

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

DISSERTATION

Kardiovaskuläre Funktion, renaler Phänotyp und  
Angiotensin II-Metabolismus PRCP-defizienter Mäuse

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Maier

aus Freiburg im Breisgau

Datum der Promotion: 13. Dezember 2019

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Zusammenfassung .....	2
2	Abstract .....	3
3	Abkürzungen .....	4
4	Manteltext.....	5
4.1	Forschungsstand .....	5
4.1.1	Renin-Angiotensin-System .....	5
4.1.2	PRCP .....	6
4.1.3	Ziele dieser Arbeit .....	8
4.2	Ausgewählte Methoden .....	10
4.2.1	Tiere .....	10
4.2.2	Blutdruck.....	10
4.2.3	Nierenfunktion .....	11
4.2.4	Weitere Methoden .....	11
4.2.5	Statistische Auswertung .....	11
4.3	Wesentliche neue Ergebnisse .....	12
4.3.1	Kardiovaskulärer Phänotyp .....	12
4.3.2	Renaler Phänotyp .....	13
4.3.3	RAS-Peptide.....	13
4.3.4	RAS-Enzyme und -Rezeptoren .....	14
4.3.5	Renale Lokalisation von PRCP im WT.....	14
4.4	Diskussion und Ausblick .....	15
4.5	Quellenangaben für den Manteltext .....	17
5	Eidesstattliche Versicherung .....	22
6	Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge).....	24
7	Publikation .....	25
8	Lebenslauf .....	52
9	Publikationsliste .....	53
10	Danksagung.....	55

# **1 Zusammenfassung**

Prolylcarboxypeptidase (PRCP) ist eine Carboxypeptidase und kann durch Abspaltung der C-terminalen Aminosäure den Vasopressor Ang II zu Ang(1-7) metabolisieren. In dieser Arbeit wird in einem Tiermodell der Einfluss von genetischem PRCP-Mangel ( $prcp^{gt/gt}$ ) auf den kardiovaskulären und renalen Phänotyp, die Nierenhistologie und den Ang II-Metabolismus untersucht. Diese Experimente wurden in zwei unabhängigen  $prcp^{gt/gt}$ -Mauslinien durchgeführt, KST302 (genetischer Background C57BL/6) und GST090 (FVB/N).

In der GST090-Linie war der Blutdruck auf  $113,7 \pm 2,07$  vs. WT  $105,0 \pm 1,23$  mmHg erhöht ( $p < 0,05$ ), begleitend zeigte sich echokardiographisch eine linksventrikuläre Hypertrophie (LVPWd/LVd  $0,239 \pm 0,0163$  vs. WT  $0,193 \pm 0,0049$ ;  $p < 0,05$ ). In der KST302-Linie wurden gleichermaßen Hypertonie und linksventrikuläre Hypertrophie beobachtet. In dieser Linie zeigten histologische Analysen der Nieren außerdem eine Vergrößerung der Glomeruli und glomeruläre mesangiale Expansion, allerdings konnten in-vivo keine korrespondierenden Veränderungen der Inulin-Clearance oder der Albuminurie gefunden werden.

In der GST090-Linie führt eine chronische Ang II-Infusion zur Aggravation der Hypertonie und LV-Hypertrophie, wobei sich die Unterschiede zwischen  $prcp^{gt/gt}$ -Tieren und dem Wildtyp angleichen. Unter Normalbedingungen ohne Ang II-Infusion gab es keine signifikanten Unterschiede der plasmatischen, kardialen oder renalen Konzentration von Ang II und Ang(1-7) zwischen den Gruppen.

In vitro-Studien zeigten eine starke pH-Abhängigkeit der PRCP-Aktivität mit Optimum bei pH 5,0. In einem ex vivo-System aus humanem Poolplasma (pH 7,4) konnte per LC-MS/MS kein Abbau von Ang II durch rekombinantes PRCP nachgewiesen werden. In weiteren Experimenten wurde PRCP innerhalb des Nephrons von Wildtyp-Mäusen in  $\alpha$ -Schaltzellen lokalisiert. Das saure intraluminale Milieu des Sammelrohrs stellt günstige Reaktionsbedingungen für PRCP dar. Über enzymatischen Abbau des lokalen Ang II im distalen Nephron könnte PRCP möglicherweise Einfluss auf die Natrium-Reabsorption und damit auf den Blutdruck nehmen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass PRCP-Mangel im Mausmodell zu Hypertonie, kardialer Dysfunktion und histologischen Nierenschäden bei noch erhaltener Nierenfunktion in-vivo führt, ohne dass wir diese Effekte auf Alterationen der plasmatischen, kardialen oder renalen Konzentration von Ang II oder Ang(1-7) zurückführen konnten.

