

Aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin sowie der  
Abteilung für Nephrologie der Feinberg School of Medicine der Northwestern  
University

DISSERTATION

**Angiotensin-converting enzyme 2-independent action of presumed  
angiotensin-converting enzyme 2 activators: studies in vivo, ex vivo,  
and in vitro.**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Haber

aus München

Datum der Promotion: 09.09.2016

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	3
2. Abstract .....	5
3. Abkürzungsverzeichnis .....	6
4. Eidesstattliche Versicherung .....	7
5. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge <sup>SM</sup> ) .....	9
6. Publikation .....	13
Abstract .....	14
Introduction .....	14
Methods .....	15
Results .....	15
Discussion .....	18
Perspectives .....	20
Acknowledgments .....	21
Sources of Funding .....	21
Disclosures .....	21
References .....	21
Online Supplement .....	23
7. Lebenslauf .....	27
8. Publikationsliste .....	28
9. Danksagung .....	29

## 1. Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist eines der zentralen Hormonsysteme in der Steuerung des Blutdrucks sowie des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes. Ausschlaggebend für die Funktionsfähigkeit des RAS ist das Gleichgewicht zwischen der vasokonstriktorisch wirksamen Achse Angiotensin-converting enzyme (ACE) – Angiotensin II (AngII) – Angiotensin type 1 receptor (AT1R) und der antagonistischen Achse Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) – Ang (1-7) – Mas-Receptor Achse. Eine Dysregulation zwischen diesen Zweigen wird als wesentlicher Faktor in der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen betrachtet.

Die Peptidase ACE2 nimmt dabei eine Schlüsselposition ein, durch die Fähigkeit das vasokonstriktorisch wirkende Oktapeptid Ang II, mittels carboxyterminaler Abspaltung der Aminosäure Phenylalanin, in Ang (1-7) zu metabolisieren. Dieses Peptid wird heute angesichts seiner vasodilatatorischen, antioxidativen und antithrombotischen Effekten als natürlicher Antagonist von Ang II verstanden. Eine Aktivierung von ACE2 stellt somit einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Den Substanzen 1-[(2-dimethylamino)ethylamino]-4-(hydroxymethyl)-7-[(4-methylphenyl) sulfonyl oxy]-9H-xanthene-9-one (XNT) und Diminazen (DIZE) wurden, unter der Prämisse einer solchen ACE2-Aktivierung, in zahlreichen Studien diverse organo-protective Effekte nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von XNT und DIZE auf den Blutdruck, den Ang II-Abbau und die ACE2-Aktivität *in vivo*, *ex vivo* und *in vitro* untersucht.

In einem Mausmodell für Ang II-induzierten Hypertonus zeigte sich der Blutdruck nach Bolusinjektion von Ang II in Wildtypmäusen (WT) unter XNT-Gabe signifikant schneller rückläufig ohne dass eine Veränderung von renaler und plasmatischer ACE2-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die Gabe von XNT bewirkte im gleichen Modell keine Veränderung der Plasmaspiegel von Ang II und Ang (1-7). Allerdings stellte sich der antihypertensive Effekt von XNT unerwartet auch in mit einem ACE2-Inhibitor vorbehandelten WT-Mäusen sowie in ACE2 Knockout-Mäusen dar. In zusätzlichen *ex vivo* Experimenten in Maus- und Rattennieren konnte durch XNT oder DIZE keine erhöhte ACE2-Aktivität ausgelöst werden, ebenso zeigte sich *in vitro* weder eine erhöhte ACE2-Aktivität noch ein veränderter Ang II Abbau unter XNT oder DIZE. Vielmehr zeigte sich bei sehr hohen Konzentration beider Moleküle ein antagonistischer Effekt auf verschiedene Enzyme des Renin-Angiotensin-Aldosteron System im Sinne einer unspezifischen Hemmung.

Zusammenfassend zeigen die *in vivo*-Studien, dass die Blutdrucksenkung durch XNT auf ACE2-unabhängigen Mechanismen beruht. Die Ergebnisse der *ex vivo*- und *in vitro*-Studien legen

nahe, dass auch andere vorteilhafte Effekte von XNT und DIZE, die bisher beschrieben wurden, nicht einer ACE2-Aktivierung zugeschrieben werden können.

