellen unter dem Einfluss der Transkriptionsfaktoren Runx-Related Transcription Factor 2 (RUNX2) und Osterix (OSX). Die Knochenformation beginnt mit der osteoblastären Sekretion von Matrixproteinen und Peptiden wie Kollagen Typ-1 alpha, alkalischer Phosphatase und Osteocalcin, die das sogenannte Osteoid bilden. Später erfolgt die Mineralisation des Osteoids durch Einlagerung von Calciumphosphat unter der Bildung von Hydroxylapatit (HA). Nach Bildung dieser hochstabilen Matrix differenzieren die älteren Osteoblasten zu Osteozyten, die ein Netzwerk innerhalb des Knochens bilden. Hierrüber detektieren sie die mechanische Belastung/elastischen Verformung des Knochens und sorgen in höher belasteten Abschnitten für ein Überwiegen der Knochenformation und in weniger belasteten Abschnitten für ein Überwiegen der Knochenresorption (**Abb. 1 E**).

Die knochenresorbierenden Osteoklasten bilden sich unter der Stimulation von Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) und Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL, von Osteoblasten exprimiert) aus lymphozytären Vorläuferzellen durch Differenzierung zu Fresszellen und Fusion dieser zu spezialisierten, multinukleären Riesenfresszellen. Unter Bildung einer abgekapselten „Lakune“ mit niedrigem pH-Wert(?) und Sekretion proteolytischer Enzyme erfolgt die Resorption des Knochens und Freisetzung von Calcium und untercarboxyliertem Osteocalcin (ucOCN), sowie Abbauprodukten des Kollagens („Crosslaps“).



**Abbildung 1: schematische Übersicht über den Aufbau eines Knochens und des Knochenumbaus.** A) Röhrenknochen werden anatomisch in die Epiphyse, Metaphyse und Diaphyse eingeteilt. Die Epiphyse und Diaphyse sind reich an spongiösem/ trabekulärem Knochen, dieser stellt die Nische für das Knochenmark. Die Diaphyse zeichnet sich durch eine i.d.R. dickere Korkkalis und weniger trabekulären Knochen aus. Der Knochen ist außen von der Knochenhaut, dem stark innervierten Periost umgeben. B) Knochen wird von Harvers-Kanälen durchzogen, diese bilden sich durch das Knochenremodeling. Ein Harverskanal mit den ringförmig umgebenden Knochenlamellen wird als Osteon bezeichnet. C) Mikroskopische Aufnahme (40x-Vergrößerung) eines Osteons mit deutlich sichtbaren konzentrischen Knochenlamellen und zentralem Harvers-Kanal. (Abbildungen A, B, C modifiziert nach [13]). D) Die trabekuläre Struktur des Knochens folgt der mechanischen Beanspruchung (Wolff'sche Gesetze) Abbildung modifiziert nach [9], [12]. E) Knochenremodeling: die Osteoklasten resorbieren reifen Knochen, den sich bildenden Kanal füllen Osteoblasten mit Osteoid auf, das im weiteren Verlauf zum reifen Knochen aushärtet. In diesen neuen Harvers-Kanal sprosst den Osteoklasten folgend die Gefäßversorgung ein (Abbildung modifiziert nach [14]).

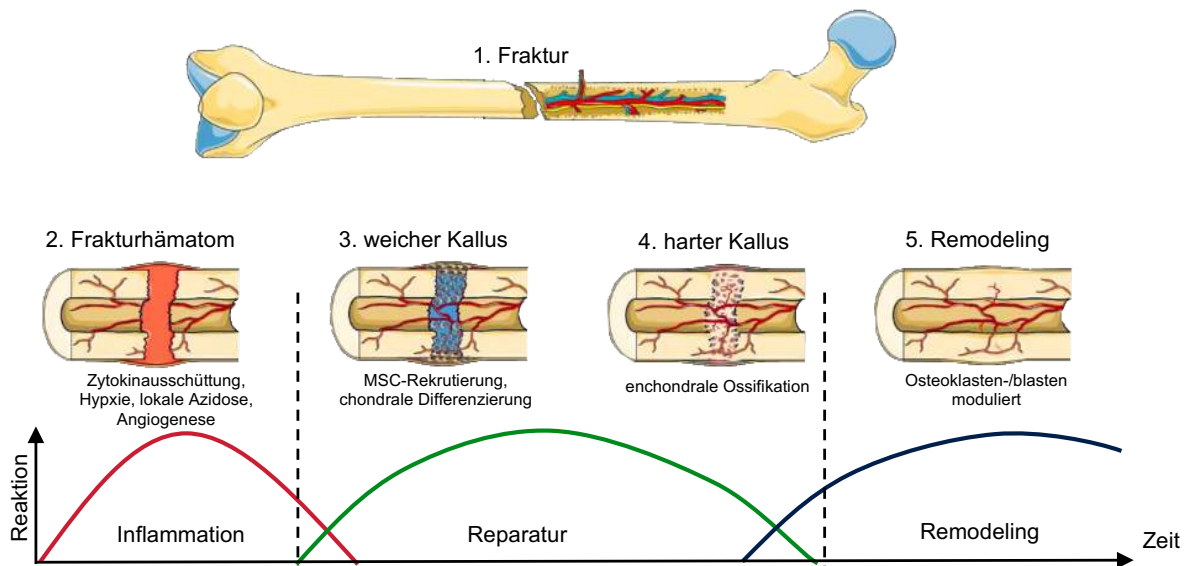
Störungen des eng regulierten Gleichgewichts des Knochenremodelings führen zu metabolischen Knochenkrankungen wie z.B. der Osteoporose, einer Erkrankung mit reduzierter Knochenqualität. Der Verlust der Knochenqualität bei Osteoporose führt zu einem stark erhöhten Frakturrisiko, auch bei niedrigerenergetischen Unfällen wie beispielsweise einem

Stolpersturz und somit zu einem hohen Leidensdruck der betroffenen Patientinnen und Patienten. In Deutschland leiden rund 14% der Allgemeinbevölkerung an Osteoporose und zeigen innerhalb von 3 Jahren ein Frakturrisiko von 52% [15]. Nach osteoporotischer, proximaler Femurfraktur zeigt dieses Kollektiv eine Ein-Jahres-Mortalität von 27% [16]. Die genaue Kenntnis der Regulationsmechanismen des Knochenstoffwechsels ist daher von hoher klinischer und sozioökonomischer Relevanz [17], um Risikofaktoren und mögliche Therapieansätze der Osteoporose zu identifizieren.

Nach Fraktur ist die Knochenheilung ein essentieller Vorgang zur Aufrechterhaltung der skelettalen Funktion und somit Mobilität und Gesundheit nach ossären Verletzungen. Durch absolute anatomische Reposition und Kompression unter Wiederherstellung der Kontinuität der Harvers'schen Kanäle nach Osteosynthese kann eine primäre Knochenheilung ohne Ausbildung eines äußeren Kallus erreicht werden. Bei zu überbrückender Defektstrecke kommt es zur sekundären Knochenheilung unter Ausbildung eines Kallus im Rahmen einer enchondralen Knochenheilung (**Abb. 2**). Die Knochenheilung unterliegt verschiedenen endokrinen, metabolisch-nutritiven, immunologischen, mechanischen, neuronalen und lokalen Einflussfaktoren, die essentiell für eine adäquate Regeneration sind [2], [18]–[20].

Trotz der stetigen Weiterentwicklung der chirurgischen und konservativen Therapieoptionen von Knochenbrüchen ist die gestörte Knochenheilung bis hin zur Pseudarthrose immer noch eine klinische Herausforderung, da die vorhandenen Therapieoptionen limitiert sind oder sich nicht in der klinischen Routine bewähren konnten [21]. Bei Knochenbrüchen der Extremitäten liegt in Deutschland je nach Altersgruppe die Inzidenz zwischen 16 und 32 Frakturen auf 1000 Einwohnerinnen und Einwohner pro Jahr [22]. In bis zu 10% aller Frakturfälle entstehen trotz adäquater Versorgung Pseudarthrosen, welche oft mit persistierendem Schmerz und Immobilität einhergehen und die Lebensqualität der betroffenen Patientinnen und Patienten relevant reduzieren [23]. Die oft folgende langfristige Erwerbsunfähigkeit, Behinderung und Behandlungsnotwendigkeit führt zu starken sozioökonomischen Folgen [24]. Einer der bekannten relevanten Risikofaktoren einer ausbleibenden Knochenheilung ist neben Infektionen das Metabolische Syndrom, insbesondere bei schlecht eingestelltem Diabetes mellitus Typ 2 [18], [25]–[27].

Die Erforschung der molekularen Mechanismen und systemischen Einflussfaktoren auf die Knochenheilung könnte einerseits zur Etablierung von bisher unbekanntem Risikofaktoren zur frühzeitigen Erkennung einer Pseudarthrose-Entwicklung führen. Andererseits ist sie essentiell zur Identifizierung möglicher therapeutischer Zielstrukturen zur Modulation der Knochenheilung und ist somit direkt klinisch relevant.



**Abbildung 2: Phasen der enchondralen Knochenheilung.** Die Frakturheilung kann in sich überschneidende Phasen unterteilt werden: Bruch; Hämatom; weicher, knorpeliger Kallus; harter Kallus und Remodeling. Durch Veränderungen des lokalen Milieus (saurer pH, Hypoxie) sowie Freisetzung von DAMPS und Zytokinen wird die inflammatorische Phase durch die Zell- und Gewebsschädigung sowie das Frakturhämatom ausgelöst. Die Reparaturphase beginnt nach Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen mit intramembranösem Knochen am Periost in einiger Entfernung von der Fraktur, der die Kallusbildung antreibt. Das Kalluswachstum schreitet in Richtung der Fraktur fort. Die hypoxischen Bedingungen erlauben nur die Proliferation von Chondrozyten und die enchondrale Ossifikation. Blutgefäße dringen in den knorpeligen Kallus ein, osteoklastenartige Zellen resorbieren den verkalkten Knorpel und Osteoblasten bauen neuen Knochen auf. Nach der knöchernen Überbrückung der Fraktur nimmt durch die Umbauvorgänge im Rahmen des Remodeling der Kallusdurchmesser und die Knochenstruktur passt sich der Belastungssituation an (Abbildung modifiziert nach [26], [28]).

## 1.2 Knochen in Interaktion mit dem zentralen Nervensystem und Fettstoffwechsel

Als energieaufwändiger Prozess wird der Knochenumbau durch das zentrale Nervensystem und den Energiestoffwechsel, insbesondere durch das Fettgewebe, gesteuert und beeinflusst [29]. In den letzten zwei Dekaden offenbarten intensive, internationale Forschungsbemühungen diverse humorale, immunologische, neuronale und metabolische Einflussfaktoren auf das Knochenremodeling [26], [30]–[36]. Diese können direkt vom Effektororgan auf den Knochen oder indirekt über sekundäre Effekte, welche dann den Knochen beeinflussen, wirken (**Abb. 3A**). Darüber hinaus wirkt Knochen als endokrines Organ auf den Energiestoffwechsel, die männliche Fertilität, den Calciumhaushalt und das zentrale Nervensystem ein [30], [37], [38].

Im Gesamtorganismus ist Knochen das Hauptreservoir für Calcium. Der Knochenumbau ist daher eng an den Calciumserumspiegel gekoppelt und wird über die Nebenschilddrüse (Parathormon, Calcitonin), die Niere (aktiviertes Vitamin D3, Calciumresorption aus dem Restharn) und den Darm (Calciumresorption aus dem Darmlumen) endokrin reguliert. Der Knochen selber wird hierbei als endokrines Organ aktiv und sezerniert Fibroblast-growth-factor 23 (FGF-23) als Rückkopplungsmechanismus bei erhöhter Knochenresorption [36].

Im Rahmen der postprandialen Hyperglykämie kommt es unter physiologischen Bedingungen zu einer direkten Stimulation der Knochenformation und Inhibition der Knochenresorption über die gesteigerte Sekretion von Insulin, glukoseabhängigem

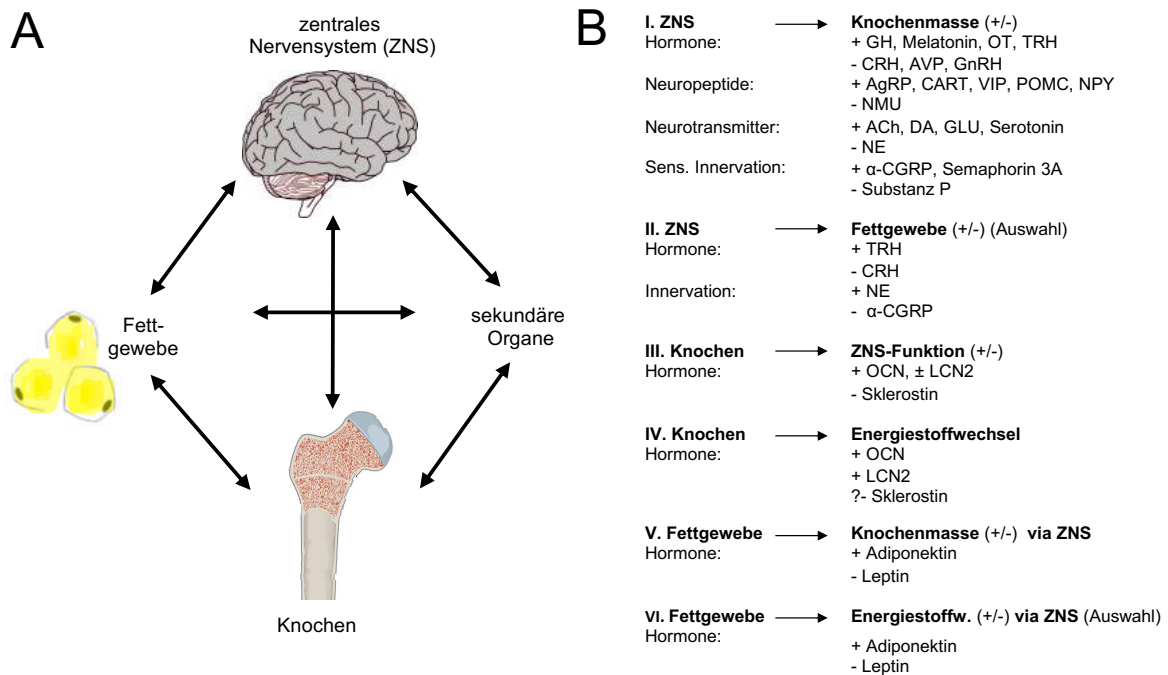


insulintropen Peptid (GIP), Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) und Glucagon-like Peptide 2 (GLP-2) und deren osteoanabolen Effekt. Bei zunehmender Adipozytengröße im Rahmen der Energiespeicherung in den Adipozyten durch Triacylglycerideinlagerung, steigt die Ausschüttung des Adipokins Leptin aus den Adipozyten. Dieses bewirkt im Hypothalamus unter physiologischen Bedingungen durch seine Bindung an anorexinerge Neurone, die Proopiomelanocortin- (POMC-)/ Cocaine- and amphetamineregulated Transcript (CART)-Neurone, einen sättigenden Effekt und eine reduzierte Nahrungsaufnahme [39]. Über die konsekutive Beeinflussung des sympathischen Nervensystems (SNS) erfolgt die Regulation des Knochenstoffwechsels sowie die Steigerung der Lipolyse in den Adipozyten [29], [40]. Das Adiponektin, dessen multiple Isoformen bei geringem Sättigungszustand der Adipozyten sezerniert werden, wirkt im Hypothalamus über mehrere Mechanismen, unter anderem über die Inhibition der POMC-/CART-Neurone, was auf das Hungergefühl und die Nahrungsaufnahme steigernd wirkt. Über die konsekutive Aktivitätsminderung des SNS sowie über direkte Effekte des Adiponektins wird die osteoanabole Wirkung vermittelt [41], [42]. Neben dem SNS ist das Neuropeptid Calcitonin gene-related peptide  $\alpha$  ( $\alpha$ -CGRP) ein essentieller Effektor des ZNS auf das Fettgewebe [43] (**Abb. 3B**; Abschnitt 1.4)

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Knochen über Osteocalcin direkt den Energiestoffwechsel, die zentrale Hungerregulation, die männliche Fertilität und die ZNS-Entwicklung beeinflusst [30], [44], [45]. Osteocalcin wird von Osteoblasten sezerniert und in der extrazellulären Knochenmatrix eingebaut, aus der es im Rahmen der Knochenresorption in den Resorptionslakunen der Osteoklasten freigesetzt und aktiviert wird. Es steigert die systemische Insulinsensitivität, die Insulinausschüttung aus den beta-Inselzellen des Pankreas, reguliert die männliche Fertilität in den Leydig-Zellen und beeinflusst die ZNS-Entwicklung [46]. Lipocalin-2 wird in einer Reihe von Geweben exprimiert, jedoch zehnfach stärker im Knochengewebe, wo es von Osteoblasten sezerniert wird. Zentral hemmt es über den Melanocortin-Rezeptor-4 das Hungergefühl und stimuliert die Insulinausschüttung [47]. Für Sklerostin, ein von Osteozyten sezernierter Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalings, wird eine endokrine, adipogene Wirkung aktuell erforscht [48].

Die zentrale Regulation des Knochenstoffwechsels erfolgt zum einen durch die hypothalamische Steuerung der Adeno- und Neurohypophyse. Diese beeinflussen den Knochenstoffwechsel direkt und über die Kontrolle der endokrinen Regulationsachsen auch indirekt. Zum anderen erfolgt eine direkte neuronale Interaktion über die zentrale Kontrolle der autonomen und nozizeptiven Innervation des Knochens (**Abb. 3B**) [49]. Knochen, speziell das Periost, sind stark innerviert, sodass die Freisetzung von nozizeptiven Peptiden und Neurotransmittern direkten Einfluss auf den Knochenmetabolismus und die Knochenheilung nehmen kann. Die Erkenntnisse zur neuro-osteogenen Interaktion sind aktuell unter stetiger Entwicklung. Als relevante Mediatoren konnten das sympathische Nervensystem, was über Noradrenalin (NA) einen inhibitorischen Effekt auf reifen Knochen ausübt, sowie Neuropeptide wie  $\alpha$ -CGRP identifiziert werden, für welches osteoanabole Effekte beschrieben wurden [49]–[51].

Der direkte, neurale Einfluss des ZNS auf das Fettgewebe wird ebenso über die Noradrenalinfreisetzung am Adipozyten durch das SNS mit konsekutiver Aktivierung der Lipolyse und Thermogenese vermittelt [42], [52]. Ebenso wird über die Thyreoliberin/TSH/Thyroxin-Achse die Lipolyse und Thermogenese aktiviert. Nach aktuellen Erkenntnissen wird eine gewisse Rolle von  $\alpha$ -CGRP in der neuralen Kontrolle des Fettgewebes und des Energiestoffwechsels postuliert (Abschnitt 1.4).



**Abbildung 3: Mögliche Interaktionswege zwischen Gehirn, Fett- und Knochenstoffwechsel.**

A) Das ZNS kann den Knochen direkt oder indirekt über seinen Effekt auf sekundäre Organe und Gewebe wie das Fettgewebe regulieren. Knochen selbst kann ebenfalls direkt (oder indirekt auf das ZNS einwirken, ebenso das Fettgewebe, weiter sind diverse Mediatoren bekannt, die sowohl das ZNS als auch den Knochen beeinflussen. B) I. das ZNS steuert den Knochenstoffwechsel zum einen über seine Regulation hormoneller Einflüsse, das Verhalten und über direkte nervale Einflusswege. „+“ positiver/ anaboler Einfluss; „-“ negativer/ kataboler/ inhibierender Einfluss. Abkürzungen: ACh = Acetylcholin, AgRP = agouti-related peptide, AVP = Arginin-Vasopressin, CART = Cocaine amphetamine regulated transcript,  $\alpha$ -CGRP = Calcitonin gene-related peptide  $\alpha$ , CRH = Corticoliberin; DA = Dopamin, GnRH = Gonadoliberin, GH = Wachstumshormon, GLU = Glutamat, LCN2 = Lipocalin 2, NE = Noradrenalin, NMU = Neuromedin U, NPY = Neuropeptid Y, OCN = Osteocalcin, OT = Oxytocin, POMC = Proopiomelanocortin, TRH = Thyreoliberin, VIP = vasoaktives intestinales Peptid. Abbildung modifiziert nach [49].