## 2 Abstract

Prolylcarboxypeptidase (PRCP) is a carboxypeptidase capable of degrading the vasopressor Ang II by cleaving the C-terminal amino acid, producing Ang(1-7). This dissertation will, in a murine model, investigate the influence of genetic PRCP deficiency ( $\text{prcp}^{\text{gt/gt}}$ ) on the cardiovascular and renal phenotype as well renal histology and Ang II metabolism. These studies were conducted on two independent lines of  $\text{prcp}^{\text{gt/gt}}$  mice, KST302 (genetic background C57BL/6) and GST090 (FVB/N).

In the GST090 line, an increase in blood pressure ( $\text{prcp}^{\text{gt/gt}}$   $113.7 \pm 2.07$  vs. WT  $105.0 \pm 1.23$  mmHg;  $p < 0.05$ ) and left ventricular hypertrophy (LVPWd/LVd  $0.239 \pm 0.0163$  vs. WT  $0.193 \pm 0.0049$ ;  $p < 0.05$ ) were observed. Similar changes were found in the KST302 line. Furthermore kidney function and histology were examined in the KST302 line. While inulin clearance and albuminuria were not significantly altered in  $\text{prcp}^{\text{gt/gt}}$  animals, histologic studies showed an increase in glomerular size and glomerular mesangial expansion.

The chronic infusion of Ang II in the GST090 line, challenging the renin-angiotensin-system, resulted in worsening hypertension and LV hypertrophy. However, the differences between  $\text{prcp}^{\text{gt/gt}}$  and wild type animals decreased. Moreover, under baseline conditions without Ang II challenge, no significant differences were found in the plasmatic, cardiac or renal levels of Ang II or Ang(1-7).

In vitro studies demonstrated a strong pH dependency of PRCP enzymatic activity and a preference for acidic conditions (pH 5.0). In an ex vivo setup utilizing pooled human plasma at pH 7.4, recombinant PRCP was not capable of degrading Ang II, as determined by LC-MS/MS. Further work demonstrated that PRCP is expressed in  $\alpha$ -intercalated cells of the distal nephron. The acidic intraluminal environment of the collecting duct would be favorable to PRCP's catalytic activity. PRCP might influence sodium reabsorption and hence blood pressure by means of regulating local Ang II levels in the distal nephron.

In summary, we showed that genetic deficiency of PRCP in a murine model leads to hypertension, cardiac dysfunction and renal damage. These effects were not directly attributable to changes in plasma, cardiac or renal concentrations of Ang II or Ang(1-7).

### 3 Abkürzungen

Abkürzung	Erläuterung
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACE2	Angiotensin converting enzyme 2
AHT	Arterielle Hypertonie
Ang (...)	Angiotensin (...)
APA	Aminopeptidase A
AT <sub>1</sub>	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
BCA	Bicinchoninsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	fractional shortening
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
gt	gene trap
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
KKS	Kallikrein-Kinin-System
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie
LV	linksventrikulär
LVd	left ventricular diameter end diastole
LVPWd	left ventricular posterior wall end diastole
MAP	mean arterial pressure
MR	Magnetresonanztomographie
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NEP	Neprilysin
PRCP	Prolylcarboxypeptidase
prcp <sup>gt/gt</sup>	homozygot PRCP-defizient (genetrap)
RAS	Renin-Angiotensin-System
RFU	relative fluorescence units
RIA	Radioimmunassay
ROS	reactive oxygen species
rPRCP	rekombinantes PRCP-Protein
WT	Wildtyp



Eines der am besten erforschten Peptide in diesem Gefüge ist Ang(1-7). Bisherige Arbeiten charakterisierten Ang(1-7) als pleiotropes Peptid mit Einfluss auf eine Vielzahl von Organismen (Santos u. a., 2018), wobei es sich zusammenfassend als „Gegenspieler“ von Ang II mit u.a. vasodilatatorischer, blutdrucksenkender Wirkung und einem nephroprotektiven Effekt beschreiben lässt. Die Enzyme, die Ang(1-7) unter Abspaltung der C-terminalen Aminosäure Phenylalanin aus Ang II generieren sind ACE2, NEP und PRCP. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht PRCP.