## 2. Abstract

The renin-angiotensin system (RAS) constitutes one of the pivotal systems in the physiological regulation of blood pressure and volume homeostasis. The balance between the classical Angiotensin-converting enzyme (ACE) – Angiotensin II (Ang II) – Angiotensin type 1 receptor (AT1R) axis, promoting vasoconstriction, and the antagonistic Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) – Ang (1-7) – Mas-Receptor axis is critical for a functional RAS. Dysregulation between those branches is considered to play a major role in the pathophysiology of various cardiovascular disorders. The peptidase ACE2 assumes a key position in this system due to the capability of metabolizing the vasoconstrictive octapeptide Ang II, through carboxyterminal cleavage of the amino acid phenylalanine, to Ang (1-7). This peptide is regarded as a natural antagonist of Ang II, due to its vasodilatory, antioxidative and antithrombotic properties. Enhancing the activity of ACE2 and thus amplifying the degradation of Ang II would be a novel approach to the treatment of cardiovascular diseases.

1-[(2-dimethylamino)ethylamino]-4-(hydroxymethyl)-7-[(4-methylphenyl) sulfonyl oxy]-9H-xanthene-9-one (XNT) and diminazene (DIZE) have shown, in several reports, to exert various organ-protective effects. The premise of the observed effect has always been the activation of ACE2 and the resulting increase in Ang II degradation. In this study, the two compounds were investigated *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* with regard to potential effects on blood pressure, Ang II degradation and ACE2 activity.

In a model of Ang II-induced acute hypertension, administration of an Ang II Bolus under XNT resulted in an accelerated recovery in wild-type mice (WT) without an increase in either renal or plasma ACE2 activity. In the same model, XNT did not elicit an alteration in Plasma Ang II and Ang (1-7) levels. The antihypertensive effect of XNT was unexpectedly also found in WT-mice pretreated with an ACE2 inhibitor as well as in ACE2 knockout mice. *Ex vivo* experiments in mouse- and rat kidneys were moreover not showing an increase in ACE2 activity after incubation with Ang II and either XNT or DIZE. Furthermore, *in vitro* experiments showed that ACE2 activity and Ang II degradation were not enhanced in the presence of either compound. In fact, at very high concentrations, an antagonistic effect towards different enzymes of the RAS was observed.

In summary, the *in vivo*-studies show that the antihypertensive effect of XNT is based on an ACE2-independent mechanism. The *ex vivo*- and *in vitro*-studies suggest that the other beneficial effects of both XNT and DIZE should not be attributed to ACE2 activation.

### 3. Abkürzungsverzeichnis

ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2
Ang II	Angiotensin II
APA	Aminopeptidase A
BP	Blood pressure / Blutdruck
DIZE	Diminazene / Diminazen
EIA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
KO	Knockout
Min	Minute
PBS	Phosphate buffered saline / Phosphatgepufferte Salzlösung
rACE2	recombinant Angiotensin-converting enzyme 2
RAS	Renin-Angiotensin System
RFU	Relative fluorescence unit
SBP	Systolic Blood pressure / Systolischer Blutdruck
SE	Standard error / Standardfehler
VHC	Vehicle / Vehikel
WT	Wild-type / Wildtyp
XNT	(1-[(2-dimethylamino)ethylamino]-4-(hydroxymethyl)-7-[(4-methylphenyl)sulfonyl oxy]-9H-xanthene-9-one)

#### 4. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Philipp Haber, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Angiotensin-converting enzyme 2-independent action of presumed angiotensin-converting enzyme 2 activators: studies in vivo, ex vivo, and in vitro“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

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

Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

#### **Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation**

Publikation : Haber PK, Ye M, Wysocki J, Maier C, Haque SK, Battle D.