Knochen- und Energiestoffwechsel beeinflussen sich somit nicht nur gegenseitig, sondern nehmen auch Einfluss auf zentrale Regulationsmechanismen. Beide unterstehen einer Kontrolle durch das ZNS, zum einen über die Kontrolle des Verhaltens, einschließlich Essverhalten, Belastung und Bewegung, zum anderen über endokrine und direkt nervale Regulationsmechanismen. Unter den direkten Regulationsmechanismen ist das Neuropeptid  $\alpha$ -CGRP ein möglicher, gemeinsamer Mediator des ZNS mit Einfluss auf den Knochen- und Energiestoffwechsel.

### 1.3 Calcitonin gene-related peptide $\alpha$

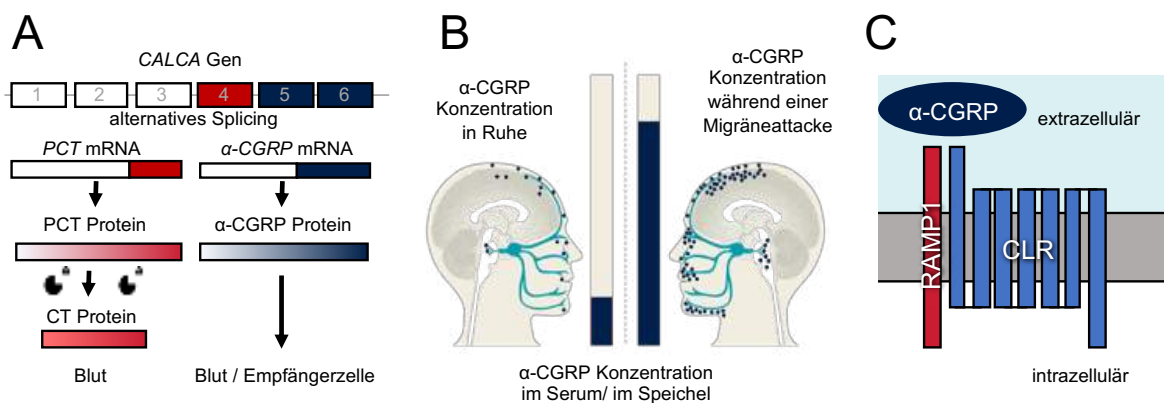
Intensive Forschungsbemühungen zur Pathogenese der Migräne führten zur Entdeckung der Rolle des Neuropeptides  $\alpha$ -CGRP als essentiellen Mediator der Migräneentstehung und Schmerzwahrnehmung [53], [54], was letztendlich zur Entwicklung von spezifischen CGRP-Rezeptor- und CGRP-Antagonisten führte.

Im Menschen und auch im Modellorganismus der Maus ist  $\alpha$ -CGRP ein 37 Aminosäuren langes Neuropeptid, das durch alternatives Splicing der mRNA des *CALCA* Gens entsteht. *CALCA* kodiert für Procalcitonin (das in den C-Zellen der Nebenschilddrüse zu Calcitonin proteolytisch wird) und  $\alpha$ -CGRP, was vor allem in nozizeptiven Nervenfasern des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert wird (**Abb. 4A**). Das Schwester-Peptid  $\beta$ -CGRP

wird auf dem *CALCB* Gen kodiert, ist zu über 90% homolog und wird v.a. im enterischen Nervensystem exprimiert [55], [56]. In der Literatur werden meist beide Peptide unter „CGRP“ subsummiert oder jedoch vereinzelt auch  $\alpha$ -CGRP gemeint. Im Folgenden werden mit „CGRP“ beide Peptide bezeichnet, sowie mit „ $\alpha$ -CGRP“ dieses spezifisch.

$\alpha$ -CGRP wird in der akuten Migräneattacke v.a. vom N. trigeminus freigesetzt, was erstmalig in den 1980ern [57] beobachtet wurde. Weitere Studien untermauerten diese Beobachtungen und zeigten, dass eine trigeminale Stimulation die  $\alpha$ -CGRP-Werte im kranialen Kreislauf erhöht [58], [59] und dass eine Injektion von  $\alpha$ -CGRP die Symptome der Migräne hervorrufen kann [60] (**Abb. 4B**). Die für die Migräne relevanten CGRP-Rezeptorexpression findet sich in den Gefäßen des ZNS, den Arterien der Dura, im trigemino-vaskulären System sowie in den zentralen schmerzleitenden Strukturen [61].

$\alpha$ -CGRP bindet an seinen Rezeptor, den Calcitonin receptor-like Rezeptor (CLR)/Rezeptoraktivitätsmodifizierendes Protein 1 (RAMP1)-Komplex, einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (**Abb. 4C**), der eine hervorragende Zielstruktur für Medikamente darstellt [62]. Die Ligandenaffinität des CLR wird durch die Bildung eines Komplexes mit RAMP1 bestimmt, wobei  $\alpha$ -CGRP gegenüber anderen Mitgliedern der Calcitonin-Peptid-Familie, einschließlich Amylin, Calcitonin und Adrenomedullin, bevorzugt wird [63].



**Abbildung 4: Calcitonin gene-related peptide  $\alpha$  ( $\alpha$ -CGRP), ein zentraler Mediator in der Pathophysiologie der Migräne.** A)  $\alpha$ -CGRP entsteht durch alternatives Splicing des *CALCA*-Genes. Dieses kodiert für *PCT* und  $\alpha$ -CGRP. Aus *PCT* wird CT durch Proteolyse in den C-Zellen der Nebenschilddrüse [64]. B)  $\alpha$ -CGRP ist klinisch vor allem für seine Rolle in der Pathophysiologie der Migräne bekannt. C)  $\alpha$ -CGRP bindet an den CGRP-Rezeptor, einen GPCR bestehend aus dem Calcitonin-receptor-like receptor (CLR) und RAMP1 der intrazellulär über die gekoppelten G-Proteine unter anderem die intrazellulären Inositol-3-Phosphat (IP3) und cAMP-Konzentrationen als second Messenger steuert (Abbildungen modifiziert nach [64]–[66]).

Der CGRP-Rezeptor wird in einem breiten Spektrum verschiedener Gewebe exprimiert [66]–[68]. Dazu gehören z.B. Gefäße-, Herz-, Nieren-, Magen-Darm-, Immun- Knochen-, Fett und Hautgewebe, in denen experimentelle Studien eine signifikante Rolle von  $\alpha$ -CGRP und seinem Rezeptor u.a. bei der Regulierung der Zelldifferenzierung und -funktion, insbesondere beim kardialen Remodeling, bei der Blutdruckkontrolle, der Knochenformation und auch bei der Wundheilung zeigten (**Abb. 6**) [66].

Die hierauf aufbauenden mechanistischen Studien zur Rolle von  $\alpha$ -CGRP und seinem Rezeptor, dem CLR/ RAMP-1 Komplex, führte zu einer raschen Entwicklung von „small-molecule“ CGRP-Rezeptorinhibitoren, den so genannten „-gepanten“. Die ersten klinischen Anwendungen erfolgten mit dem small-molecule CGRP-Rezeptorantagonist Olcegepant (BIBN 4096) [69]. Rasch folgte die Entwicklung weiterer Wirkstoffe wie Telcegepant und Ubrogapant sowie den Anti-CGRP-Rezeptor- und Anti-CGRP-Antikörpern wie z.B. Erenumab,

Galcanezumab und Fremanezumab als neue Therapeutika [70]. Diese Substanzen inhibieren zumeist sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -CGRP. Die Food and Drug Administration (FDA, US-amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde) hat mittlerweile den small-molecule CGRP-Rezeptorinhibitor Ubrogepant sowie die monoklonalen Antikörper Erenumab, Galcanezumab und Fremanezumab zugelassen [71]–[73]. In Deutschland beträgt die 1-Jahres-Prävalenz der Migräne zwischen 10-15%, überwiegend sind Menschen im Alter zwischen 20 und 50 Jahren betroffen [74] [75]. 2019 hat die Substanzklasse der CGRP-Inhibitoren erstmalig in die deutsche S-1 Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Migräne Einzug gehalten und findet nun zunehmend klinische Anwendung zur Therapie eines akuten Anfalls. Langfristig wird sie zur Prophylaxe von Migräne-Attacken angewendet, wenn die bisherigen Therapieoptionen ausgereizt sind [61]. Daher wird die Anzahl an Patientinnen und Patienten unter langfristiger, pharmakologischer CGRP-Rezeptor-/ CGRP-Inhibition zügig ansteigen.

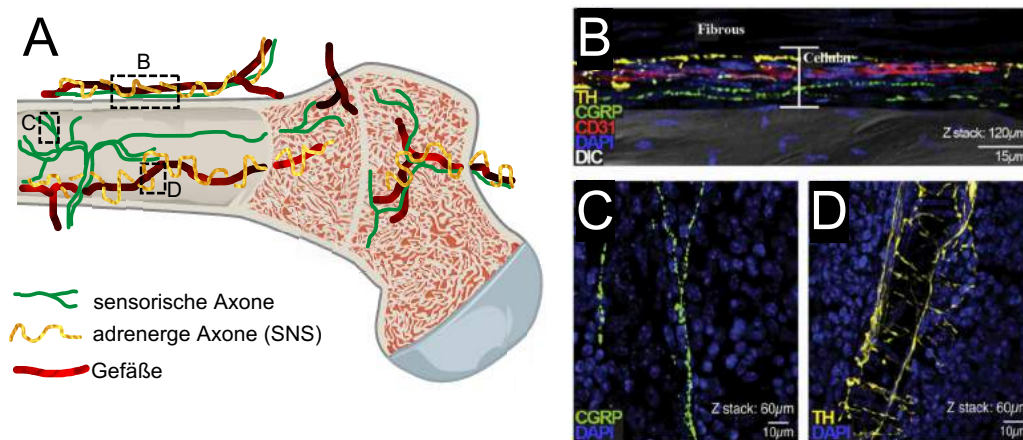
#### 1.4 $\alpha$ -CGRP: Einfluss auf Fett- und Knochengewebe?

Die Rolle des Neuropeptids  $\alpha$ -CGRP in der Interaktion des ZNS mit dem Energiestoffwechsel und Knochenmetabolismus wird zunehmend erforscht. Insbesondere zur Interaktion mit dem Fettgewebe im Rahmen des Metabolischen Syndroms sowie dem Einfluss auf die Knochengesundheit und -heilung zeigten sich in bisherigen präklinischen Arbeiten und klinischen Assoziationsstudien Hinweise auf eine relevante Rolle von  $\alpha$ -CGRP.

Energiestoffwechsel: Das Metabolische Syndrom ist eine Systemerkrankung, die durch Insulinresistenz, Dyslipidämie, abdominale Fettleibigkeit und eine chronische, niedriggradige Entzündungsaktivität gekennzeichnet ist. Das Metabolische Syndrom ist eng mit der Adipositas vergesellschaftet, ätiologisch multifaktoriell und mit einer Dysbalance aus Energiezufuhr, -umsatz und -speicherung einhergehend [76], [77]. Klinische Studien konnten eine Assoziation zwischen Adipositas und erhöhten Serum-CGRP-Konzentrationen beobachten [78] sowie zwischen den Parametern des Metabolischen Syndroms bei Patientinnen mit dem polyzystischem Ovarsyndrom (PCOS) [79]. Hierauf aufbauende präklinische Studien unserer Arbeitsgruppe an  $\alpha$ -CGRP-defizienten Mäusen unter fettreicher Ernährung (HFD) und resultierender ernährungsinduzierter Adipositas (DIO) zeigten eine Reduktion der Gewichtszunahme und signifikant verbesserte orale Glucosetoleranz im Vergleich zum Wildtyp (WT) [80]. Es konnte ein Einfluss von  $\alpha$ -CGRP auf die zentrale Hungerregulation sowie die Inhibition des *browning* und *energy wasting* des braunen und beigen Fettgewebes nachwiesen werden [81]. Hierbei wird die Energieverbrennung durch Entkoppelung der Atmungskette in den Mitochondrien durch  $\alpha$ -CGRP gehemmt, mit einer nachfolgenden Reduktion des Energieumsatzes [81]. Weiter zeigten sich inhibitorische Effekte auf die Insulin-Sekretion aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas sowie die Stimulation der Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) Sekretion im Darm und ein proinflammatorischer Einfluss auf die niedriggradige Entzündung des Fettgewebes in der Adipositas [66], [82]–[85]. Dennoch ist die genaue Rolle von  $\alpha$ -CGRP in der Pathogenese der Adipositas weiterhin unklar und Daten zur Rolle der pharmakologischen CGRP-Inhibition in der Adipositas und im Metabolischen Syndrom fehlen bisher [43].

Knochenstoffwechsel: Im Knochenumbau erfüllt  $\alpha$ -CGRP eine relevante osteoanabole Funktion. Das Periost ist von  $\alpha$ -CGRP positiven Nervenfasern innerviert (**Abb. 5 A, B**) [86], [87] und das murine  $\alpha$ -CGRP-Defizienzmodell zeigt eine Osteopenie durch eine reduzierte Knochenformation [88], wohingegen  $\beta$ -CGRP keine Rolle im physiologischen Knochenstoffwechsel zu spielen scheint [89]. Weitere Arbeiten konnten die osteoanabole Wirkung von  $\alpha$ -CGRP und eine Stimulation der Osteoblastogenese durch  $\alpha$ -CGRP *in vitro*

untermauern [90]–[94], sowie zeigen, dass die osteoanabole Wirkung von Magnesiumimplantaten über  $\alpha$ -CGRP vermittelt wird [95]. Im Kontext der Knochenheilung wurde im Rahmen der überschießenden Knochenheilung nach Schädel-Hirn-Trauma erhöhte Serumkonzentrationen von  $\alpha$ -CGRP beschrieben [96]. Eine verschlechterte Knochenheilung zeigt sich nach selektiver Denervierung sensorischer Leitungsbahnen bei Ratten [97] und somit auch lokaler Depletion nozizeptiver Peptide wie  $\alpha$ -CGRP an der Fraktur. Spezifische Untersuchungen zur Rolle von  $\alpha$ -CGRP in der Knochenheilung sowie der Auswirkungen pharmakologischer CGRP-Rezeptor-/CGRP-Inhibitoren auf den Knochenstoffwechsel fehlten jedoch bisher. Die Klärung dieser Auswirkungen ist vor dem Hintergrund der zunehmenden klinischen Anwendung von CGRP-Rezeptor- und CGRP-Inhibitoren in der klinischen Routine zur Migräneprophylaxe von hoher Relevanz für die Prävention möglicher Komplikationen wie Osteoporoseentwicklung oder ausbleibender Knochenheilung bis hin zur Pseudarthrosenentwicklung.



**Abbildung 5: Innervation von Knochen und Knochenhaut.** A) Schematische Darstellung der Innervation eines Röhrenknochens mit sensorischen Nerven und dem Gefäßverlauf folgenden Nervenfasern des sympathischen Nervensystems (SNS). B) Immunhistochemie des Periosts mit Antikörperfärbungen für TH (Thyroxin Hydroxylase, hier als Marker für Nervenfasern des Sympathikus verwendet), CGRP, CD31 (PECAM-1, hier als Endothelzellmarker verwendet), DAPI (als Zellkernmarker) sowie Differenzial-Interferenzkontrastlichtmikroskopie zur Visualisierung der Kortikalis (DIC). C) Immunhistochemische Darstellung von CGRP positiven Nervenfasern im trabekulären Knochen. D) Immunhistochemische Darstellung von TH positiven Nervenfasern als adrenerge Begleitfasern eines Blutgefäßes im Knochen. Abbildungen modifiziert nach [51].

Bei zunehmender Anwendung des längerfristigen, pharmakologischen CGRP-Rezeptor- und CGRP-Antagonismus stellt sich die Frage nach möglichen Nebenwirkungen und Langzeitfolgen. In den bisherigen Studien wurden vor allem Übelkeit, Rhinitis und Kopfschmerzen beobachtet [63], [98]–[100]. Dennoch könnte langfristig die Inhibition der CGRP-Signalübertragung die Funktion weiterer Organe und Gewebe beeinträchtigen, da  $\alpha$ -CGRP und sein Rezeptor in einem breiten Spektrum verschiedener Gewebe exprimiert werden [66]–[68] (**Abb. 6**). Insbesondere die zuvor beschriebene anabole Rolle von  $\alpha$ -CGRP im Knochenstoffwechsel und die aktuell diskutierte Rolle von  $\alpha$ -CGRP in der Pathogenese der Adipositas und des Metabolischen Syndroms ist für die medizinische Versorgungsrealität potentiell von Bedeutung. Darüber hinaus ist eine relevante Rolle von  $\alpha$ -CGRP in der Knochenheilung zu vermuten, da es die Osteoblastendifferenzierung und-funktion positiv beeinflusst [94], [101].

Diesbezüglich liegen bisher keine Daten über die Langzeitwirkungen des pharmakologischen CGRP-Rezeptor- oder CGRP-Antagonismus vor. Diese Studie charakterisiert daher die Auswirkungen von kontinuierlichem CGRP-Rezeptorantagonismus

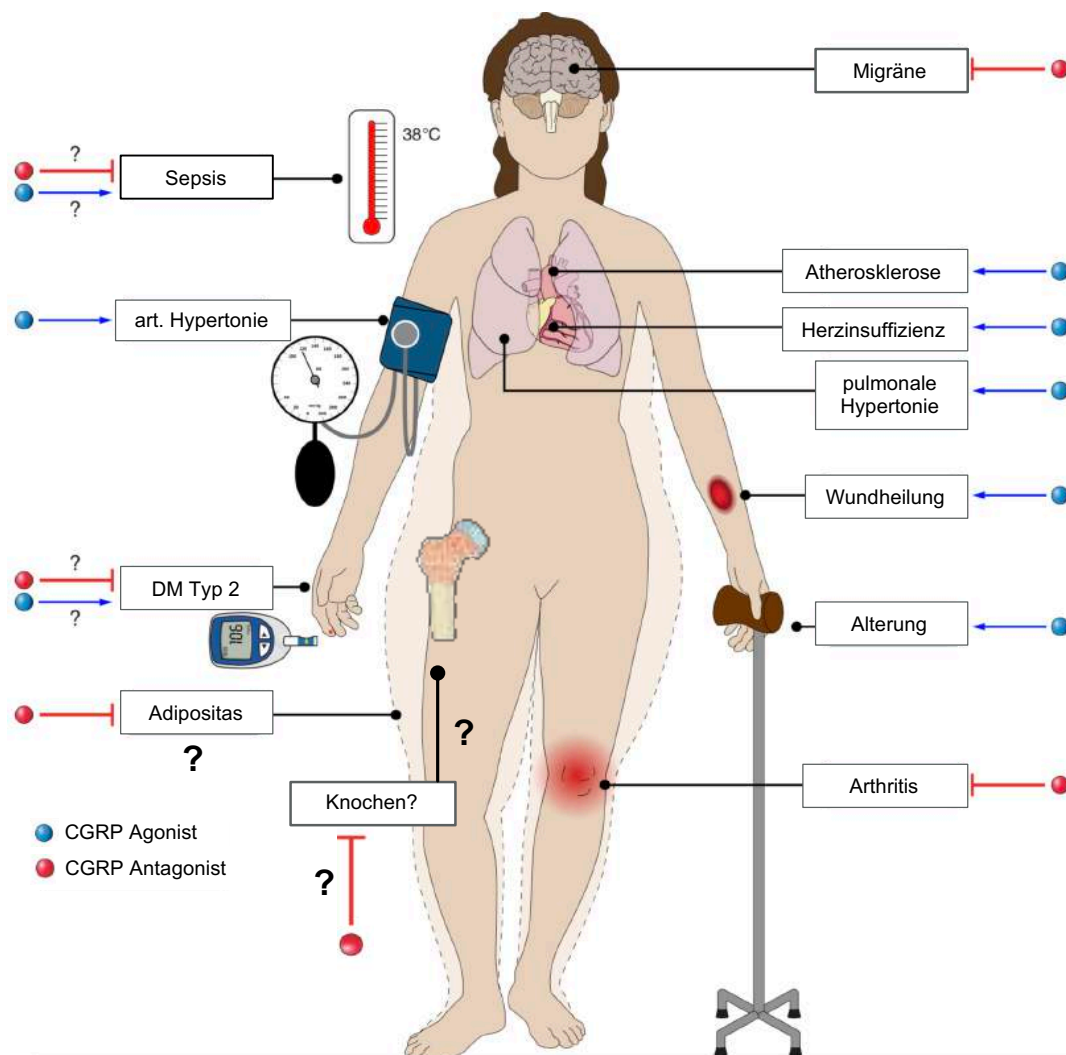


auf den Knochenstoffwechsel und auf die Adipositasentwicklung in einem präklinischen Modell der diät-induzierten Adipositas (DIO). Nachfolgend zielt eine weiterführende Studie unserer Arbeitsgruppe darauf ab, die Rolle von globaler  $\alpha$ -Cgrp-Defizienz in der Knochenheilung zu untersuchen [102].