#### 4.1.2 PRCP

PRCP (EC-Nummer: 3.4.16.2, ältere Synonyme: lysosomale Pro-X Carboxypeptidase oder Angiotensinase C) ist ein 1968 entdecktes (Yang u. a., 1968) Enzym aus der S28-Familie, das eine einzelne Aminosäure vom C-terminalen Ende von Peptiden hydrolysiert (Soisson u. a., 2010). Die maximale Aktivität wird im sauren Milieu bei pH ca. 5 erreicht (Ody u. a., 1978). In-vivo erscheint PRCP als dimerisiertes, glykosyliertes Protein (Abeywickrema u. a., 2010). Nach klassischer Sicht haben alle PRCP-Substrate gemein, dass Prolin an vorletzter Stelle der Aminosäuresequenz steht (...-Pro-X). In zwei aktuellen Arbeiten wurde jedoch gezeigt, dass grundsätzlich auch Peptide mit Alanin und Norleucin an vorletzter Stelle als potentielle Substrate in Frage kommen (O'Donoghue und Eroy-Reveles, 2012) (Tanco u. a., 2013).

In einer Reihe von Peptidhormonsystemen wurden biologische Substrate von PRCP identifiziert. In erster Linie sind dies Ang II und Ang III aus dem RAS (Ody u. a., 1978), Präkallikrein (Moreira u. a., 2002) und des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin (Chajkowski u. a., 2011) aus dem Kininsystem sowie  $\alpha$ -MSH aus dem Melanokortin-System (Wallingford u. a., 2009) und Apelin (Kehoe u. a., 2016). Des Weiteren wurde berichtet, dass PRCP ein Peptid(fragment) aus humanem Liquor cerebrospinalis mit der Aminosäuresequenz YPRPIHPA abbaut (Zhao u. a., 2010).

Das RAS nimmt eine zentrale Stellung in der Kreislaufregulation des menschlichen Organismus ein und auch das KKS und das Melanokortin-System sind hieran beteiligt. Die Liste der o.g. PRCP-Substrate legt die Vermutung nahe, dass PRCP auf dem Wege der Proteolyse kreislaufaktiver Peptidhormone einen direkten Einfluss auf die kardiovaskuläre Homöostase nehmen könnte.

#### **4.1.2.1 Lokalisation**

PRCP wurde unter anderem bereits in Endothelzellen und in vaskulären Gefäßmuskelzellen lokalisiert (Tamaoki u. a., 1994) (Moreira u. a., 2002) (Adams u. a., 2011). In der Niere konnte PRCP bisher im Glomerulus und im proximalen Tubulus nachgewiesen werden (Grobe u. a., 2015). Pulmonal wurde es im Gefäßbett und in Alveolarmakrophagen entdeckt (Jackman u. a., 1995). Weiter wurde über eine ausgedehnte Expression im Gehirn berichtet (Jeong und Diano, 2014).

Hinsichtlich der subzellularen Lokalisation konnte PRCP sowohl auf der Plasmamembran als auch in der lysosomalen Fraktion ausgemacht werden (Kumamoto u. a., 1981) (Jackman u. a., 1995) (Moreira u. a., 2002) (Shariat-Madar u. a., 2004) (Schröder u. a., 2010).

#### **4.1.2.2 Daten aus Zellkultur-Experimenten**

In Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvenen und der bovinen Aorta wurde ein proliferativer Effekt von PRCP beobachtet, der interessanterweise auch beim Einschleusen einer Mutation in das aktive katalytische Zentrum erhalten blieb (Adams u. a., 2013). Außerdem wurde ein angiogenetischer Effekt von PRCP nachgewiesen (Adams u. a., 2013) (Javerzat u. a., 2009).

Weitere Studien zeigten, dass die Inaktivierung von PRCP die Empfindlichkeit von Pankreaskarzinom-Zellen gegenüber Rapamycin und von Mammakarzinom-Zellen gegenüber Tamoxifen steigert; im Falle der Pankreaskarzinom-Zelllinie möglicherweise vermittelt durch das Regulatorproteins Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (Duan u. a., 2014) (Duan u. a., 2011).