Angiotensin-converting enzyme 2-independent action of presumed angiotensin-converting enzyme 2 activators: studies in vivo, ex vivo, and in vitro. Hypertension, 2014

Beitrag im Einzelnen:

-Versuchsplanung und –durchführung der in vitro Experimente: Enzymaktivitätsmessung von rACE2 und APA mit verschiedenen XNT/DIZE Konzentrationen. Peptidmessungen

von Ang II und Ang (1-7) mit rACE2. Analyse und statistische Auswertung aller erhobenen Daten.

-Versuchsplanung und –durchführung der ex vivo Experimente mit Ausnahme der ex vivo durchgeführten massenspektrometrischen Messung von Ang II, Ang (1-7) und Ang (1-5); diese erfolgte durch die Firma *attoquant diagnostics*.

Anfertigung der Lysate, ACE2-Aktivitätsmessung in Maus- und Rattennieren mit verschiedenen XNT/DIZE Konzentrationen. Analyse und statistische Auswertung aller erhobenen Daten.

-Versuchsplanung und –durchführung der in vivo Messungen: Messung von renaler und plasmatischer ACE2 nach Organentnahme. Anfertigung der Lysate sowie der Plasmaisolation und Messung von Plasma Ang II und Ang (1-7). Analyse und statistische Auswertung sämtlicher erhobener Blutdruckdaten.

-Erstellung des Manuskripts und der Revisionen

-Erstellung sämtlicher Grafiken

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---



## 5. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>)

2013 JCR Science Edition

### MARKED JOURNAL LIST

Sorted by: Impact Factor

Abbreviated Journal Title	ISSN	2013 Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	2013 Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>®</sup> Score	Article Influence <sup>®</sup> Score
CIRCULATION	0009-7322	158661	14.948	15.326	3.067	510	9.2	0.28712	5.900
CIRC RES	0009-7330	47185	11.089	10.759	2.450	262	8.5	0.09265	3.835
ATHEROSCLEROSIS SUPP	1567-5688	744	9.667	3.818	0.875	40	7.8	0.00093	0.849
HYPERTENSION	0194-911X	34751	7.632	7.346	1.887	327	8.3	0.06439	2.344
STROKE	0039-2499	56480	6.018	6.757	1.170	653	8.5	0.10416	2.182
CURR OPIN LIPIDOL	0957-9672	3898	5.803	6.017	1.230	61	6.3	0.00961	1.923
THROMB HAEMOSTASIS	0340-6245	17000	5.760	4.859	1.160	257	7.9	0.03661	1.590
J THROMB HAEMOST	1538-7933	14435	5.550	5.532	1.353	238	5.3	0.04604	1.975
ARTERIOSCL THROM VAS	1079-5642	32038	5.533	6.430	1.260	358	7.9	0.06283	2.194
ANGIOGENESIS	0969-6970	1943	4.410	5.212	0.847	72	5.5	0.00555	1.683
CURR OPIN NEPHROL HY	1062-4821	3029	4.235	3.858	0.758	91	5.6	0.00946	1.415
J HYPERTENS	0263-6352	16175	4.222	4.224	1.296	257	7.2	0.03031	1.285
INT J STROKE	1747-4930	1502	4.029	3.733	0.721	122	2.9	0.00858	1.547
AM J PHYSIOL-HEART C	0363-6135	32958	4.012	4.046	0.614	352	8.5	0.05303	1.285
ATHEROSCLEROSIS	0021-9150	20132	3.971	3.991	0.701	412	5.6	0.04912	1.133
CURR HYPERTENS REP	1522-6417	1650	3.902	3.263	0.482	85	4.2	0.00561	1.093