Hieraus leiten sich die folgenden Fragestellungen für diese Arbeit ab:

1. Hat ein langfristiger CGRP-Rezeptorantagonismus Einfluss auf die Gewichtszunahme, die Glukosetoleranz, die Serumlipidwerte sowie die Inflammationsprofile in Fett- und Lebergewebe als charakteristische Parameter des Metabolischen Syndroms unter HFD im Mausmodell?

2. Führt ein langfristiger CGRP-Rezeptorantagonismus zu einer Störung des Knochenumbaus im Mausmodell?



**Abbildung 6:  $\alpha$ -CGRPs mutmaßliche Rollen im Organismus und mögliche resultierende pharmakologische Konsequenzen.**  $\alpha$ -CGRP übt als nozizeptives Neuropeptid und Vasodilatator, dessen Rezeptor in diversen Gewebetypen exprimiert wird, wahrscheinlich Einfluss auf eine Vielzahl physiologischer Prozesse aus. Während die Rolle von  $\alpha$ -CGRP in der Migräne gut beschrieben ist, sind die Effekte von  $\alpha$ -CGRP im restlichen Organismus überwiegend noch nicht abschließend geklärt. Zum Einfluss von pharmakologischer CGRP-Rezeptorinhibition auf Knochenstoffwechsel, nahrungsinduzierte Adipositas und Glucosetoleranz im Sinne des Diabetes mellitus Typ 2 (DM Typ 2) soll diese Arbeit mittels eines präklinischen Modells einen Teil zum Aufschluss beitragen (Grafik modifiziert nach [66]).

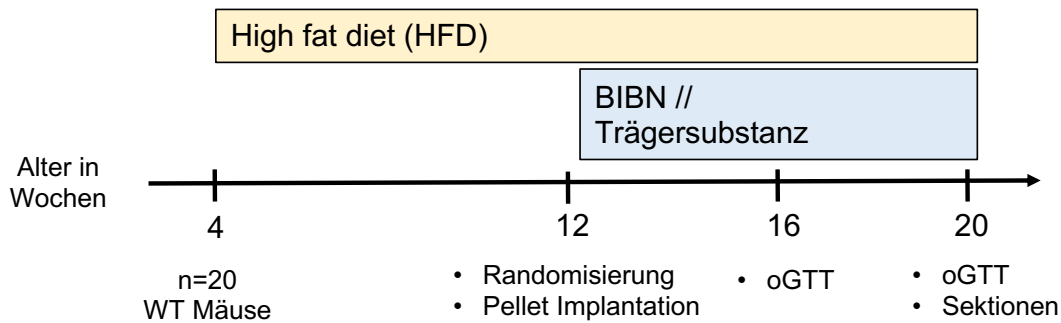
## 2. Methodik

### 2.1 *In vivo* Experimente

Die physiologischen und pathophysiologischen Interaktionen des Nervensystems mit dem Knochen- und Energiestoffwechsel im Gesamtorganismus können aktuell noch nicht ausreichend *in vitro* oder *in silico* abgebildet werden. Dementsprechend wurde die Maus (*Mus musculus*) als Modellorganismus zur Analyse der systemischen Effekte der pharmakologischen CGRP-Rezeptorinhibition im Wildtyp (WT) gewählt, da sie relevante Signalwege und Regulationsmechanismen mit dem Menschen teilt. [103]–[105]. Alle Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde genehmigt (G0142/17, G0277/16, Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin) und nach den 3R-Prinzipien (Refine, Reduce, Replace) [106] und den Richtlinien der GV-SOLAS [107], [108] konzipiert und durchgeführt. Zur Analyse einer längerfristigen CGRP-Rezeptorinhibition auf den Knochenmetabolismus sowie die Entwicklung eines Metabolischen Syndroms wurde sich eines murinen Modells mit adipogener, fettreicher Diät und kontinuierlicher Freisetzung des CGRP-Rezeptorinhibitors Olcegepant (BIBN 4096, im folgenden BIBN abgekürzt) bedient (Kapitel 2.1.1).

#### 2.1.1 Pharmakologischer CGRP-Rezeptor-Antagonismus – Knochenmetabolismus und Energiestoffwechsel

Tiermodell: Unter Standardhaltungsbedingungen wurden 20 weibliche WT-Mäuse (C57Bl/6J-Stamm) in den Anlagen der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin im Virchowklinikum gehalten. Die nahrungsinduzierte Adipositas (DIO) wurde, wie zuvor beschrieben, über eine fettreiche, hochkalorische Diät (HFD) mit Softpellets (Plexx B.V., Niederlande) ad libitum ab Ende der vierten Lebenswoche durchgeführt [80]. Nach Ende der 12. Lebenswoche (acht Wochen HFD) wurden die Mäuse randomisiert und erhielten einen RFID-Chip subcutan (s.c.) zur sicheren Identifikation nach Randomisierung. Ein Wirkstoffträger (Pellet) wurde s.c. implantiert, welcher entweder den CGRP-Rezeptorantagonisten BIBN mit 0,02mg/Tag (BIBN 4096; Olcegepant; Tocris/ Bio-Techne, Deutschland) oder nur die Trägersubstanz (im Folgenden Kontrolle genannt) über 60 Tage freisetzt. BIBN wurde gewählt, da es den murinen CGRP Rezeptor mit ausreichend hoher Potenz antagonisiert, was bei anderen Wirkstoffen wie Ubrogepant oder den monoklonalen Antikörpern, die speziell gegen die menschliche CLR oder CGRP gerichtet sind, nicht der Fall ist [109], [110]. Anschließend wurde bis zum Abschluss der 20. Lebenswoche die HFD fortgesetzt (acht weitere Wochen HFD, insgesamt 16 Wochen HFD). Nach Abschluss der 16. und 20. Lebenswoche erfolgte je ein oraler Glucosetoleranztest (oGTT, s.u.) (**Abb. 7**). Die Sektionen zur Probenaufarbeitung erfolgten am Ende der 20. Lebenswoche nach acht Stunden Nüchternheit [111]. Nach Narkose mittels inhalativem Isoflurans und Tod durch kardiale Punktion und Exsanguination erfolgte die Probenentnahme. Die Gewebeproben wurden auf Flüssigstickstoff schockgefroren.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.** Im Alter von vier Wochen beginnt die HFD, im Alter von zwölf Wochen die Randomisierung und Implantation der BIBN/ Kontroll-Pellets, im Alter von 16 und 20 Wochen erfolgten die oGTTs, anschließend die Gewebeentnahmen zur weiterführenden Analyse (Abbildung modifiziert nach [1]).

Perioperatives Management: Das perioperative Management erfolgte nach zuvor beschriebenem Standard [112]: Die balancierte Anästhesie wurde mit Isofluran (2-2,5%, in 0,2 L/min O<sub>2</sub> + 0,5 L/min N<sub>2</sub>) eingeleitet. Die narkotisierten Mäuse wurden auf eine elektrische Heizplatte gebettet, um eine Hypothermie zu verhindern und die Anästhesie wurde über eine spezielle Inhalationsmaske mit Isofluran (1,5%, in 0,2 L/min O<sub>2</sub> + 0,5 L/min N<sub>2</sub>) aufrechterhalten. Präoperativ erhielten die Mäuse 0,03 mg/kgKG -Buprenorphin (Temgesic, RB Pharmaceuticals, Deutschland) zur Analgesie und Augencreme (Bepanthen, Deutschland) zur Verhinderung der Dehydrierung und zum Schutz der Augen. Postoperativ wurden die Mäuse unter einer Infrarotlampe gehalten, um eine Unterkühlung zu verhindern und wurden bis zur vollständigen Erholung von der Operation überwacht. Die postoperative Analgesie wurde mit Tramadol im Trinkwasser (25 mg/L Wasser, Tramal 100 mg/mL, Grünthal, Deutschland) für drei Tage aufrechterhalten.

Operative Medikamentenpelletimplantation: Das perioperative Procedere erfolgte wie oben beschrieben. Nach chirurgischer Hautdesinfektion (Softasept N, B.Braun, Deutschland) wurde ein längs verlaufender 3 mm langer Hautschnitt in der Mitte des Rückens durchgeführt und das Medikamentenpellet und der RFID-Chip in getrennten subkutanen Tunneln implantiert. Der Wundverschluss erfolgte per Einzelknopfnah (Prolene 5-0, B.Braun, Deutschland).

Serumparameter: Die orale Glukosetoleranz wurde nach einer achtstündigen Nüchternperiode mittels oralem Glukosetoleranztests geprüft. Hierzu wurden 1 g/kgKG Glukose auf der Basis einer 20%igen Glukoselösung, verdünnt in Aqua-Injektionslösung, per Schlundsonde appliziert (B.Braun, Deutschland). Die Blutzuckerwerte wurden vor Start der Glucosegabe (0 Minuten) und nach 15, 30, 60 und 120 Minuten nach Gabe im Kapillarblut des Schwanzes (taube Narbenstelle der Genotypisierungsprobeentnahme) mit AccuCheck Aviva Sticks (Roche) gemessen. Die Knochenumbauparameter wurden mittels ELISA gemäß Herstelleranweisungen bestimmt ( $\beta$ -Crosslaps: RatLaps™ (CTX-I) EIA, Immunodiagnostic Systems, England; P1NP: Prokollagen Typ 1 N-terminales Propeptid, NovusBiologicals, Deutschland). Unter Verwendung kommerzieller Kits, die an einen Random Access Analyzer Cobas Mira S von Roche Diagnostics angepasst wurden, wurden Serumtriglyceride (TAG), Cholesterin (Chol), High-Density Lipoprotein (HDL), Alanin-Aminotransferase (ALT) (ABX Pentra, Horiba Europe GmbH, Deutschland), freie Fettsäuren (FFA) und Glycerin (Randox Laboratories Ltd. England) am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE) Potsdam Rehbrücke bestimmt.

Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS): Die Probenvorbereitungen, Messungen und Datenauswertungen zur Bestimmung des Wirkstoffes



Olcegepant/ BIBN im Serum der Versuchstiere wurden durch die Core-Facility High Throughput Mass Spectrometry des Institutes für Biochemie der Charité (Dr. Michael Mülleder, Fr. Judith Müchler) durchgeführt [1].

Genexpressionsanalysen: Mittels UltraTurrax (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland) wurden die schockgefrorenen Gewebe in Trizol homogenisiert und anschließend die RNA mittels RNeasy mini Kit (Qiagen) isoliert. Die RNA Qualität wurde spektroskopisch (NanoDrop, Thermo Fisher, Absorptionsratio 260nm/280nm zwischen 1,8 und 2,1) überprüft. Mittels RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher) erfolgte die Synthese der cDNA, von dieser wurden je 0,4 µg pro Ansatz für die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR,) verwendet. Die qPCR wurde mit Power SYBR Green PCR Master Mix (Sigma Aldrich) durchgeführt. Als Negativkontrollen wurde DEPC-behandeltes Wasser verwendet. Die relative Genexpression wurde nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode berechnet [113]. Die entsprechenden Primersequenzen finden sich im Supplement des Papers [1], [102]. Zur optimalen internen Normalisierung wurde der Bestkeeper-Algorithmus [114] auf *Cypa*, *Hprt* und *Hmbs* in der Leber und *Cypa*, *Hprt* und *Psmb2* im gonadalen weißen Fettgewebe (gWAT) angewendet, wie zuvor beschrieben [115].

Nicht-dekalzifizierte Histologie: Nach einer 24-stündigen Inkubation in phosphatgepuffertem 4%igem Formaldehyd (PFA) wurden die Lendenwirbelkörper L2 bis L5 und ein Schienbein jeder Maus in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen dehydriert und, wie zuvor beschrieben, in Methylmethacrylat eingebettet [116], [117]. Auf einem Microtec-Rotationsmikrotom (Techno-Med, München, Deutschland) erfolgte der Schnitt von 4 µm dicken Schnitten in der Sagittalebene. Diese Schnitte wurden je nach Fragestellung mit Toluidinblau, von Kossa/Gieson oder tartratresistente saure Phosphatase (TRAP)-Aktivitätsfärbung gefärbt [118], [119].

Histomorphometrie: Eine Tibia und zwei Lendenwirbel pro Tier wurden von einer unabhängigen, verblindeten Untersucherin histomorphometrisch auf die nachfolgenden Parameter untersucht. Die histomorphometrische Quantifizierung wurde an o.g. van Kossa/Toluidin-blau oder TRAP gefärbten Schnitten durchgeführt. Die Analyse des trabekulären Knochenvolumens (BV/TV), der trabekulären Dicke (Tb.Th.), der Trabekelzahl (Tb.N.), der trabekulären Separation (Tb.Sp.) und die Bestimmung der Osteoblasten- und Osteoklastenzahl (Ob.N/BPm; Oc.N/B.Pm) wurden mit dem Osteo-Measure-Histomorphometriesystem (Osteometrics, Atlanta, GA, USA) nach der Leitlinie der American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) [120] durchgeführt.

## **2.2 In vitro Experimente**

Osteoblasten (Obl) wurden aus murinem Knochenmark (BM) nach vorbeschriebenen Protokollen [121], [122] differenziert. Hierzu wurden stromale Stammzellen des Knochenmarks (BMSCs) mittels „bone flush von 10-12 Wochen alten, normalgewichtigen WT C57Bl/6J Mäusen“ aus Tibiae und Femur gespült und zu 500.000 Zellen in Expansionsmedium (aMEM, Thermo Fischer, Deutschland) mit 10% fetalem Kälberserum (FBS, ThermoFisher, Deutschland, 1% Penicillin/Streptomycin) auf 80% Konfluenz expandiert. Hiernach wurde die osteogene Differenzierung mittels Differenzierungsmedium (zusätzlich 0,25 mM Natrium-L-Ascorbat und 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, Sigma, Deutschland) begonnen. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach dem vierten Tag der osteogenen Differenzierung wurden die Obl über Nacht im aMEM ausgehungert und anschließend mit 0,1 mM  $\alpha$ -CGRP (Fa. Bachem, Deutschland) und/ oder 10 µM BIBN (Tocris) in aMEM stimuliert. Nach sechs

Stunden Inkubation wurden die Zellen mit TRIzol (Invotrogen) lysiert. Die RNA Extraktion und qPCR erfolgten wie unter 2.1 beschrieben.

## 2.3 Statistik

Das Tierexperiment unter 2.1.1 wurde konzipiert, um biologische Unterschiede in einer normalverteilten Population mit einer Effektstärke von Cohens'  $d = 1,6$ , einem  $\alpha$ -Fehler von 0,05 und einer Power von 0,8 ( $\beta$ -Fehler von 0,2) nachweisen zu können, was zu  $n = 8$  Tieren pro Gruppe führte. Um die Robustheit der Studie zu erhöhen, wurde  $n = 10$  zum Ausgleich möglicher Eventualitäten (im Experiment verstorbene Tiere oder gestörte Proben) verwendet. Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Gauß'sche Normalverteilung getestet und, falls normalverteilt, mit dem zweiseitigen Student's t-Test oder einer mixed ANOVA-Analyse mit anschließendem Bonferroni-Post-hoc-Test auf Signifikanz geprüft. Outliner wurden mit der ROUT-Methode identifiziert ( $Q = 0,05$ ) [123].  $P < 0,05$  wurde als Signifikant betrachtet. Fehlende Datenpunkte werden durch den Verlust eines Tieres während der oGTT, durch Probenartefakte nach der Aufarbeitung, die keine adäquate histomorphometrische Quantifizierung erlauben oder durch unzureichende Probenqualität im Falle einer RNA-Extraktion erklärt, sowie durch einen Outlier im Falle der LC-MS. Alle Probengrößen sind in den Legenden der Abbildungen aufgeführt.

Alle Datenerhebungen, -verarbeitungen und statistischen Analysen wurden verblindet durchgeführt. Die Datenverarbeitung erfolgte in Microsoft Excel 2010, die statistische Planung wurde mit der Software G\*Power 3.1 [124] durchgeführt, die statistischen Analysen und graphischen Aufbereitungen wurden mit GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt.

## 3. Ergebnisse

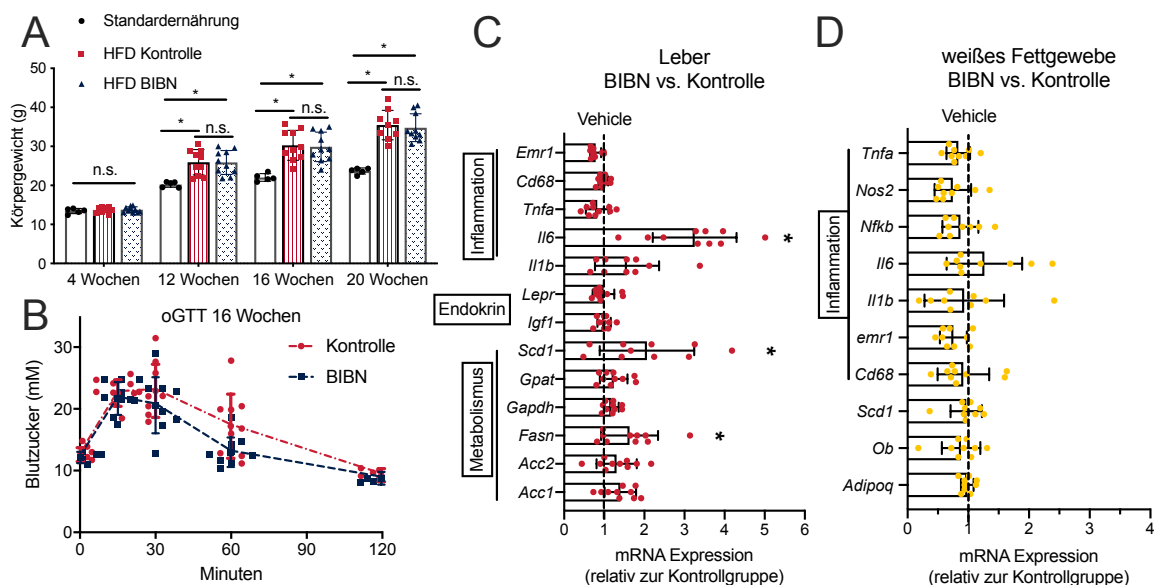
### 3.1 Die CGRP-Rezeptorinhibition führt unter HFD zu geringen Alterationen der Parameter des Metabolischen Syndroms

Um die möglichen Auswirkungen einer längerfristigen CGRP-Rezeptorinhibition auf die Entwicklung einer nahrungsinduzierten Adipositas (*diet-induced obesity*, DIO) zu analysieren, wurden die Versuchsmäuse im Alter von vier Wochen auf eine hochkalorische, fettreiche Diät (HFD) gesetzt. Nach achtwöchiger Fütterung erfolgte die Implantation des Medikaments (BIBN Freisetzungsrate 0,02mg/d) oder der Kontrollpellets (nur die Trägersubstanz; Kontrolle) mit kontinuierlicher Wirkstofffreigabe (siehe 2.1.1 und **Abb. 7**). Nach weiteren vier und acht Wochen unter HFD erfolgte je ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT).

Die systemische Verfügbarkeit des Wirkstoffes BIBN im Serum wurde per LC-MS bestätigt (siehe Supplement Figure 2 des Papers [1]). Die funktionelle Aktivität des BIBNs zur Inhibition von CGRP, wurde anhand von frühen, murinen Osteoblastenkulturen *in vitro* bestätigt (**Abb. 10 C**).

Unter der HFD zeigten die Versuchstiere eine deutliche Zunahme des Körpergewichts im Vergleich zu nicht behandelten Tieren auf Standarddiät, jedoch ohne einen Unterschied zwischen der Interventions- und der Kontrollgruppe (**Abb. 8 A**). Im oGTT nach zwölf Wochen Fütterungsdauer (vier Wochen BIBN Behandlung) zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Im oGTT nach 16 Wochen Fütterungsdauer (acht Wochen BIBN Behandlung) zeigte sich eine leichte, nicht statistisch signifikante Tendenz zu einer verbesserten Glukosetoleranz

in der Interventionsgruppe (**Abb. 8 B**). In den Analysen nach Versuchsende (16 Wochen HFD, acht Wochen BIBN) konnten keine Unterschiede in den Serumlipiden (TAG, FFA, Gesamt-Cholesterin, HDL) des Serum-Glycerols sowie der Alanin-Aminotransferase (ALT, als Leberenzym) im Serum oder den Organgewichten von weißem Fettgewebe, braunem Fettgewebe oder der Leber beobachtet werden [1]. Auf Genexpressionsebene zeigten sich im weißen und braunen Fettgewebe keine Alterationen der Expressionsmuster von proinflammatorischen Zytokinen, die zuvor im Zusammenhang mit der niedriggradigen, chronischen Fettgewebsinflammation beschrieben wurden. Ebenso blieb die Expression von relevanten Adipokinen (Leptin, Adiponektin) oder von Schlüsselenzymen des Fettstoffwechsels oder der Entkopplung der Atmungskette (*Ucp1*) ohne nennenswerte Veränderung (**Abb. 8 C**, braunes Fettgewebe nicht dargestellt). In der Leber beeinflusste die achtwöchige BIBN-Behandlung die Expression der meisten Entzündungsmarker nicht, mit Ausnahme der erhöhten Interleukin-6 (*Il6*) mRNA-Expression. In ähnlicher Weise wurde die hepatische Expression der relevanten endokrinen Mediatoren wie Insulin-like growth factor 1 (*Igf1*) und der Leptinrezeptor (*Lepr*) durch BIBN nicht beeinflusst. Es wurde jedoch eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von Stearoyl-CoA-Desaturase (*Scd1*) und Fettsäuresynthase (*Fasn*) detektiert, die für Schlüsselenzyme bei der Kontrolle des Fettsäurestoffwechsels kodieren (**Abb. 8 D**). Zusammenfassend konnte durch diese Messreihe gezeigt werden, dass die langfristige CGRP-Rezeptorinhibition im Rahmen der DIO, den Glukose- und Fettstoffwechsel nicht maßgeblich beeinflusst.

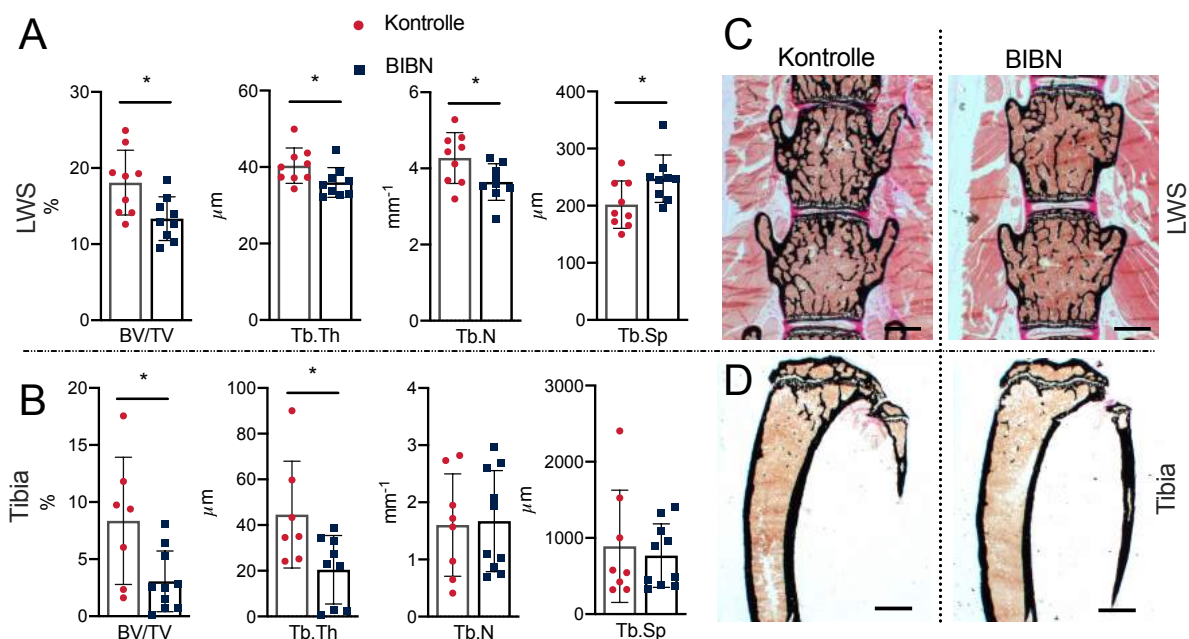


**Abbildung 8: Auswirkungen der längerfristigen CGRP-Rezeptorinhibition auf Stoffwechselparameter bei Mäusen mit ernährungsbedingter Adipositas sowie Auswirkungen auf die Genexpression ausgewählter Markergene in Leber und weißem Fettgewebe.** A) Durchschnittliches Körpergewicht der Versuchsmäuse mit HFD und BIBN oder Kontroll-Pellet im Verlauf des Experiments (n = 9-10) oder von Mäusen mit Standarddiät im selben Alter (n = 5). Mixed ANOVA mit Tukey-Post-hoc-Analyse, \*P < 0,05 Daten sind als Durchschnitt mit Whiskern für die Standardabweichung (SD.BW) dargestellt. B) Blutzuckerreaktion auf einen oGTT (1 g/kg) nach einer achtstündigen Nüchternperiode in den angegebenen Gruppen (n = 9 Kontrolle; n = 10 BIBN) nach 16 Wochen HFD und acht Wochen BIBN/Kontroll Behandlung. Die Blutglukosespiegel wurden vor Glukoseapplikation und nach 15, 30, 60 und 120 min nach oraler Glukose-Gabe gemessen, P = 0,093 zwischen BIBN und Kontrolle; mixed ANOVA. C, D) qRT-PCR-Expressionsanalyse (Vielfache) für die angegebenen Gene in weißem Fettgewebe respektive Lebergewebe der Versuchstiere nach Versuchsende. Wenn die Expression des Zielgens nicht nachweisbar war, wurde die Expression auf "0" gesetzt, n = 8 Kontrolle; n = 10 BIBN, \*P < 0,05, Unterschiede zwischen BIBN und Kontrolle; zweiseitiger

Student's t-Test. Die Daten sind als Durchschnitt mit Whiskern für die Standardabweichung dargestellt. Abbildungen modifiziert nach [1].

### 3.2 Die CGRP-Rezeptorinhibition führt zu einem osteopenen Knochenaspekt und geht mit einer Reduktion der Knochenformationsparameter einher

Zur Analyse der Knochenqualität erfolgte die histomorphometrische Analyse von unentkalkten Knochenschnitten der Tibia und der Lendenwirbelsäule (LWS). Im Bereich der LWS zeigte sich nach achtwöchiger, pharmakologischer CGRP-Rezeptorinhibition in allen adressierten Parametern eine Reduktion der Knochenqualität. Weiter fand sich ein signifikant geringeres Knochenvolumen pro Gewebenvolumen (BV/TV), eine reduzierte Trabekeldicke (Tb.Th), eine reduzierte Trabekeldichte (Tb.N) sowie ein konsekutiv erhöhter intertrabekulärer Abstand (Tr.Sp). Die Tibia zeigte ebenfalls eine reduzierte Knochenqualität mit deutlich reduzierter Knochenmasse und deutlich reduzierter Trabekeldicke bei gleichbleibend lokalisationsbedingt geringer Trabekeldichte und -abstand (**Abb. 9**).

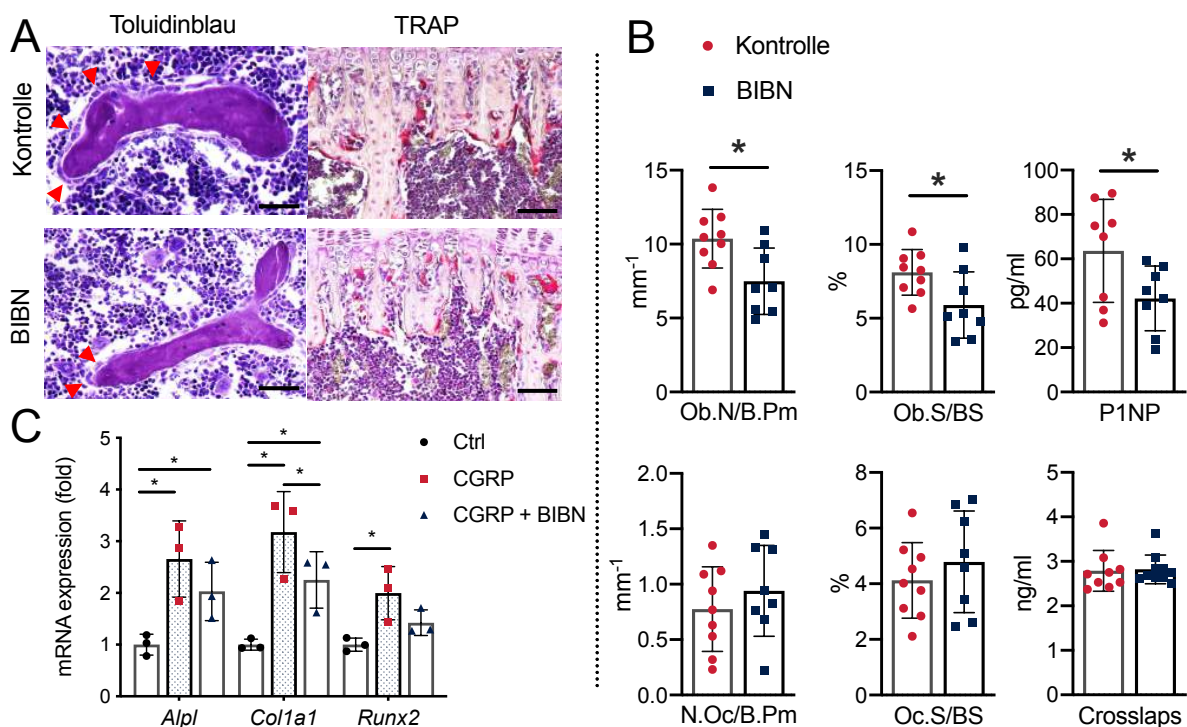


**Abbildung 9: Eine langfristige BIBN-Behandlung führt zu Osteopenie in Wirbeln und Röhrenknochen.** A, B) Quantifizierung des prozentualen Anteils des trabekulären Knochenvolumens pro Gewebenvolumen (BV/TV), der Trabekeldichte (Tb.N.), der Trabekeldicke (Tb.Th.) und der Trabekelseparation (Tb.Sp.). (LWS: n = 9), (Tibia: n = 7-8 Kontrolle; n = 10 BIBN). \*P < 0,05, Unterschiede zwischen BIBN und Kontrolle; zweiseitiger Student's t-test. Die Daten sind als Durchschnitt mit Whiskern für die Standardabweichung dargestellt. C, D) Von-Kossa/Gieson-Färbung von nicht entkalkten Schnitten der LWS (L3 und L4) (oben) und der proximalen Tibia (unten) nach acht Wochen Behandlung mit BIBN, mineralisiertes Knochengewebe ist schwarz gefärbt). Maßstabsbalken = 500 μm für die LWS; Maßstabsbalken = 400 μm für die proximale Tibia. Abb. modifiziert nach [1].

Zur mechanistischen Untersuchung der beobachteten reduzierten Knochenqualität wurden im nächsten Schritt Knochenformations- und Resorptionsparameter auf lokaler und systemischer Ebene adressiert. Histomorphometrisch zeigte sich hier eine Reduktion der Knochenformationsparameter anhand einer signifikant reduzierten Osteoblastenzahl pro Knochenumfang (Ob.N/B.Pm) und einer reduzierten Osteoblastenoberfläche pro Knochenoberfläche (Ob.S/BS) (**Abb. 10 A**). Diese Beobachtungen wurden von einer

systemischen Reduktion der Prokollagen-1-N-Peptid-Konzentration (Spaltprodukt der Kollagenproduktion der Osteoblasten) im Serum begleitet. Auf Seiten den Knochenresorptionsparameter zeigten sich weder lokale noch systemische Veränderungen. Histomorphometrisch ergaben sich weder Veränderungen der Osteoklastenanzahl pro Knochenumfang (N.Oc/B.Pm) noch der Osteoklastenoberfläche pro Knochenoberfläche (Oc.S/BS) oder der systemischen  $\beta$ -Crosslaps Serumkonzentration, einem Kollagenabbauprodukt durch Osteoklasten im Rahmen der Knochenresorption (**Abb. 10 B**).

*In vitro* konnte bei frühen Osteoblasten (Tag 4 der osteogenen Differenzierung) unter Stimulation mit  $\alpha$ -CGRP eine gesteigerte mRNA-Expression osteoanaboler Markergene, welche durch BIBN inhibiert wurden, festgestellt werden. So zeigte sich durch BIBN eine Inhibition der osteoanabolen Genexpressionsinduktion von  $\alpha$ -CGRP. Insbesondere die  $\alpha$ -CGRP-induzierte Expression von Runt-Related Transcription Factor 2 (*Runx2*), eines Schlüsseltranskriptionsfaktors der osteogenen Differenzierung von BMSCs, der alkalischen Phosphatase (*Alpl*), eines Schlüsselenzyms der Matrixmineralisierung, und des Kollagens Typ I  $\alpha$  1 (*Col1a1*), dem Hauptkollagen der Knochenbildung wurden inhibiert (**Abb. 10 C**).



**Abbildung 10: Systemischer CGRP-Rezeptorantagonismus führt zu einer reduzierten Knochenformation bei gleichbleibender Knochenresorption im beschriebenen Modell.** A) Repräsentative Toluidinblau respektive TRAP-Färbungen von Wirbelschnitten der angegebenen Gruppen nach acht Wochen BIBN-Behandlung. Pfeile zeigen knochenbildende Osteoblasten an. Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m auf der linken Seite sowie repräsentative TRAP-Aktivitätsfärbungen der proximalen Tibia derselben Mäuse (Maßstabsbalken = 200  $\mu$ m) auf der rechten Seite. B) Oben: Quantifizierung der Anzahl der Osteoblasten pro Knochenperimeter (N.Ob/B.Pm) und des prozentualen Anteils der Osteoblastenoberfläche pro Knochenoberfläche (Ob.S/BS) sowie Serumspiegel des Knochenbildungsmarkers P1NP bei denselben Mäusen. Unten: Quantifizierung der Anzahl der Osteoklasten pro Knochenumfang (N.Oc/B.Pm) und des prozentualen Anteils der Osteoklastenoberfläche pro Knochenoberfläche (Oc.S/BS) sowie Serumspiegel des Knochenresorptionsmarkers  $\beta$ -Crosslaps (Crosslaps) bei denselben Mäusen. n = 9 Kontrolle; n = 8-9 BIBN. \*P < 0,05, Unterschiede zwischen BIBN und Kontrolle; zweiseitiger Student's t-test. Daten sind als Durchschnitt mit Whiskern für die Standardabweichung dargestellt. C) Relative Genexpression (Vielfache der Kontrolle, normalisiert auf *Gapdh*) für die angegebenen osteogenen Markergene in BMSC an Tag 4 der osteogenen Differenzierung nach Co-Inkubation mit mit 0,1 mM  $\alpha$ -CGRP, 0,1mM

$\alpha$ -CGRP + 10  $\mu$ M BIBN oder Kontrollmedium. BIBN hemmt teilweise die stimulierenden Effekte von  $\alpha$ -CGRP auf osteogene Markergene. n = 3, \*p < 0,05, Zweifach-ANOVA mit Fisher's LSD-Test. Daten sind als Durchschnitt mit Whiskern für die Standardabweichung dargestellt.

## 4. Diskussion

Die Entwicklung und Einführung der CGRP-Rezeptor-/ CGRP-Inhibition zur Therapie und Prophylaxe der Migräne führt zu einer deutlichen Beschwerdelinderung bei Patientinnen und Patienten mit therapierefraktärer Migräne [70]. Gerade deshalb rücken mögliche Nebenwirkungen dieser Therapien und die Rolle von CGRP im Gesamtorganismus bei zunehmender klinischer Anwendung in einen wissenschaftlichen und klinischen Fokus. Diese Arbeit hatte zum Ziel, erstmalig in einem präklinischen Modell den Einfluss einer kontinuierlichen pharmakologischen CGRP-Rezeptorinhibition auf den Metabolismus und die Knochenhomöostase im Rahmen einer nahrungsinduzierten Adipositas zu untersuchen. Es zeigte sich unter CGRP-Rezeptorantagonismus eine deutliche Reduktion der Knochenformation mit konsekutiver Knochenqualitätsreduktion. Hierauf aufbauend befasste sich unsere Arbeitsgruppe in einer weiteren Arbeit mit der Rolle von  $\alpha$ -CGRP in der Knochenheilung [102]. Im Hinblick auf den Effekt des CGRP-Rezeptorantagonismus auf die Entwicklung des Metabolischen Syndroms unter HFD wurden nur geringe Veränderungen beobachtet.