CEREBROVASC DIS	1015-9770	5649	3.698	3.493	0.571	133	5.8	0.01648	1.202
SEMIN THROMB HEMOST	0094-6176	3484	3.693	3.757	1.717	99	5.2	0.00746	0.971
J ENDOVASC THER	1526-6028	2809	3.590	3.142	1.224	85	5.5	0.00744	0.988
AM J HYPERTENS	0895-7061	8173	3.402	3.286	0.610	177	8.1	0.01605	1.037
EUR J VASC ENDOVASC	1078-5884	6624	3.070	2.886	0.621	177	6.2	0.01695	0.964
CURR ATHEROSCLER REP	1523-3804	1489	3.059	2.739	0.549	82	4.6	0.00462	0.872
DIABETES VASC DIS RE	1479-1641	823	3.043	2.905	0.687	67	4.8	0.00263	0.883
J VASC SURG	0741-5214	19493	2.980	3.183	0.557	465	7.3	0.03838	0.926
J CLIN HYPERTENS	1524-6175	1967	2.958	2.448	0.777	121	4.0	0.00613	0.705
HYPERTENS RES	0916-9636	4415	2.936	2.725	0.883	145	5.1	0.01164	0.751
CURR VASC PHARMACOL	1570-1611	1316	2.908	2.765	0.500	80	3.7	0.00378	0.684
J ATHEROSCLER THROMB	1340-3478	2277	2.770		0.649	77	3.8	0.00608	
SHOCK	1073-2322	6465	2.732	2.811	1.925	147	6.6	0.01175	0.746
J HUM HYPERTENS	0950-9240	3734	2.692	2.419	0.591	115	8.0	0.00691	0.786
J AM SOC HYPERTENS	1933-1711	663	2.680	2.530	0.456	57	3.4	0.00314	0.813
J VASC RES	1018-1172	1604	2.443	2.288	0.512	43	7.9	0.00302	0.696
MICROVASC RES	0026-2862	3632	2.432	2.859	0.431	102	8.0	0.00712	0.826
THROMB RES	0049-3848	8010	2.427	2.420	0.380	297	6.2	0.01986	0.764
ANGIOLOGY	0003-3197	2419	2.370	1.586	1.284	81	8.6	0.00312	0.352
J RENIN-ANGIO-ALDO S	1470-3203	810	2.271	2.000	0.733	45	3.5	0.00185	0.458
MICROCIRCULATION	1073-9688	1915	2.263	2.726	0.613	62	6.6	0.00500	0.956
CLIN HEMORHEOL MICRO	1386-0291	1857	2.215	2.028	0.709	110	4.9	0.00272	0.326
J VASC INTERV RADIOL	1051-0443	6430	2.149	2.201	0.446	224	7.2	0.01346	0.673
HEART VESSELS	0910-	1347	2.109	1.808	0.324	108	4.5	0.00253	0.356

	8327								
J THROMB THROMBOLYS	0929- 5305	1700	2.039	1.583	0.610	136	4.2	0.00550	0.515
J STROKE CEREBROVASC	1052- 3057	1834	1.993		0.311	334	4.2	0.00643	
PHLEBOLOGY	0268- 3555	771	1.917	1.977	0.297	91	4.1	0.00192	0.449
KIDNEY BLOOD PRESS R	1420- 4096	871	1.820	1.619	0.087	69	4.4	0.00258	0.453
VASC MED	1358- 863X	1244	1.732	2.012	0.200	45	7.4	0.00301	0.738
BLOOD PRESSURE	0803- 7051	992	1.605	1.573	0.469	49	6.9	0.00203	0.468
SEMIN VASC SURG	0895- 7967	602	1.583	1.564	0.000	15	6.4	0.00165	0.546
CLIN APPL THROMB- HEM	1076- 0296	1249	1.575	1.414	0.485	103	4.4	0.00350	0.412
J CARDIOTHOR VASC AN	1053- 0770	2550	1.482	1.320	0.291	206	6.5	0.00491	0.343
CLIN EXP HYPERTENS	1064- 1963	1284	1.456	1.362	0.417	96	7.5	0.00226	0.349
J CARDIOVASC SURG	0021- 9509	1895	1.365	1.383	0.315	108	8.6	0.00395	0.462
CORONARY ARTERY DIS	0954- 6928	1474	1.302	1.286	0.238	105	7.4	0.00233	0.340
VASA	0301- 1526	624	1.213	1.010	0.311	61	5.9	0.00115	0.232
HYPERTENS PREGNANCY	1064- 1955	819	1.192	1.468	0.209	43	7.8	0.00166	0.454
BLOOD PRESS MONIT	1359- 5237	1229	1.179	1.613	0.218	55	8.0	0.00200	0.469
PERFUSION-UK	0267- 6591	895	1.083	1.098	0.286	77	7.5	0.00148	0.281
ANN VASC SURG	0890- 5096	2868	1.029	1.107	0.199	226	7.4	0.00670	0.374
J VASC ACCESS	1129- 7298	365	1.017	1.167	0.132	53	3.9	0.00153	0.384
INT ANGIOL	0392- 9590	1054	1.014	1.265	0.118	76	6.8	0.00219	0.355
VASCULAR	1708- 5381	495	1.000	0.933	0.130	69	4.9	0.00177	0.324
VASC ENDOVASC SURG	1538- 5744	943	0.766	0.962	0.066	121	5.1	0.00310	0.325
ANN CARDIOL ANGEIOL	0003- 3928	209	0.302	0.297	0.048	83	5.7	0.00043	0.073
PHLEBOL-ANN VASC	0031- 8280	138	0.113	0.089	0.000	28	>10.0	0.00002	0.006