### 4.1 Der Einfluss des CGRP-Rezeptorantagonismus auf den Metabolismus unter HFD

Vorhergehende Arbeiten legen eine relevante Rolle von CGRP im Rahmen des Metabolischen Syndroms und der Adipositas nahe. Klinisch zeigte sich eine Korrelation zwischen erhöhter CGRP-Serumkonzentration und Übergewicht bei Frauen vor und nach Gewichtsreduktion [78] und bei Frauen mit PCOS [79]. Weiter konnte ein direkter Effekt einer  $\alpha$ -CGRP-Infusion auf den Serumglukosespiegel im Menschen nachgewiesen werden [125]. Präklinisch zeigten  $\alpha$ -CGRP-defiziente Mäuse einen erhöhten Energieumsatz [126], eine moderate Protektion vor Gewichtszunahme und eine reduzierte Verschlechterung der Serumlipide und der oralen Glucosetoleranz unter HFD [80], [84], [126]. In Wildtypmäusen führte eine intraperitoneale Injektion von  $\alpha$ -CGRP zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme ohne Einfluss auf die Wasseraufnahme [127]. In Ratten zeigte die Applikation von  $\alpha$ -CGRP eine Inhibition der Insulin- und Glucagonsekretion im Pankreas [128]. Aktuelle *in vitro* Studien zeigten jedoch eine gesteigerte Expression von  $\alpha$ -CGRP und Procalcitonin in humanen Adipozyten unter der Stimulation mit GIP, einem Peptidhormon aus dem Duodenum, das die Insulinausschüttung im Pankreas nach Nahrungsaufnahme stimuliert [129]. Die genauen Mechanismen hinter diesen Beobachtungen sind aktuell noch unklar. Zusammenfassend zeigt sich das Bild einer relevanten Rolle von  $\alpha$ -CGRP in der Homöostase des Energiehaushaltes [83], welche zur Annahme führte, dass der CGRP-Rezeptorantagonismus zur Therapie der Adipositas und des Metabolischen Syndroms genutzt werden könnte.

Unsere aktuellen Daten deuten jedoch darauf hin, dass eine pharmakologische Blockade des CGRP-Rezeptors weder den Verlauf der Adipositas noch die Entwicklung des Metabolischen Syndroms in signifikantem Ausmaß beeinflusst. Mit Ausnahme einer leichten, nicht signifikanten Verbesserung des oGTT nach achtwöchiger Behandlung blieben alle adressierten metabolischen Parameter, einschließlich Körper- und Organgewicht sowie der Serumlipide unverändert. Die Tatsache, dass wir eine erhöhte mRNA-Expression von Interleukin-6 und Stearoyl-CoA-Desaturase-1 in der Leber beobachteten, kann durch moderate lokale Effekte von CGRP auf die Entwicklung von Steatohepatitis während der DIO



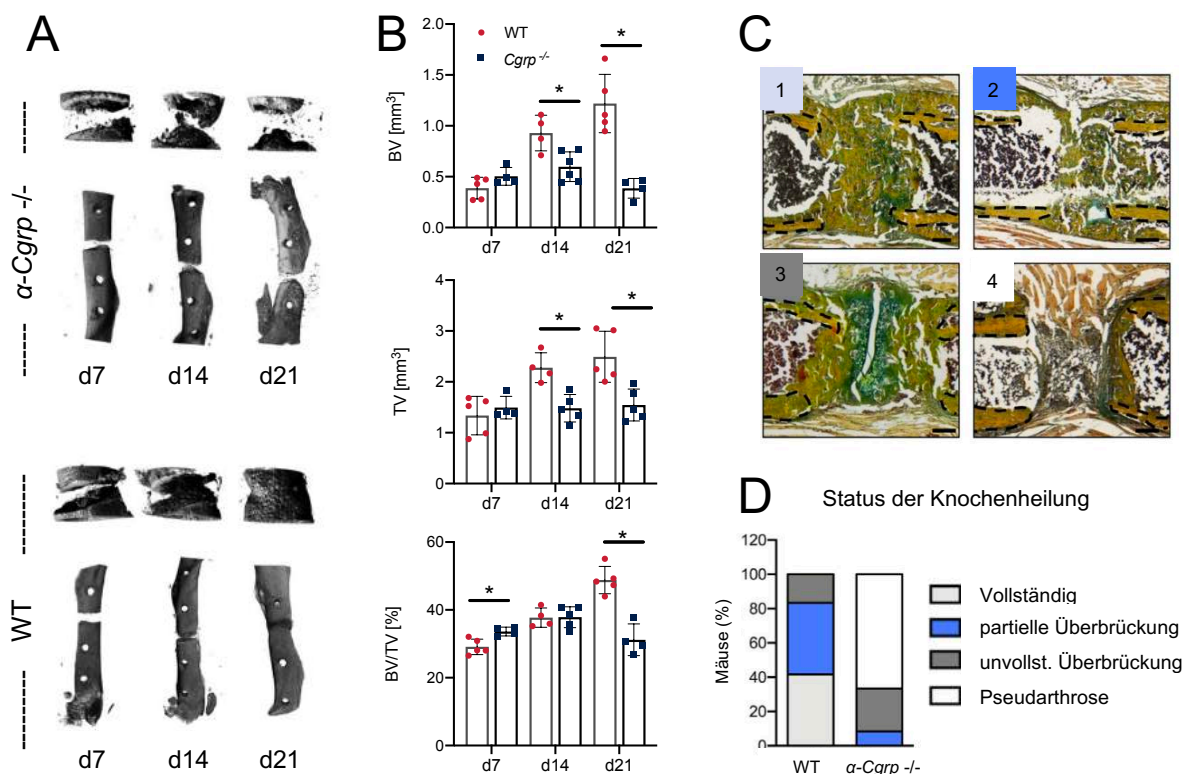
erklärt werden. Es könnte jedoch ebenso auf den Beginn der Hepatotoxizität hinweisen, die für BIBN in klinischen Studien der Phase II und III beschrieben wurde und zum Abbruch der klinischen Studien am Menschen führte [130]. In den bisherigen präklinischen Studien sind relativ hohe  $\alpha$ -CGRP-Konzentrationen oder genetische Ablationsmodelle verwendet worden, wohingegen unsere Untersuchungen die ersten zur längerfristigen Rezeptorblockade sind. In Anbetracht der Hepatotoxizität und der erstmaligen längerfristigen Anwendung wurde eine relativ geringe, wirksame Dosis an BIBN kalkuliert [131], im Vergleich zu sonst präklinisch üblichen deutlich höheren, kurzfristigen Dosierungen [110], [132]. Hierdurch stieg das Risiko, mögliche metabolische Effekte bei geringerer Dosis nicht zu erfassen. Des Weiteren zeigen weibliche Mäuse im Vergleich zu männlichen Mäusen eine geringergradige Ausprägung metabolischer Phänotypen [133], sodass unter anderen experimentellen Bedingungen andere Schlussfolgerungen möglich sein könnten. Obwohl unsere Arbeit keinen relevanten Einfluss der pharmakologischen CGRP-Rezeptorinhibition mit BIBN unter HFD in weiblichen WT-Mäusen detektieren konnte, zeigten Halloran et al. [134] unter Anti- $\alpha$ -CGRP-Antikörpertherapie im Vergleich zu Kontroll-IgGs (MuMab 7E9) im murinen Modell der genetischen Leptin-Rezeptor-Defizienz (einem etablierten, genetischen Adipositasmodell) eine Reduktion des Körpergewichts, Verbesserung des oGTT und Reduktion der Inflammation in Leber- und Fettgewebe. In männlichen WT-Mäusen in Einzelhaltung unter HFD zeigte sich hier jedoch nur ein mäßiger Effekt auf die Körpergewichtsentwicklung ohne Einfluss auf oGTT, Inflammation oder Serumlipide. Im murinen Modell des sekundären Insulinmangels zeigten sich keine Effekte der Anti- $\alpha$ -CGRP-Antikörpertherapie [134]. Für  $\alpha$ -CGRP zeigen sich somit im Kontext der Adipositas unter hochkalorischer Ernährung Hinweise auf eine relevante Rolle im Metabolismus, die bisher jedoch weder in unserem Modell unter BIBN noch unter Anti- $\alpha$ -CGRP-Antikörpertherapie im WT unter HFD pharmakologisch adressiert werden konnten, sodass weitere Forschungsbemühungen zur Klärung der zugrundeliegenden Mechanismen notwendig sind.

#### **4.2 Der Einfluss des CGRP-Rezeptorantagonismus auf die Knochenhomöostase**

$\alpha$ -CGRP spielt eine relevante Rolle in der Regulation der Knochenhomöostase. Das  $\alpha$ -Cgrp-defiziente Mausmodell zeigte eine Osteopenie durch reduzierte Knochenformation bei unveränderter Knochenresorption [88] und die Überexpression von  $\alpha$ -CGRP in Osteoblasten führte zu einer erhöhten Knochenmasse durch gesteigerte Knochenformation [93]. Passend hierzu wurde *in vitro* eine Steigerung der Osteoblastendifferenzierung und -funktion sowie ein Zusammenwirken mit dem Wnt-Signalweg in der Osteogenese durch  $\alpha$ -CGRP nachgewiesen [90]–[92], [135]. Nach achtwöchigem CGRP-Rezeptorantagonismus zeigte sich in unseren Untersuchungen eine deutliche Reduktion der Knochenqualität tibial und lumbal. In den Wirbelkörpern und im Röhrenknochen zeigte sich eine reduzierte Knochenformation bei unveränderter Knochenresorption. *In vitro* wurde die Bioaktivität des verwendeten BIBN demonstriert, mit einer Reduktion der CGRP-rezeptorvermittelten osteoanabolen Effekte auf frühe, murine, BMSC-differenzierte Osteoblasten. Aktuelle Wirkstoffe, die den CGRP/CGRP-Rezeptor Signalweg beeinflussen, inhibieren beide Formen ( $\alpha$ - und  $\beta$ ) des Peptids [136]. Da  $\beta$ -Cgrp-defiziente Mäuse keine Veränderungen des Knochenphänotyps mit unveränderter Knochenqualität und Mikroarchitektur zeigen [89], werden die von uns beobachteten Effekte durch die direkte Inhibition der physiologischen Rolle von  $\alpha$ -CGRP auf den Knochen erklärt. Nachrangig könnten sekundäre Effekte einer komplexen systemischen Reaktion auf die CGRP-Rezeptorinhibition als weitere Ursache diskutiert werden. *In vitro* konnten wir jedoch

eine direkte Inhibition der osteoanabolen Effekte von  $\alpha$ -CGRP durch BIBN beobachten (Abb. 11 C) [1], was für einen direkten Effekt spricht. Diese Ergebnisse zeigen sich im Einklang mit vorhergehenden *in vivo* und *in vitro* Studien und bestätigen somit die anfangs postulierte Hypothese der reduzierten Knochenqualität durch längerfristige CGRP-Rezeptorinhibition in einem präklinischen Modell. Klinische Untersuchungen zum Einfluss der CGRP-Rezeptor- / CGRP-Inhibition hierzu fehlen bisher, sodass in künftigen Studien die Knochengesundheit und ein etwaig erhöhtes Frakturrisiko in entsprechenden Therapiekollektiven evaluiert werden sollte.

Nach Knochenbrüchen besteht – trotz optimierter konservativer und operativer Therapieoptionen – weiterhin ein relevantes Risiko für verzögerte oder gar ausbleibende Knochenheilung, vor allem bei Risikokonstellationen, sodass diesbezüglich die Therapieregime optimiert werden müssen. Die Kenntnis der Risikofaktoren, eine hierauf optimierte Therapie sowie neue Zielstrukturen zur Entwicklung von *targeted therapies* zur Modulation der Knochenheilung sollen zukünftig Abhilfe schaffen [20]. Im intakten Knochen zeigte sich sowohl im  $\alpha$ -Cgrp-defizienten Mausmodell [88], [89] als auch im oben beschriebenen Modell unter längerfristiger CGRP-Rezeptorinhibition eine Reduktion der Knochenqualität durch eine reduzierte Knochenformation, sodass in einer weiterführenden Arbeit unserer Arbeitsgruppe [102] die Rolle von  $\alpha$ -CGRP in der Knochenheilung untersucht wurde. Hierzu wurde ein etabliertes murines Modells der genetischen  $\alpha$ -Cgrp-Defizienz [80], [88] in Kombination mit einem etablierten Knochenheilungsmodell einer femoralen Osteotomie mit Fixateur externe angewandt [112], [137]. In der  $\mu$ CT-Analyse des sich bildenden Kallus im Osteotomiespalt mit Fixateur externe zeigte sich im Wildtyp (WT) über die Tage sieben, 14 bis 21 ein zunehmendes Knochenvolumen (BV), Gewebevolumen (TV) und Knochenvolumen pro Gewebevolumen (BV/TV). Die Frakturheilung in den  $\alpha$ -Cgrp-defizienten Mäusen zeigte sich deutlich verschlechtert, mit im Vergleich zur WT-Kontrolle an Tag sieben und 21 signifikant reduzierter BV/TV sowie an Tag 14 und 21 signifikant geringerem BV und TV (Abb. 11 A, B). CT-radiographisch und histologisch (Abb. 11 C, D) zeigte sich eine deutlich gesteigerte Rate an Pseudarthrosen mit gestörter Kallusformation [102].





**Abbildung 11:  $\alpha$ -Cgrp-Defizienz führt zu einer deutlich verschlechterten Knochenheilung im murinen Modell.** A) Repräsentative  $\mu$ CT-Bilder (oberer Teil= Vergrößerung; unterer Teil = Längsübersicht) der Kallusregion im Femur von WT (unten) und  $\alpha$ -Cgrp-defizienten (oben) zu den angegebenen Zeitpunkten. B) Quantitative Analyse der  $\mu$ CT-Bilder beider Genotypen zu den gleichen Zeitpunkten. BV = Knochenvolumen, TV = Gewebivolumen, BV/TV = Knochenvolumen pro Gewebivolumen. Ungepaarter Student's t-Test verglichen. n = 4-6 wie angegeben pro Gruppe und Zeitpunkt. Boxplots stellen den Median mit minimalem und maximalem Whisker dar. C) Analyse der Frakturheilung anhand von Movatfärbungen des Frakturspalt in der nicht-dekalzifizierten Histologie (Maßstabsbalken 200  $\mu$ m) am Tag 21 nach Fraktur (Zellkerne: blauschwarz; Zytoplasma: rötlich; Kollagenes Bindegewebe: hellgelb; Muskulatur: rot; Mineralisiertes Knorpelgewebe: blau-grün; Mineralisierter Knochen: dunkelgelb): 1 = vollständige Überbrückung (alle vier Kortices durch Kallus überbrückt), 2 = partielle Überbrückung (zwei bis drei Kortices durch Kallus überbrückt), 3 = unvollständige Überbrückung (Kallus vorhanden, aber keine Überbrückung sichtbar) und 4 = Pseudarthrose (abgerundete Kortices, minimale Anwesenheit von Kallus). D) Relative Verteilung der Knochenheilungszustände 21 Tage nach Fraktur im WT und im  $\alpha$ -Cgrp-Knockoutmodell, es zeigt sich eine hohe Pseudarthrosenrate (N = 6 Mäuse pro Gruppe). Abbildung modifiziert aus [102].

Zusammenfassend konnte unsere Arbeitsgruppe im Femurosteotomiemodell mit Fixateur externe im WT CGRP-positive Nervenfasern sowie den CGRP-Rezeptor im murinen Kallusgewebe mit Punktum maximum an Tag 14 der Knochenheilung und eine erhöhte CGRP-Serumkonzentration nach Fraktur nachweisen. Konsekutive Untersuchungen der Knochenheilung im  $\alpha$ -Cgrp-defizienten Mausmodell offenbarten eine gestörte Kallusformation mit verzögerter enchondraler Knochenheilung und stark reduzierter Osteoblasten- und Osteoklastenzahl und dichte im  $\alpha$ -Cgrp-defizienten Kallusgewebe [102]. *In vitro* zeigten  $\alpha$ -Cgrp-defiziente Osteoblasten eine normale osteogene Differenzierung mit unveränderter Kalzifizierung. Zusammen mit den Beobachtungen der CGRP-positiven Innervierung des Kallus und dem nach Fraktur erhöhten CGRP-Serumspiegel und vorhergehenden Studien, die eine gestörte Knochenheilung bei denervierter Extremität zeigten [97], spricht dies für einen neuronalen Ursprung des für die Knochenheilung relevanten  $\alpha$ -CGRPs. Aktuelle Untersuchungen von Niedermair et al. [138] beobachteten bei ovariektomierten,  $\alpha$ -Cgrp-defizienten Mäusen mit intramedullärer Nagelosteosynthese am Femur einen Shift der Makrophagenpolarisation hin zu M2 Makrophagen, jedoch ohne Pseudarthrosenbildung oder eine histomorphologische Veränderung der Knochenheilung. Diese divergierenden Beobachtungen könnten durch das andersartige Frakturmodell mit geringerem Frakturspalt bei Bruch durch Dreipunktbiegung und intramedullärer Osteosynthese und konsekutiv ausbleibender Formation eines intramedullären Kallusgewebes erklärt werden. Die Verwendung von älteren Mäusen mit Ovariektomie als ein Modell osteoporotischer Frakturen, könnte ebenfalls ursächlich sein. Zhang et al. [95] konnten zeigen, dass die osteoanabole Wirkung von Magnesiumimplantaten über den CLR vermittelt wird, Mi et al. [139] konnten durch direkte Injektion von  $\alpha$ -CGRP in ein Modell der Kallusdistraktionsosteogenese bei Ratten eine verbesserte Knochenheilung und Vaskularisierung erzielen. Diese Beobachtungen unterstreichen eine relevante osteoanabole Wirkung von  $\alpha$ -CGRP im Rahmen der Knochenheilung. Da BIBN bereits im intakten Knochen eine Inhibition der Knochenformation bewirkt [1], könnte das Risiko bestehen, dass unter CGRP-Rezeptor-/ CGRP Inhibition die Knochenheilung gehemmt werden könnte, sodass dies ebenfalls in zukünftigen humanen Untersuchungen überprüft werden sollte. Die osteoanabolen Effekte von  $\alpha$ -CGRP stellen einen potentiellen pharmakologischen Angriffspunkt für metabolische Knochenkrankungen und optimierte Knochenheilung dar, der weiterer translationaler Forschung bedarf.

### 4.3 Limitationen

Unsere Studie wurde konzipiert, um sowohl den Knochenstoffwechsel als auch metabolische Veränderungen unter HFD zu adressieren, sodass die Ergebnisse in männlichen Versuchstieren oder Versuchstieren unter Standardkost abweichen können. Die pharmakologische CGRP-Rezeptorinhibition erfolgte für acht Wochen im Rahmen einer sechzehnwöchigen HFD, sodass bei längerer Gabe oder höheren Dosierungen weitere, von uns nicht beobachtete, (Neben-) Wirkungen auftreten könnten. Da wir entsprechend der klinischen Realität eine systemische Gabe des CGRP-Rezeptorinhibitors angewandt haben, kann durch diese Studie nicht mechanistisch zwischen direkten und indirekten Effekten der CGRP-Rezeptorinhibition unterschieden werden. So wurde für  $\alpha$ -CGRP beschrieben, dass es die Sekretion des osteoanabolen glucagonähnlichen Peptid 1 (GLP-1) stimuliert [85], [140]. BIBN/ Olcegepant ist kein zugelassener Wirkstoff zur Therapie der Migräne. Der zugelassene Wirkstoff aus derselben Gruppe Ubrogapant zeigt eine deutlich geringere Affinität zum murinen CLR als zum humanen CLR [141]. Die klinisch zugelassenen monoklonalen Antikörper Erenumab, Galcanezumab und Femanezumab inaktivieren jedoch in Mäusen nicht ausreichend den CGRP-/ CGRP-Rezeptor-Signalweg, da sie speziell für die menschliche Anwendung optimiert wurden [109]. Daher wurde sich für die Verwendung von BIBN entschieden, da es eine ausreichende Affinität für den murinen CGRP-Rezeptor zeigt [109] und sich in vorhergehenden *in vivo* Experimenten in Mäusen effektiv zeigte [132], [142]. Ob die Ergebnisse entsprechend auf den Menschen übertragbar sind, bedarf Klärung durch weiterer humaner Studienkonzepte.

## 5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend konnte anhand von  $\alpha$ -CGRP der Einfluss des Nervensystems auf den Knochenstoffwechsel und die Knochenheilung demonstriert werden, wohingegen sich der Einfluss auf den Metabolismus geringer zeigte. Längerfristiger CGRP-Rezeptorantagonismus in weiblichen Mäusen unter HFD beeinflusste den Glucose- und Fettstoffwechsel nur gering, zeigte jedoch einen deutlich negativen Einfluss auf die Knochenformation. Die genetische Ablation von  $\alpha$ -CGRP verschlechterte die Knochenheilung durch eine Störung der Kallusformation bei weiblichen Mäusen mit der beschriebenen Femurosteotomie [102]. *In vivo* und *in vitro* Studien legen eine direkte osteoanabole Wirkung von  $\alpha$ -CGRP auf die Osteoblasten sowohl in der Knochenhomöostase als auch eine relevante Rolle von  $\alpha$ -CGRP in der Knochenheilung nahe [143]. Während die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zur Klärung weiterer präklinischer Studien bedürfen, haben die beobachteten Effekte auf den Knochen klinische Relevanz. Bei zunehmender längerfristiger Anwendung von CGRP-Rezeptor- und CGRP-Inhibitoren zur Migräneprophylaxe besteht die Notwendigkeit, die Knochengesundheit im Rahmen von klinischen Studien unter der Therapie abzubilden, um die pharmakologische CGRP-Antagonisierung als möglichen Risikofaktor für eine Osteoporose- oder Pseudarthrosenentwicklung zu evaluieren und die klinische Versorgung der betroffenen Patientinnen und Patienten dementsprechend adaptieren zu können.

Darüber hinaus bieten  $\alpha$ -CGRP und sein Rezeptor einen möglichen Angriffspunkt zur Entwicklung agonistischer *targeted therapies* zur Augmentation der Knochenheilung. Neben oben beschriebener, wiederholter topischer Applikation mit kurzer Halbwertszeit an den Kallus, hat die kardiovaskuläre Forschung längerwirksame Agonisten entwickelt [85], [144], die sich präklinisch sicher und blutdrucksenkend zeigten, sodass auch eine systemische Applikation zur Beeinflussung des Knochenstoffwechsels und der Knochenheilung in weiteren

präklinischen Studien untersucht werden könnte. Die Kombination in einem „Scaffold“ von mesenchymalen Stammzellen und Biomaterialien ist eine aktuell verfolgte Strategie zur Modulation der Knochenheilung [145], [146]. Die topische, zeitlich- und räumlich optimierte Freisetzung von  $\alpha$ -CGRP über eine solche Kombination könnte ebenso ein vielversprechender Ansatz zur Modulation der Knochenheilung sein.

## 6. Referenzen

- [1] P. Köhli, J. Appelt, E. Otto, D. Jahn, A. Baranowsky, A. Bahn, C. Erdmann, J. Mühler, M. Mülleider, S. Tsitsilonis, M. Surgery, C. Berlin, & J. Keller, "Effects of CGRP receptor antagonism on glucose and bone metabolism in mice with diet-induced obesity," *Bone*, vol. 143, no. February 2021, p. 115646, 2021, doi: 10.1016/j.bone.2020.115646.
- [2] H. Schell, G. N. Duda, A. Peters, S. Tsitsilonis, K. A. Johnson, & K. Schmidt-Bleek, "The haematoma and its role in bone healing," *J. Exp. Orthop.*, vol. 4, no. 1, p. 5, Dec. 2017, doi: 10.1186/s40634-017-0079-3.
- [3] S. Huang, Z. Li, Y. Liu, D. Gao, X. Zhang, J. Hao, & F. Yang, "Neural Regulation of Bone Remodeling: Identifying Novel Neural Molecules and Pathways Between Brain and Bone," *J. Cell. Physiol.*, Jan. 2018, doi: 10.1002/jcp.26502.
- [4] H. Suominen, "Muscle training for bone strength," *Aging Clinical and Experimental Research*, vol. 18, no. 2. Springer International Publishing, pp. 85–93, Oct. 10, 2006, doi: 10.1007/BF03327422.
- [5] K. Moser, *Das Sprunggelenk von römischen Gladiatoren im Vergleich*. Wien: Universität Wien, 2013.
- [6] L. Vico, M. H. Lafage-Proust, & C. Alexandre, "Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in vivo," in *Bone*, May 1998, vol. 22, no. 5 SUPPL., pp. 95S-100S, doi: 10.1016/S8756-3282(98)00017-9.
- [7] L. Vico, P. Collet, A. Guignandon, M. H. Lafage-Proust, T. Thomas, M. Rehalia, & C. Alexandre, "Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts," *Lancet*, vol. 355, no. 9215, pp. 1607–1611, May 2000, doi: 10.1016/S0140-6736(00)02217-0.
- [8] A. Kramer, A. Gollhofer, G. Armbrecht, D. Felsenberg, & M. Gruber, "How to prevent the detrimental effects of two months of bed-rest on muscle, bone and cardiovascular system: An RCT," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13659-8.
- [9] J. Wolff, *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin: August Hirschwald, 1892.
- [10] D. Wessinghage, "100 Jahre „Transformationsgesetz der Knochen“ von Julius Wolff," in *Osteologie aktuell VII*, Springer Berlin Heidelberg, 1993, pp. 3–12.
- [11] O. M. Pearson & D. E. Lieberman, "The aging of Wolff's ?law?: Ontogeny and responses to mechanical loading in cortical bone," *Am. J. Phys. Anthropol.*, vol. 125, no. S39, pp. 63–99, 2004, doi: 10.1002/ajpa.20155.
- [12] R. Huiskes, "If bone is the answer, then what is the question?," 2000.
- [13] "6.3 Bone Structure - Anatomy and Physiology | OpenStax." <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/6-3-bone-structure> (accessed Oct. 28, 2020).
- [14] J. Keller, *Lokale und systemische Regulations-und Kommunikationsmechanismen im Knochenstoffwechsel*. 2017.
- [15] Dachverband der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V., *Leitlinie Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der OSTEOPOROSE*. 2017.
- [16] C. Schulz, H. H. König, K. Rapp, C. Becker, D. Rothenbacher, & G. Büchele, "Analysis of mortality after hip fracture on patient, hospital, and regional level in Germany,"

*Osteoporos. Int.*, vol. 31, no. 5, pp. 897–904, May 2020, doi: 10.1007/s00198-019-05250-w.

- [17] J. Lorrain, G. Paiement, N. Chevrier, G. Lalumière, G. H. Laflamme, P. Caron, & A. Fillion, “Population demographics and socioeconomic impact of osteoporotic fractures in Canada,” *Menopause*, vol. 10, no. 3. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 228–234, 2003, doi: 10.1097/00042192-200310030-00010.
- [18] S. Märdian, M. Giesecke, F. Haschke, S. Tsitsilonis, B. Wildemann, & P. Schwabe, “Treatment of Tibial Non-Unions – State of the Art and Future Implications,” *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*, vol. 83, no. 6, 2016, Accessed: May 08, 2018. [Online]. Available: [http://www.achot.cz/dwnld/achot\\_2016\\_6\\_367\\_374.pdf](http://www.achot.cz/dwnld/achot_2016_6_367_374.pdf).
- [19] Y.-W. Su, X.-F. Zhou, B. K. Foster, B. L. Grills, J. Xu, & C. J. Xian, “Roles of neurotrophins in skeletal tissue formation and healing,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 3, pp. 2133–2145, Mar. 2018, doi: 10.1002/jcp.25936.
- [20] G. Russow, D. Jahn, J. Appelt, S. Märdian, S. Tsitsilonis, & J. Keller, “Anabolic therapies in osteoporosis and bone regeneration,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 1, 2019, doi: 10.3390/ijms20010083.
- [21] F. Wichlas, S. Tsitsilonis, A. C. Disch, N. P. Haas, C. Hartmann, F. Graef, & P. Schwabe, “Long-term functional outcome and quality of life after successful surgical treatment of tibial nonunions,” *Int. Orthop.*, vol. 39, no. 3, pp. 521–525, Mar. 2015, doi: 10.1007/s00264-014-2629-y.
- [22] C. Meisinger, M. Wildner, J. Stieber, M. Heier, O. Sangha, & A. Döring, “Epidemiologie der extremitätenfrakturen,” *Orthopade*, vol. 31, no. 1, pp. 92–99, 2002, doi: 10.1007/s132-002-8281-x.
- [23] D. J. Hak, D. Fitzpatrick, J. A. Bishop, J. L. Marsh, S. Tilp, R. Schnettler, H. Simpson, & V. Alt, “Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects,” *Injury*, vol. 45, no. SUPPL. 2, 2014, doi: 10.1016/j.injury.2014.04.002.
- [24] M. Rupp, C. Biehl, M. Budak, U. Thormann, C. Heiss, & V. Alt, “Diaphyseal long bone nonunions — types, aetiology, economics, and treatment recommendations,” *International Orthopaedics*, vol. 42, no. 2. Springer Verlag, pp. 247–258, Feb. 01, 2018, doi: 10.1007/s00264-017-3734-5.
- [25] G. M. Calori, E. L. Mazza, S. Mazzola, A. Colombo, F. Giardina, F. Romanò, & M. Colombo, “Non-unions.,” *Clin. Cases Miner. Bone Metab.*, vol. 14, no. 2, pp. 186–188, 2017, doi: 10.11138/ccmbm/2017.14.1.186.
- [26] L. Claes, S. Recknagel, & A. Ignatius, “Fracture healing under healthy and inflammatory conditions.,” *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 8, no. 3, pp. 133–43, 2012, doi: 10.1038/nrrheum.2012.1.
- [27] R. Seemann, F. Graef, A. Garbe, J. Keller, F. Huang, G. Duda, K. Schmidt-Bleek, K.-D. Schaser, & S. Tsitsilonis, “Leptin-deficiency eradicates the positive effect of traumatic brain injury on bone healing: histological analyses in a combined trauma mouse model.,” *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, vol. 18, no. 1, pp. 32–41, Mar. 2018, Accessed: Apr. 05, 2018. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29504576>.
- [28] S. J. Roberts & H. Z. Ke, *Anabolic Strategies to Augment Bone Fracture Healing*, vol. 16, no. 3. 2018.
- [29] A. Idelevich & R. Baron, “Brain to bone: What is the contribution of the brain to skeletal homeostasis?,” *Bone*, May 2018, doi: 10.1016/J.BONE.2018.05.018.
- [30] A. Obri, L. Khirman, G. Karsenty, & F. Oury, “Osteocalcin in the brain: from embryonic

- development to age-related decline in cognition,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 14, no. 3, pp. 174–182, Jan. 2018, doi: 10.1038/nrendo.2017.181.
- [31] G. Karsenty & M. Ferron, “The contribution of bone to whole-organism physiology,” *Nature*, vol. 481, no. 7381. Nature Publishing Group, pp. 314–320, Jan. 19, 2012, doi: 10.1038/nature10763.
- [32] Y. Shi, F. Oury, V. K. Yadav, J. Wess, X. S. Liu, X. E. Guo, M. Murshed, & G. Karsenty, “Signaling through the M3 Muscarinic Receptor Favors Bone Mass Accrual by Decreasing Sympathetic Activity,” *Cell Metab.*, vol. 11, no. 3, pp. 231–238, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.cmet.2010.01.005.
- [33] M. Nagao, T. N. Feinstein, Y. Ezura, T. Hayata, T. Notomi, Y. Saita, R. Hanyu, H. Hemmi, Y. Izu, S. Takeda, K. Wang, S. Rittling, T. Nakamoto, K. Kaneko, H. Kurosawa, G. Karsenty, D. T. Denhardt, J.-P. J.-P. Vilaridaga, & M. Noda, “Sympathetic control of bone mass regulated by osteopontin,” vol. 108, no. 43, pp. 17767–17772, Oct. 2011, doi: 10.1073/pnas.1109402108.
- [34] G. van Niekerk, M. Mitchell, & A.-M. Engelbrecht, “Bone resorption: supporting immunometabolism.,” *Biol. Lett.*, vol. 14, no. 2, p. 20170783, Feb. 2018, doi: 10.1098/rsbl.2017.0783.
- [35] G. S. Baht, L. Vi, & B. A. Alman, “The Role of the Immune Cells in Fracture Healing.,” *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 16, no. 2, pp. 138–145, Apr. 2018, doi: 10.1007/s11914-018-0423-2.
- [36] V. Fischer, M. Haffner-Luntzer, M. Amling, & A. Ignatius, “CALCIUM AND VITAMIN D IN BONE FRACTURE HEALING AND POST-TRAUMATIC BONE TURNOVER,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 35, pp. 365–385, 2018, doi: 10.22203/eCM.v035a25.
- [37] G. Karsenty & E. N. Olson, “Bone and Muscle Endocrine Functions: Unexpected Paradigms of Inter-organ Communication,” *Cell*, vol. 164, no. 6, pp. 1248–1256, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.02.043.
- [38] F. Oury, G. Sumara, O. Sumara, M. Ferron, H. Chang, C. E. Smith, L. Hermo, S. Suarez, B. L. Roth, P. Ducy, & G. Karsenty, “Endocrine regulation of male fertility by the skeleton,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 796–809, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.004.Endocrine.
- [39] A. W. Fischer, B. Cannon, & J. Nedergaard, “Leptin: Is It Thermogenic?,” *Endocr. Rev.*, vol. 41, no. 2, pp. 232–260, Apr. 2020, doi: 10.1210/endrev/bnz016.
- [40] A. Nakhuda, A. R. Josse, V. Gburcik, H. Crossland, F. Raymond, S. Metairon, L. Good, P. J. Atherton, S. M. Phillips, & J. A. Timmons, “Biomarkers of browning of white adipose tissue and their regulation during exercise- and diet-induced weight loss.,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 104, no. 3, pp. 557–65, Sep. 2016, doi: 10.3945/ajcn.116.132563.
- [41] J. W. Lewis, J. R. Edwards, A. J. Naylor, & H. M. McGettrick, “Adiponectin signalling in bone homeostasis, with age and in disease,” *Bone Research*, vol. 9, no. 1. Springer Nature, pp. 1–11, Dec. 01, 2021, doi: 10.1038/s41413-020-00122-0.
- [42] A. Klockars, A. S. Levine, & P. K. Olszewski, “Hypothalamic Integration of the Endocrine Signaling Related to Food Intake,” in *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, vol. 43, Springer, 2019, pp. 239–269.
- [43] W. G. Lima, G. H. Marques-Oliveira, T. M. da Silva, & V. E. Chaves, “Role of calcitonin gene-related peptide in energy metabolism,” *Endocrine*, vol. 58, no. 1. Humana Press Inc., pp. 3–13, Oct. 01, 2017, doi: 10.1007/s12020-017-1404-4.
- [44] J. Wei & G. Karsenty, “An Overview of the Metabolic Functions of Osteocalcin,” *Curr.*

- Osteoporos. Rep.*, vol. 13, no. 3, pp. 180–185, 2015, doi: 10.1007/s11914-015-0267-y.
- [45] G. Karsenty & F. Oury, “Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 382, pp. 521–526, 2014, doi: 10.1016/j.mce.2013.10.008.
- [46] T. A. P. Fernandes, L. M. L. Gonçalves, & J. A. A. Brito, “Relationships between Bone Turnover and Energy Metabolism,” *Journal of Diabetes Research*, vol. 2017. Hindawi Limited, 2017, doi: 10.1155/2017/9021314.
- [47] P. Ducy, “Bone Regulation of Insulin Secretion and Glucose Homeostasis,” *Endocrinology*, vol. 161, no. 10, Oct. 2020, doi: 10.1210/endo/bqaa149.
- [48] J. S. Wang, C. M. Mazur, & M. N. Wein, “Sclerostin and Osteocalcin: Candidate Bone-Produced Hormones,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 12, p. 55, Mar. 2021, doi: 10.3389/fendo.2021.584147.
- [49] E. Otto, P.-R. Knapstein, D. Jahn, J. Appelt, K.-H. Frosch, S. Tsitsilonis, & J. Keller, “Crosstalk of Brain and Bone—Clinical Observations and Their Molecular Bases,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 14, p. 4946, Jul. 2020, doi: 10.3390/ijms21144946.
- [50] N. Abeynayake, A. Arthur, & S. Gronthos, “Crosstalk between skeletal and neural tissues is critical for skeletal health,” *Bone*. Elsevier Inc., p. 115645, Sep. 16, 2020, doi: 10.1016/j.bone.2020.115645.
- [51] J. M. Brazill, A. T. Beeve, C. S. Craft, J. J. Ivanusic, & E. L. Scheller, “Nerves in Bone: Evolving Concepts in Pain and Anabolism,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 34, no. 8, pp. 1393–1406, Aug. 2019, doi: 10.1002/jbmr.3822.
- [52] T. Shimazu, “Central nervous system regulation of liver and adipose tissue metabolism,” *Diabetologia*, vol. 20 Suppl, pp. 343–56, Mar. 1981, Accessed: Apr. 05, 2018. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7014330>.
- [53] E. L. Moore & C. A. Salvatore, “Targeting a family B GPCR/RAMP receptor complex: CGRP receptor antagonists and migraine,” *British Journal of Pharmacology*, vol. 166, no. 1. Br J Pharmacol, pp. 66–78, May 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01633.x.
- [54] S. J. Tepper, “History and Review of anti-Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Therapies: From Translational Research to Treatment,” *Headache J. Head Face Pain*, vol. 58, pp. 238–275, Nov. 2018, doi: 10.1111/head.13379.
- [55] P. K. Muddhry, M. A. Ghatki, R. A. Spokks, P. M. Jonhs, A. M. Pierson, Q. A. Hamid, S. Kanse, S. G. Amara, J. M. Burrik, S. Legon, J. M. Polak, & S. R. Bloom, “Differential expression of  $\alpha$ -CGRP and  $\beta$ -CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat,” *Neuroscience*, vol. 25, no. 1, pp. 195–205, 1988, doi: 10.1016/0306-4522(88)90018-8.
- [56] C. Sternini, “Enteric and Visceral Afferent CGRP Neurons: Targets of Innervation and Differential Expression Patterns,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 657, no. 1, pp. 170–186, Jun. 1992, doi: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb22766.x.
- [57] P. J. Goadsby, L. Edvinsson, & R. Ekman, “Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system,” *Ann. Neurol.*, vol. 23, no. 2, pp. 193–196, Feb. 1988, doi: 10.1002/ana.410230214.
- [58] M. G. Buzzi, W. B. Carter, T. Shimizu, H. Heath, & M. A. Moskowitz, “Dihydroergotamine and sumatriptan attenuate levels of CGRP in plasma in rat superior sagittal sinus during electrical stimulation of the trigeminal ganglion,” *Neuropharmacology*, vol. 30, no. 11, pp. 1193–1200, 1991, doi: 10.1016/0028-3908(91)90165-8.