ITAL J VASC ENDOVASC	1824- 4777	11	0.078	0.052	0.000	28		0.00006	0.022
SANG THROMB VAISS	0999- 7385	21	0.011	0.024	0.030	33		0.00004	0.009

## **6. Publikation**

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02856>































## **7. Lebenslauf**

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

## 8. Publikationsliste

### Publikation 1:

Angiotensin-converting enzyme 2-independent action of presumed angiotensin-converting enzyme 2 activators: studies in vivo, ex vivo, and in vitro.

Haber Philipp Konstantin, Ye Minghao, Wysocki Jan, Maier Christoph, Haque Syed, Batlle Daniel.

Hypertension. 2014 Apr;63(4):774-82

Impact factor: 7,632

### Publikation 2:

ACE2-Independent Effect of XNT in Ang II-Induced Hypertension

Philipp K. Haber, Minghao Ye, Jan Wysocki, Mohan Raizada, Daniel Batlle, High Blood Pressure Research Scientific Sessions 2013, New Orleans

### Publikation 3:

Effective and Sustained ACE2 Delivery Using Minicircles Technology

Jan Wysocki, Philipp K. Haber, Minghao Ye, Christoph Maier, Mark J. Osborn, Daniel Batlle, High Blood Pressure Research Scientific Sessions 2013, New Orleans

### Publikation 4:

Blood Pressure and Kidney Function in PRCP deficient Mice

Christoph Maier, Jan Wysocki, Minghao Ye, Philipp K. Haber, Alvin H. Schmaier, Daniel Batlle, High Blood Pressure Research Scientific Sessions 2013, New Orleans

## **9. Danksagung**

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Mitwirkung mehrerer Menschen, denen ich allen zu tiefem Dank verpflichtet bin.

Prof. Daniel Battle, von der Northwestern University für seine rückhaltlose, unermüdliche Unterstützung und Förderung. Die sehr persönliche und geduldige Betreuung waren dabei unverzichtbar für den Erfolg dieser Arbeit.

Prof. Dr. Michael Bader, der vorbehaltlos die Betreuung dieses Projekts von Berlin aus übernahm. Mein Stipendium, das mir diesen Forschungsaufenthalt ermöglicht hat, verdanke ich insbesondere seiner Unterstützung.

Besonderer Dank gebührt Dr. Jan Wysocki. Da er, als mein Ansprechpartner im Labor, mich mit der Methodik vertraut machte, und dies mit beispielloser Geduld und Gewissenhaftigkeit tat, hat er maßgeblichen Anteil an dem Erfolg dieses Projekts. Die Zusammenarbeit mit ihm gab mir eine Orientierung, die auch in zukünftigen wissenschaftlichen Unterfangen bleiben wird.

Ich danke außerdem der International Academy of Life Sciences um Prof. Dr. Hilmar Stolte, der es mittels des BMEP-Programms zahllosen Studenten wie mir ermöglicht hat, Forschungserfahrung in den USA zu sammeln.

Dr. Minghao Ye und Christoph Maier danke ich für ihre Unterstützung und den stets angeregten Austausch.