- [59] K. J. Escott, D. T. Beattie, H. E. Connor, & S. D. Brain, "Trigeminal ganglion stimulation increases facial skin blood flow in the rat: a major role for calcitonin gene-related peptide," *Brain Res.*, vol. 669, no. 1, pp. 93–99, Jan. 1995, doi: 10.1016/0006-8993(94)01247-F.
- [60] N. MacDonald, L. Butters, D. O'Shaughnessy, A. Riddell, & P. Rubin, "A comparison of the effects of human alpha calcitonin gene-related peptide and glyceryl trinitrate on regional blood velocity in man.," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 28, no. 3, pp. 257–261, Sep. 1989, doi: 10.1111/j.1365-2125.1989.tb05424.x.
- [61] H.-C. Diener & E. Arne May, "Prophylaxe der Migräne mit monoklonalen Antikörpern gegen CGRP oder den CGRP-Rezeptor, Ergänzung der S1-Leitlinie Therapie der Migräneattacke und Prophylaxe der Migräne," in *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.*, Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN), 2019.
- [62] D. B. Finlay, S. B. Duffull, & M. Glass, "100 years of modelling ligand-receptor binding and response: a focus on GPCRs," *Br. J. Pharmacol.*, p. bph.14988, Jan. 2020, doi: 10.1111/bph.14988.
- [63] M. Deen, E. Correnti, K. Kamm, T. Kelderman, L. Papetti, E. Rubio-Beltrán, S. Vigneri, L. Edvinsson, & A. Maassen Van Den Brink, "Blocking CGRP in migraine patients – a review of pros and cons," *Journal of Headache and Pain*, vol. 18, no. 1. Springer-Verlag Italia s.r.l., p. 96, Dec. 01, 2017, doi: 10.1186/s10194-017-0807-1.
- [64] J. Keller, *Die Rolle von Calcitonin und seines Rezeptors im Knochenstoffwechsel-Untersuchungen an gentechnisch modifizierten Mausmodellen.* Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky, 2011.
- [65] N. M. Schuster & A. M. Rapoport, "New strategies for the treatment and prevention of primary headache disorders," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 12, no. 11, pp. 635–650, Nov. 2016, doi: 10.1038/nrneurol.2016.143.
- [66] F. A. Russell, R. King, S. J. Smillie, X. Kodji, & S. D. Brain, "Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology," *Physiological reviews*, vol. 94, no. 4. American Physiological Society, pp. 1099–1142, Oct. 01, 2014, doi: 10.1152/physrev.00034.2013.
- [67] J. Barwell, J. J. Gingell, H. A. Watkins, J. K. Archbold, D. R. Poyner, & D. L. Hay, "Calcitonin and calcitonin receptor-like receptors: common themes with family B GPCRs?," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 166, no. 1, pp. 51–65, May 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01525.x.
- [68] D. L. Hay, M. L. Garelja, D. R. Poyner, & C. S. Walker, "Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 175, no. 1, pp. 3–17, Jan. 2018, doi: 10.1111/bph.14075.
- [69] J. Olesen, H.-C. Diener, I. W. Husstedt, P. J. Goadsby, D. Hall, U. Meier, S. Pollentier, & L. M. Lesko, "Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Antagonist BIBN 4096 BS for the Acute Treatment of Migraine," *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 11, pp. 1104–1110, Mar. 2004, doi: 10.1056/nejmoa030505.
- [70] A. Charles & P. Pozo-Rosich, "Targeting calcitonin gene-related peptide: a new era in migraine therapy," *The Lancet*, vol. 394, no. 10210. Lancet Publishing Group, pp. 1765–1774, Nov. 09, 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)32504-8.
- [71] R. B. Lipton, D. W. Dodick, J. Ailani, K. Lu, M. Finnegan, A. Szegedi, & J. M. Trugman, "Effect of ubrogepant vs placebo on pain and the most bothersome associated symptom in the acute treatment of migraine: The achieve ii randomized clinical trial," *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 322, no. 19, pp. 1887–1898, Nov. 2019, doi: 10.1001/jama.2019.16711.



- [72] L. J. Scott, "Ubrogapant: First Approval," *Drugs*, vol. 80, Feb. 2020, doi: 10.1007/s40265-020-01264-5.
- [73] C. E. J. Ceriani, D. A. Wilhour, & S. D. Silberstein, "Novel Medications for the Treatment of Migraine," *Headache J. Head Face Pain*, vol. 59, no. 9, pp. 1597–1608, Oct. 2019, doi: 10.1111/head.13661.
- [74] R. Agosti, "Migraine Burden of Disease: From the Patient's Experience to a Socio-Economic View," *Headache J. Head Face Pain*, vol. 58, pp. 17–32, May 2018, doi: 10.1111/head.13301.
- [75] H.-C. Diener, C. Gaul, & P. Kropp, *Therapie der Migräne- attacke und Prophylaxe der Migräne, S1-Leitlinie*. Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN), 2018.
- [76] Deutsche Adipositas-Gesellschaft (DAG) e.V, *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“*. 2014.
- [77] E. Fuentes, F. Fuentes, G. Vilahur, L. Badimon, & I. Palomo, "Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome.," *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, p. 136584, Jun. 2013, doi: 10.1155/2013/136584.
- [78] P. M. J. Zelissen, H. P. F. Koppeschaar, C. J. M. Lips, & W. H. L. Hackeng, "Calcitonin gene-related peptide in human obesity," *Peptides*, vol. 12, no. 4, pp. 861–863, Jul. 1991, doi: 10.1016/0196-9781(91)90147-H.
- [79] Z. Zhang, F. Gong, & G. X. Lu, "Plasma level of calcitonin gene-related peptide in patients with polycystic ovary syndrome and its relationship to hormonal and metabolic parameters," *Peptides*, vol. 34, no. 2, pp. 343–348, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.peptides.2012.01.018.
- [80] A. Bartelt, A. Jeschke, B. Müller, I. Gaziano, M. Morales, T. Yorgan, T. Heckt, M. Heine, R. F. Gagel, R. B. Emeson, M. Amling, A. Niemeier, J. Heeren, T. Schinke, & J. Keller, "Differential effects of Calca-derived peptides in male mice with diet-induced obesity," *PLoS One*, vol. 12, no. 6, p. e0180547, Jun. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0180547.
- [81] K. Makwana, H. Chodavarapu, N. Morones, J. Chi, W. Barr, E. Novinbakht, Y. Wang, P. T. Nguyen, P. Jovanovic, P. Cohen, & C. E. Riera, "Sensory neurons expressing calcitonin gene-related peptide  $\alpha$  regulate adaptive thermogenesis and diet-induced obesity," *Mol. Metab.*, vol. 45, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.molmet.2021.101161.
- [82] W. Cheng, I. Gonzalez, W. Pan, A. H. Tsang, J. Adams, E. Ndoka, D. Gordian, B. Khoury, K. Roelofs, S. S. Evers, A. MacKinnon, S. Wu, H. Frikke-Schmidt, J. N. Flak, J. L. Trevaskis, C. J. Rhodes, S. ichiro Fukada, R. J. Seeley, D. A. Sandoval, D. P. Olson, C. Blouet, & M. G. Myers, "Calcitonin Receptor Neurons in the Mouse Nucleus Tractus Solitarius Control Energy Balance via the Non-aversive Suppression of Feeding," *Cell Metab.*, vol. 31, no. 2, pp. 301-312.e5, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.cmet.2019.12.012.
- [83] S. A. Pendharkar, M. Walia, M. Drury, & M. S. Petrov, "Calcitonin gene-related peptide: Neuroendocrine communication between the pancreas, gut, and brain in regulation of blood glucose," *Ann. Transl. Med.*, vol. 5, no. 21, Nov. 2017, doi: 10.21037/atm.2017.08.27.
- [84] T. T. Liu, A. Kamiyoshi, T. Sakurai, Y. Ichikawa-Shindo, H. Kawate, L. Yang, M. Tanaka, X. Xian, A. Imai, L. Zhai, K. Hirabayashi, K. Dai, K. Tanimura, T. T. Liu, N. Cui, K. Igarashi, A. Yamauchi, & T. Shindo, "Endogenous Calcitonin Gene-Related Peptide Regulates Lipid Metabolism and Energy Homeostasis in Male Mice," *Endocrinology*, vol. 158, no. 5, pp. 1194–1206, May 2017, doi: 10.1210/en.2016-1510.

- [85] C. Nilsson, T. K. Hansen, C. Rosenquist, B. Hartmann, J. T. Kodra, J. F. Lau, T. R. Clausen, K. Raun, & A. Sams, "Long acting analogue of the calcitonin gene-related peptide induces positive metabolic effects and secretion of the glucagon-like peptide-1," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 773, pp. 24–31, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.ejphar.2016.01.003.
- [86] K. Irie, F. Hara-Irie, H. Ozawa, & T. Yajima, "Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve fibers in bone tissue and their involvement in bone remodeling," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 58, no. 2, pp. 85–90, Jul. 2002, doi: 10.1002/jemt.10122.
- [87] E. L. Hill & R. Elde, "Distribution of CGRP-, VIP-, D $\beta$ H-, SP-, and NPY-immunoreactive nerves in the periosteum of the rat," *Cell Tissue Res.*, vol. 264, no. 3, pp. 469–480, Jun. 1991, doi: 10.1007/BF00319037.
- [88] T. Schinke, S. Liese, M. Priemel, M. Haberland, A. F. Schilling, P. Catala-Lehnen, D. Blicharski, J. M. Rueger, R. F. Gagel, R. B. Emeson, & M. Amling, "Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 19, no. 12, pp. 2049–2056, Dec. 2004, doi: 10.1359/JBMR.040915.
- [89] A. K. Huebner, J. Keller, P. Catala-Lehnen, S. Perkovic, T. Streichert, R. B. Emeson, M. Amling, & T. Schinke, "The role of calcitonin and  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide in bone formation," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 473, no. 2, pp. 210–217, May 2008, doi: 10.1016/J.ABB.2008.02.013.
- [90] R. Zhou, Z. Yuan, J. Liiu, & J. Liu, "Calcitonin gene-related peptide promotes the expression of osteoblastic genes and activates the WNT signal transduction pathway in bone marrow stromal stem cells," *Mol. Med. Rep.*, vol. 13, no. 6, pp. 4689–4696, Jun. 2016, doi: 10.3892/mmr.2016.5117.
- [91] G. Tian, G. Zhang, & Y. H. Tan, "Calcitonin gene-related peptide stimulates BMP-2 expression and the differentiation of human osteoblast-like cells in vitro," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 34, no. 11, pp. 1467–1474, Nov. 2013, doi: 10.1038/aps.2013.41.
- [92] E. Mrak, F. Guidobono, G. Moro, G. Frascini, A. Rubinacci, & I. Villa, "Calcitonin gene-related peptide (CGRP) inhibits apoptosis in human osteoblasts by  $\beta$ -catenin stabilization," *J. Cell. Physiol.*, vol. 225, no. 3, pp. 701–708, Dec. 2010, doi: 10.1002/jcp.22266.
- [93] R. Ballica, K. Valentijn, A. Khachatryan, S. Guerder, S. Kapadia, C. Gundberg, J. Gilligan, R. A. Flavell, & A. Vignery, "Targeted expression of calcitonin gene-related peptide to osteoblasts increases bone density in mice," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 14, no. 7, pp. 1067–1074, 1999, doi: 10.1359/jbmr.1999.14.7.1067.
- [94] J. Xu, J. Wang, X. Chen, Y. Li, J. Mi, & L. Qin, "The Effects of Calcitonin Gene-Related Peptide on Bone Homeostasis and Regeneration," *Current Osteoporosis Reports*. Springer, pp. 1–12, Oct. 08, 2020, doi: 10.1007/s11914-020-00624-0.
- [95] Y. Zhang, J. Xu, Y. C. Ruan, M. K. Yu, M. O’Laughlin, H. Wise, D. Chen, L. Tian, D. Shi, J. Wang, S. Chen, J. Q. Feng, D. H. K. Chow, X. Xie, L. Zheng, L. Huang, S. Huang, K. Leung, N. Lu, L. Zhao, H. Li, D. Zhao, X. Guo, K. Chan, F. Witte, H. C. Chan, Y. Zheng, & L. Qin, "Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats," *Nat. Med.*, vol. 22, no. 10, pp. 1160–1169, Oct. 2016, doi: 10.1038/nm.4162.
- [96] Y. Song, L. Bi, Z. Zhang, Z. Huang, W. Hou, X. Lu, P. Sun, & Y. Han, *Increased levels of calcitonin gene-related peptide in serum accelerate fracture healing following traumatic brain injury*, vol. 5, no. 2. D.A. Spandidos, 2012.
- [97] P. J. Apel, D. Crane, C. N. Northam, M. Callahan, T. L. Smith, & R. D. Teasdale,

- “Effect of selective sensory denervation on fracture-healing: An experimental study of rats,” *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A*, vol. 91, no. 12, pp. 2886–2895, Dec. 2009, doi: 10.2106/JBJS.H.01878.
- [98] J. C. Ray, M. Kapoor, R. J. Stark, S.-J. Wang, L. Bendtsen, M. Matharu, & E. J. Hutton, “Calcitonin gene related peptide in migraine: current therapeutics, future implications and potential off-target effects,” *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, p. jnnp-2020-324674, Jan. 2021, doi: 10.1136/jnnp-2020-324674.
- [99] P. G. Mathew, D. Krivitski, & R. Sharon, “Erenumab-Induced Severe Nausea Leading to Smoking Cessation: A Retrospective Case Series,” *Headache*, vol. 60, no. 10, pp. 2563–2569, Nov. 2020, doi: 10.1111/head.13979.
- [100] A. Alex, C. Vaughn, & M. Rayhill, “Safety and Tolerability of 3 CGRP Monoclonal Antibodies in Practice: A Retrospective Cohort Study,” *Headache*, vol. 60, no. 10, pp. 2454–2462, Nov. 2020, doi: 10.1111/head.13956.
- [101] H. He, J. Chai, S. Zhang, L. Ding, P. Yan, W. Du, & Z. Yang, “CGRP may regulate bone metabolism through stimulating osteoblast differentiation and inhibiting osteoclast formation,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 13, no. 5, pp. 3977–3984, May 2016, doi: 10.3892/mmr.2016.5023.
- [102] J. Appelt, A. Baranowsky, D. Jahn, T. Yorgan, P. Köhli, E. Otto, S. K. Farahani, F. Graef, M. Fuchs, A. Herrera, M. Amling, T. Schinke, K. H. Frosch, G. N. Duda, S. Tsitsilonis, & J. Keller, “The neuropeptide calcitonin gene-related peptide alpha is essential for bone healing,” *EBioMedicine*, vol. 59, p. 102970, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102970.
- [103] D. B. Kimmel, “Animal Models in Bone Research,” Springer, Cham, 2017, pp. 129–171.
- [104] T. A. Lutz & S. C. Woods, “Overview of animal models of obesity,” *Curr. Protoc. Pharmacol.*, vol. CHAPTER, no. SUPPL.58, p. Unit5.61, Sep. 2012, doi: 10.1002/0471141755.ph0561s58.
- [105] A. Schafrum Macedo, C. Cezaretti Feitosa, F. Yoiti Kitamura Kawamoto, P. Vinicius Tertuliano Marinho, Í. dos Santos Dal-Bó, B. Fiuza Monteiro, L. Prado, T. Bregadioli, G. Antonio Covino Diamante, & C. Ricardo Auada Ferrigno, “Animal modeling in bone research—Should we follow the White Rabbit?,” *Anim. Model. Exp. Med.*, vol. 2, no. 3, pp. 162–168, Sep. 2019, doi: 10.1002/ame2.12083.
- [106] R. C. Hubrecht & E. Carter, “The 3Rs and humane experimental technique: Implementing change,” *Animals*, vol. 9, no. 10, Oct. 2019, doi: 10.3390/ani9100754.
- [107] GV-SOLAS, “Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren,” Jun. 2010. [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/ana\\_schmerzen.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/ana_schmerzen.pdf) (accessed Feb. 16, 2020).
- [108] W. M. S. Russell & R. L. Burch, “The Principles of Humane Experimental Technique,” *Med. J. Aust.*, vol. 1, no. 13, pp. 500–500, 1960, doi: 10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x.
- [109] D. L. Hay & C. S. Walker, “CGRP and its receptors,” *Headache J. Head Face Pain*, vol. 57, no. 4, pp. 625–636, Apr. 2017, doi: 10.1111/head.13064.
- [110] A. Recober & A. F. Russo, “Drug profile: Olcegepant, a non-peptide CGRP1 antagonist for migraine treatment,” *IDrugs*, vol. 10, no. 8, pp. 566–574, 2007, [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/6174500>.
- [111] T. L. Jensen, M. K. Kiersgaard, D. B. Sørensen, & L. F. Mikkelsen, “Fasting of mice: A review,” *Laboratory Animals*, vol. 47, no. 4, Lab Anim, pp. 225–240, 2013, doi:

10.1177/0023677213501659.

- [112] R. J. Locher, T. Lünemann, A. Garbe, K.-D. Schaser, K. Schmidt-Bleek, G. Duda, & S. Tsitsilonis, "Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model.," *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, vol. 15, no. 4, pp. 309–15, Dec. 2015, Accessed: May 07, 2018. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26636276>.
- [113] K. J. Livak & T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [114] M. W. Pfaffl, A. Tichopad, C. Prgomet, & T. P. Neuvians, "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations.," *Biotechnol. Lett.*, vol. 26, no. 6, pp. 509–15, Mar. 2004, Accessed: May 14, 2018. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15127793>.
- [115] E. Otto, P. Köhli, J. Appelt, S. Menzel, M. Fuchs, A. Bahn, F. Graef, G. N. Duda, S. Tsitsilonis, J. Keller, & D. Jahn, "Validation of reference genes for expression analysis in a murine trauma model combining traumatic brain injury and femoral fracture," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-71895-x.
- [116] M. Hahn, M. Vogel, & G. Delling, "Undecalcified preparation of bone tissue: Report of technical experience and development of new methods," *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, vol. 418, no. 1, pp. 1–7, Jan. 1991, doi: 10.1007/BF01600238.
- [117] J. Luther, T. A. Yorgan, T. Rolvien, L. Ulsamer, T. Koehne, N. Liao, D. Keller, N. Vollersen, S. Teufel, M. Neven, S. Peters, M. Schweizer, A. Trumpp, S. Rosigkeit, E. Bockamp, S. Mundlos, U. Kornak, R. Oheim, M. Amling, T. Schinke, & J. P. David, "Wnt1 is an Lrp5-independent bone-anabolic Wnt ligand," *Sci. Transl. Med.*, vol. 10, no. 466, Nov. 2018, doi: 10.1126/scitranslmed.aau7137.
- [118] S. N. Meloan & H. Puchtler, "Chemical Mechanisms of Staining Methods: Von Kossa's Technique: What von Kossa Really Wrote and a Modified Reaction for Selective Demonstration of Inorganic Phosphates," *J. Histotechnol.*, vol. 8, no. 1, pp. 11–13, 1985, doi: 10.1179/his.1985.8.1.11.
- [119] J. Yang, X. Bi, & M. Li, "Osteoclast differentiation assay," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1882, Humana Press Inc., 2019, pp. 143–148.
- [120] D. W. Dempster, J. E. Compston, M. K. Drezner, F. H. Glorieux, J. A. Kanis, H. Malluche, P. J. Meunier, S. M. Ott, R. R. Recker, & A. M. Parfitt, "Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 2–17, Jan. 2013, doi: 10.1002/jbmr.1805.
- [121] P. Liu, S. Lee, J. Knoll, A. Rauch, S. Ostermay, J. Luther, N. Malkusch, U. H. Lerner, M. M. Zaiss, M. Neven, R. Wittig, M. Rauner, J. P. David, P. Bertolino, C. X. Zhang, & J. P. Tuckermann, "Loss of menin in osteoblast lineage affects osteocyte-osteoclast crosstalk causing osteoporosis," *Cell Death Differ.*, vol. 24, no. 4, pp. 672–682, Apr. 2017, doi: 10.1038/cdd.2016.165.
- [122] Ö. Uluçkan, M. Jimenez, S. Karbach, A. Jeschke, O. Graña, J. Keller, B. Busse, A. L. Croxford, S. Finzel, M. Koenders, W. Van Den Berg, T. Schinke, M. Amling, A. Waisman, G. Schett, & E. F. Wagner, "Chronic skin inflammation leads to bone loss by IL-17-mediated inhibition of Wnt signaling in osteoblasts," *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 330, pp. 330ra37–330ra37, Mar. 2016, doi: 10.1126/scitranslmed.aad8996.

- [123] H. J. Motulsky & R. E. Brown, "Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - A new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate," *BMC Bioinformatics*, vol. 7, Mar. 2006, doi: 10.1186/1471-2105-7-123.
- [124] E. Erdfelder, F. FAul, A. Buchner, & A. G. Lang, "Statistical power analyses using G\*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses," *Behav. Res. Methods*, vol. 41, no. 4, pp. 1149–1160, 2009, doi: 10.3758/BRM.41.4.1149.
- [125] Ahrén B, "Effects of galanin and calcitonin gene-related peptide on insulin and glucagon secretion in man - PubMed," *Acta Endocrinol* , vol. 123, no. 6, pp. 591–7, Dec. 1990.
- [126] C. S. Walker, X. Li, L. Whiting, S. Glyn-Jones, S. Zhang, A. J. Hickey, M. A. Sewell, K. Ruggiero, A. R. J. Phillips, E. W. Kraegen, D. L. Hay, G. J. S. Cooper, & K. M. Loomes, "Mice Lacking the Neuropeptide  $\alpha$ -Calcitonin Gene-Related Peptide Are Protected Against Diet-Induced Obesity," *Endocrinology*, vol. 151, no. 9, pp. 4257–4269, Sep. 2010, doi: 10.1210/en.2010-0284.
- [127] D. Sanford, L. Luong, A. Gabalski, S. Oh, J. P. Vu, J. R. Pisegna, & P. Germano, "An Intraperitoneal Treatment with Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Regulates Appetite, Energy Intake/Expenditure, and Metabolism," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 67, no. 1, pp. 28–37, Jan. 2019, doi: 10.1007/s12031-018-1202-3.
- [128] M. Pettersson & B. Ahrén, "Insulin and glucagon secretion in rats: effects of calcitonin gene-related peptide," *Regul. Pept.*, vol. 23, no. 1, pp. 37–50, 1988, doi: 10.1016/0167-0115(88)90419-3.
- [129] K. Timper, J. Grisouard, T. Radimerski, K. Dembinski, R. Peterli, A. Häring, D. M. Frey, H. Zulewski, U. Keller, B. Müller, & M. Christ-Crain, "Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) Induces Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)-I and Procalcitonin (Pro-CT) Production in Human Adipocytes," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, no. 2, pp. E297–E303, Feb. 2011, doi: 10.1210/jc.2010-1324.
- [130] G. Yao, T. M. Yu, X. M. Han, X. J. Mao, & B. Li, "Therapeutic effects and safety of olcegepant and telcagepant for migraine: A meta-analysis," *Neural Regen. Res.*, vol. 8, no. 10, pp. 938–947, Apr. 2013, doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.10.009.
- [131] A. Nair & S. Jacob, "A simple practice guide for dose conversion between animals and human," *J. Basic Clin. Pharm.*, vol. 7, no. 2, p. 27, 2016, doi: 10.4103/0976-0105.177703.
- [132] A. Baranowsky, J. Appelt, C. Kleber, T. Lange, P. Ludewig, D. Jahn, P. Pandey, D. Keller, T. Rose, D. Schetler, S. Braumüller, M. Huber-Lang, S. Tsitsilonis, T. Yorgan, K.-H. Frosch, M. Amling, T. Schinke, & J. Keller, "Procalcitonin Exerts a Mediator Role in Septic Shock Through the Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor," *Crit. Care Med.*, vol. 49, no. 1, Nov. 2021, doi: 10.1097/ccm.0000000000004731.
- [133] S. K. Wong, K.-Y. Chin, F. H. Suhaimi, A. Fairus, & S. Ima-Nirwana, "Animal models of metabolic syndrome: a review.," *Nutr. Metab. (Lond)*., vol. 13, p. 65, 2016, doi: 10.1186/s12986-016-0123-9.
- [134] J. Halloran, A. Lalande, M. Zang, H. Chodavarapu, & C. E. Riera, "Monoclonal therapy against calcitonin gene-related peptide lowers hyperglycemia and adiposity in type 2 diabetes mouse models," *Metab. Open*, vol. 8, p. 100060, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.metop.2020.100060.
- [135] L. Wang, X. Shi, R. Zhao, B. P. Halloran, D. J. Clark, C. R. Jacobs, & W. S. Kingery, "Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF- $\kappa$ B activation, osteoclastogenesis and bone resorption," *Bone*, vol. 46, no. 5, pp. 1369–1379, May 2010, doi: 10.1016/j.bone.2009.11.029.

- [136] R. Verheggen, K. Wojtas, M. Webel, S. Hoffmann, & A. J. Kaumann, "BIBN4096BS and CGRP8-37 antagonize the relaxant effects of  $\alpha$ -CGRP more than those of  $\beta$ -CGRP in human extracranial arteries," *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 371, no. 5, pp. 383–392, Aug. 2005, doi: 10.1007/s00210-005-1064-4.
- [137] S. Tsitsilonis, R. Seemann, M. Misch, F. Wichlas, N. P. Haas, K. Schmidt-Bleek, C. Kleber, & K. D. Schaser, "The effect of traumatic brain injury on bone healing: An experimental study in a novel in vivo animal model," *Injury*, vol. 46, no. 4, pp. 661–665, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.injury.2015.01.044.
- [138] T. Niedermair, R. H. Straub, C. Brochhausen, & S. Grässel, "Impact of the sensory and sympathetic nervous system on fracture healing in ovariectomized mice," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 2, Jan. 2020, doi: 10.3390/ijms21020405.
- [139] J. Mi, J. Xu, H. Yao, X. Li, W. Tong, Y. Li, B. Dai, X. He, D. H. K. Chow, G. Li, K. O. Lui, J. Zhao, & L. Qin, "Calcitonin Gene-Related Peptide Enhances Distraction Osteogenesis by Increasing Angiogenesis," *Tissue Eng. Part A*, p. ten.tea.2020.0009, Nov. 2020, doi: 10.1089/ten.tea.2020.0009.
- [140] G. Luo, H. Liu, & H. Lu, "Glucagon-like peptide-1(GLP-1) receptor agonists: potential to reduce fracture risk in diabetic patients?," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 81, no. 1, pp. 78–88, Jan. 2016, doi: 10.1111/bcp.12777.
- [141] E. Moore, M. E. Fraley, I. M. Bell, C. S. Burgey, R. B. White, C.-C. Li, C. P. Regan, A. Danziger, M. Stranieri Michener, E. Hostetler, P. Banerjee, & C. Salvatore, "Characterization of Ubrogepant: A Potent and Selective Antagonist of the Human Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor\*," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, p. jpet.119.261065, Jan. 2020, doi: 10.1124/jpet.119.261065.
- [142] A. F. Russo, A. Kuburas, E. A. Kaiser, A. C. Raddant, & A. Recober, "A potential preclinical migraine model: CGRP-sensitized mice," *Molecular and Cellular Pharmacology*, vol. 1, no. 5. NIH Public Access, pp. 264–270, 2009, doi: 10.4255/mcpharmacol.09.32.
- [143] M. A. Kacena & F. A. White, "No pain, no gain: Will migraine therapies increase bone loss and impair fracture healing?," *EBioMedicine*, vol. 60. Elsevier B.V., Oct. 01, 2020, doi: 10.1016/j.ebiom.2020.103025.
- [144] A. A. Aubdool, P. Thakore, F. Argunhan, S. J. Smillie, M. Schnelle, S. Srivastava, K. M. Alawi, E. Wilde, J. Mitchell, K. Farrell-Dillon, D. A. Richards, G. Maltese, R. C. Siow, M. Nandi, J. E. Clark, A. M. Shah, A. Sams, & S. D. Brain, "A novel  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide analogue protects against end-organ damage in experimental hypertension, cardiac hypertrophy, and heart failure," *Circulation*, vol. 136, no. 4, pp. 367–383, Jul. 2017, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028388.
- [145] T. Winkler, F. A. Sass, G. N. Duda, & K. Schmidt-Bleek, "A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge," *Bone and Joint Research*, vol. 7, no. 3. British Editorial Society of Bone and Joint Surgery, pp. 232–243, Mar. 01, 2018, doi: 10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1.
- [146] M. Brennan, P. Layrolle, & D. J. Mooney, "Biomaterials Functionalized with MSC Secreted Extracellular Vesicles and Soluble Factors for Tissue Regeneration," *Advanced Functional Materials*, vol. 30, no. 37. Wiley-VCH Verlag, Sep. 01, 2020, doi: 10.1002/adfm.201909125.

## 7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Paul Köhli, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des Neuropeptids Calcitonin Gene-Related Peptide alpha in der molekularen Interaktion zwischen Gehirn, Fett- und Knochenstoffwechsel“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 8. Ausführliche Anteilserklärung an den ausgewählten Publikationen im Rahmen der Promotionsverfahren zum Dr. med.

### Publikation 1:

Autoren: Köhli P, Appelt J, Otto E, Jahn D, Baranowsky A, Bahn A, Erdmann C, Müchler J, Mülleder M, Tsitsilonis S, Keller J.

Titel: Effects of CGRP receptor antagonism on glucose and bone metabolism in mice with diet-induced obesity.

Zeitschrift: Bone

Erscheinungsdatum: 14. September 2020

doi: 10.1016/j.bone.2020.115646

IF 2019: 4,147

Beitrag im Einzelnen:

Planungsphase:

- Planung des Experimentellen Designs gemeinsam mit Johannes Keller (JK)
- Beantragung des Tierversuchs beim LaGeSo, supervidiert durch JK
- Zeitliche und personelle Planung supervidiert durch JK und Serafim Tsitsilonis (ST)
- Organisation der Versuchsmaterialien (Futter, Pellets, *in vivo* Messgeräte...)

Durchführungsphase:

- Durchführung der *in vivo* Experimente mit Unterstützung der Arbeitsgruppe in Berlin (Jessica Appelt, Ellen Otto, Denise Jahn, Alina Bahn, ST, JK).
- Assistenz der Tier-OPs, Anästhesie, postoperative Visiten
- Durchführung aller oralen Glukosetoleranztests
- Durchführung der Probenaufarbeitung, RNA-Extraktion, diverser Messungen
- Durchführung vieler der quantitativen PCRs (teils auch durch Ellen Otto)
- Koordination, Probenorganisation und Kontakt mit den Kooperationspartnern:
  - Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam (DIfE) (Serumlipidanalysen), Prof. Dr. Tim Schulz, Frau Susanne Richter.
  - Institut für Biochemie, Core-Facility Proteomics (Dr. Michael Mülleder (MM), Frau Judith Müchler);
  - Experimentelle Unfallchirurgie Uniklinikum Hamburg Eppendorf (Dr. Anke Baranowsky, Frau Cordula Erdmann, Prof. Dr. Dr. Johannes Keller)

Analysephase:

- Aufarbeitung und statistische Auswertung aller Daten (ausschließlich der Gasphasen-Massenspektroskopie, diese durch MM) supervidiert durch JK und ST
- Erstellung aller Figures, Graphiken und Tabellen

Publikationsphase:

- Erstellung des Manuscripts supervidiert durch JK
- Planung und Organisation der durch die Revisions zusätzlich notwendigen Experimente supervidiert durch JK, ST
- federführende Bearbeitung der Revisions gemeinsam mit allen Co-Autoren



## 9. Auszug aus der Journal Summary (ISI Web of Knowledge) - Publikation 1

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI  
Selected Categories: **"ENDOCRINOLOGY and METABOLISM"**

Selected Category Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 145 Journale**

| Rank | Full Journal Title                            | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|---|-------------|-----------------------|-------------------|
| 1    | Nature Reviews Endocrinology                  | 8,908       | 24.646                | 0.026300          |
| 2    | Lancet Diabetes & Endocrinology               | 7,961       | 24.540                | 0.038680          |
| 3    | Cell Metabolism                               | 34,829      | 22.415                | 0.099550          |
| 4    | DIABETES CARE                                 | 71,305      | 15.270                | 0.096210          |
| 5    | JOURNAL OF PINEAL RESEARCH                    | 10,695      | 15.221                | 0.010560          |
| 6    | ENDOCRINE REVIEWS                             | 13,381      | 15.167                | 0.008900          |
| 7    | TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM        | 8,968       | 9.777                 | 0.016630          |
| 8    | Obesity Reviews                               | 11,567      | 8.192                 | 0.023730          |
| 9    | FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY               | 4,196       | 7.852                 | 0.005490          |
| 10   | THYROID                                       | 11,972      | 7.786                 | 0.022810          |
| 11   | DIABETES                                      | 53,532      | 7.199                 | 0.064540          |
| 12   | DIABETOLOGIA                                  | 30,692      | 7.113                 | 0.041920          |
| 13   | NEUROENDOCRINOLOGY                            | 5,046       | 6.804                 | 0.005690          |
| 14   | METABOLISM-CLINICAL AND EXPERIMENTAL          | 14,379      | 6.513                 | 0.016360          |
| 15   | Molecular Metabolism                          | 3,415       | 6.181                 | 0.015290          |
| 16   | DIABETES OBESITY & METABOLISM                 | 9,982       | 6.133                 | 0.021570          |
| 17   | JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM | 19,766      | 6.040                 | 0.028050          |
| 18   | Cardiovascular Diabetology                    | 5,392       | 5.948                 | 0.011550          |
| 19   | ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING                | 20,275      | 5.828                 | 0.029700          |
| 20   | JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH          | 26,818      | 5.711                 | 0.032070          |
| 21   | FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE             | 40,820      | 5.657                 | 0.040300          |

| Rank | Full Journal Title  | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|------|---|-------------|-----------------------|-------------------|
| 22   | JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM              | 77,893      | 5.605                 | 0.089910          |
| 23   | REVIEWS IN ENDOCRINE & METABOLIC DISORDERS                  | 2,330       | 5.516                 | 0.004250          |
| 24   | EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY                           | 13,622      | 5.107                 | 0.020920          |
| 25   | BMJ Open Diabetes Research & Care                           | 866         | 5.067                 | 0.003630          |
| 26   | CURRENT OPINION IN LIPIDOLOGY                               | 4,140       | 4.844                 | 0.006320          |
| 27   | ENDOCRINE-RELATED CANCER                                    | 6,958       | 4.774                 | 0.012150          |
| 28   | DIABETES-METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS                    | 5,120       | 4.758                 | 0.007900          |
| 29   | INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY                            | 22,929      | 4.514                 | 0.030070          |
| 30   | Diabetes Technology & Therapeutics                          | 4,449       | 4.488                 | 0.008670          |
| 31   | JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY                                    | 11,816      | 4.381                 | 0.012110          |
| 32   | BONE  | 21,658      | 4.360                 | 0.025550          |
| 33   | JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE                      | 5,868       | 4.287                 | 0.008410          |
| 34   | Endocrine Practice  | 4,355       | 4.149                 | 0.010280          |
| 35   | AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM | 19,036      | 4.125                 | 0.017240          |
| 36   | PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY                                    | 16,809      | 4.013                 | 0.028150          |
| 37   | DIABETES & METABOLISM                                       | 3,483       | 4.008                 | 0.004010          |
| 38   | Current Diabetes Reports                                    | 3,870       | 3.996                 | 0.010600          |
| 39   | Obesity   | 18,844      | 3.969                 | 0.036270          |
| 40   | HORMONES AND BEHAVIOR                                       | 10,874      | 3.949                 | 0.012620          |
| 41   | Current Osteoporosis Reports                                | 1,786       | 3.927                 | 0.004610          |
| 42   | Journal of Diabetes Investigation                           | 2,564       | 3.902                 | 0.005810          |
| 43   | OSTEOPOROSIS INTERNATIONAL                                  | 16,709      | 3.819                 | 0.024870          |

2

Selected JCR Year: 2018; Selected Categories: "ENDOCRINOLOGY and METABOLISM"

Bone:  $32/145 = 0,2207 \rightarrow 22,07\% < 25\%$  d.h. innerhalb des 1. Quartils

$\rightarrow$  Erstautorenschaft in einer „Top-Journal Publikation“ gemäß PO 2012

## 10. Druckexemplar der ausgewählten Publikation

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115646>

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht veröffentlicht.

## 11. Publikationsliste

Stand: 27.02.2021

Anzahl der Publikationen: 3

davon als (geteilte\* / volle) Erstautorenschaften: 2

Köhli P, Appelt J, Otto E, Jahn D, Baranowsky A, Bahn A, Erdmann C, Mächler J, Mülleider M, Tsitsilonis S, Keller J.

*Effects of CGRP receptor antagonism on glucose and bone metabolism in mice with diet-induced obesity.*

Bone. 2021 Feb;143:115646. doi: 10.1016/j.bone.2020.115646.

IF 2019: 4,147

Otto E\*, Köhli P\*, Appelt J, Menzel S, Fuchs M, Bahn A, Graef F, Duda GN, Tsitsilonis S, Keller J, Jahn D.

*Validation of reference genes for expression analysis in a murine trauma model combining traumatic brain injury and femoral fracture.*

Sci Rep. 2020 Sep 14;10(1):15057. doi: 10.1038/s41598-020-71895-x.

IF 2019: 3,998

Appelt J, Baranowsky A, Jahn D, Yorgan T, Köhli P, Otto E, Farahani SK, Graef F, Fuchs M, Herrera A, Amling M, Schinke T, Frosch KH, Duda GN, Tsitsilonis S, Keller J.

*The neuropeptide calcitonin gene-related peptide  $\alpha$  is essential for bone healing.*

EBioMedicine. 2020 Sep;59:102970. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102970. Epub 2020 Aug 24.

IF 2019: 5,736

## 12. Danksagung

Mein großer Dank gilt meinen Doktorvätern Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Johannes Keller und Herrn PD Dr. med. Serafeim Tsitsilonis, MSc, PhD für die Überlassung der Themen, kontinuierliche Förder- und Forderung, wissenschaftliche Ausbildung, rege Diskussionen, Menschlichkeit, Unterstützung und eure immense Geduld und unendliche Motivation.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Stöckle, geschäftsführendem Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie (CMSC) und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Carsten Perka, ärztlichem Direktor des CMSC, danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen und die Möglichkeit zur Weiterführung meiner Forschungsvorhaben.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Mit-Doktorandin Ellen Otto für die freundschaftliche und konstruktive gemeinsame Zeit. Weiter danke ich aufrichtig der Arbeitsgruppe der Molekularen Unfallchirurgie in Berlin, namentlich Dr. Denise Jahn, Dr. Jessika Appelt, Melanie Fuchs, Stefanie Menzel und Dr. Frank Graef, sowie Dr. Anke Baranowsky in Hamburg für Diskussionsfreude, Zusammenarbeit, Anleitung und stetige Unterstützung.

Moderne biomedizinische Wissenschaft gelingt nur im Team, sodass ich allen Kolleginnen und Kollegen am CMSC, am Julius-Wolff-Institut, am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, am Berliner Centrum für Regenerative Therapien, dem Institut für Biochemie, am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke und an der Forschungseinrichtung Experimentelle Medizin am Campus Virchow Klinikum danken möchte.

Meinen Eltern, Geschwistern und Freundinnen und Freunden gilt mein größter Dank für die nie endende Unterstützung, Vertrauen und Aufbau in gewissen Phasen. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht entstanden.