Zur Regulation von PRCP selbst ist bekannt, dass Inaktivierung der Proprotein-Convertase 1/3 eine verstärkte Transkription von PRCP bewirkte (Wang u. a., 2017). Außerdem konnte in murinen Koronarendothelzellen gezeigt werden, dass die Überexpression des AT<sub>2</sub>-Rezeptors eine verstärkte PRCP-Expression und Aktivierung des KKS nach sich zieht (Zhu u. a., 2010) (Zhu u. a., 2012).

#### **4.1.2.3 Tierexperimentelle Daten**

Aus tierexperimentellen Arbeiten ist bekannt, dass Mäuse mit genetischem Mangel von PRCP einen schlanken Phänotyp bei verringerter Nahrungsaufnahme aufweisen, was auf veränderten Metabolismus des PRCP-Substrats  $\alpha$ -MSH im ZNS zurückgeführt werden konnte



(Wallingford u. a., 2009). Als weitere mögliche Ursache des schlanken Phänotyps wurden Veränderungen der TRH/TSH-Achse postuliert (Jeong u. a., 2012). Außerdem führte PRCP-Mangel in der Maus zu erhöhtem Blutdruck, einem prothrombotischem Zustand und vermehrten ROS im Gewebe (Adams u. a., 2011). PRCP-defiziente Mäuse zeigten außerdem eine verzögerte Wundheilung und auch eine gestörte Reaktion auf De-Endotheliasierung mit vermehrter Bildung von Neointima (Adams u. a., 2013).

Umgekehrt sind auch in anderen hypertensiven Tiermodellen Alterationen von PRCP aufgefallen. Bei SHR-Ratten, einem Modell für konstitutive Hypertonie, wurde Downregulation von PRCP festgestellt. (Marangoni u. a., 2014) (Liu u. a., 2015). Gleichermaßen kam es in der Maus durch den Two-Kidney/One-Clip-Eingriff, einem Modell für renovaskuläre Hypertonie nach dem Goldblatt-Prinzip, zu einer erheblichen Abnahme der PRCP-Expression in der operierten Niere (Grobe u. a., 2015).

Ferner wurde kürzlich berichtet, dass es bei Nahrungsentzug zu einer Ghrelin-vermittelten Steigerung der PRCP-Expression im Hypothalamus kommt (Bruschetta u. a., 2018).

#### **4.1.3 Ziele dieser Arbeit**

Kern dieser Arbeit ist ein Mausmodell mit genetischer PRCP-Defizienz ( $prcp^{gt/gt}$ ), das in der Literatur als hypertensiv beschrieben wurde. Nach Bestätigung dieses Befundes in eigenen Experimenten per invasiver und nicht-invasiver Blutdruckmessung war die nähere Charakterisierung des kardiovaskulären Phänotyps durch Echokardiographie und Herz-MR in-vivo ein erstes Ziel dieser Arbeit.

Das RAS ist eng mit der renalen Physiologie verknüpft. Daher untersuchten wir zweitens den Einfluss des PRCP-Mangels auf die Inulin-Clearance und Proteinurie/Albuminurie.

Ergänzend wurde getestet, ob bei  $prcp^{gt/gt}$ -Tieren im histologischen Präparat eine Nierenschädigung vorliegt.

Zur Abklärung eines möglichen Kausalzusammenhangs prüften wir drittens, ob der beobachtete Phänotyp mit Alterationen der Peptidkonzentrationen im RAS-System einhergeht. Außerdem wurde evaluiert, ob der PRCP-Mangel zu (kompensatorischen) Anpassungen anderer RAS-Enzyme oder RAS-Rezeptoren führt.

In der Vergangenheit war beobachtet worden, dass sich phänotypische Veränderungen von Knockout-Tiermodellen nur eingeschränkt zwischen verschiedenen Inzuchtlinien reproduzieren lassen (Gurley und Coffman, 2008). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit

zwei unabhängige Linien PRCP-defizienter Mäuse mit dem genetischen Background C57BL/6 bzw. FVB/N herangezogen.

Ergänzend untersuchten wir die Lokalisation von PRCP in der Niere von WT-Mäusen.

## 4.2 Ausgewählte Methoden

### 4.2.1 Tiere

Alle Tierexperimente wurden in männlichen Mäusen in zwei unabhängigen Linien von PRCP-defizienten Mäusen auf dem Background C57BL/6 bzw. FVB/N durchgeführt.

Die erste Linie auf dem genetischen Background C57BL/6 (im weiteren Text **KST302** genannt) wurde aus der embryonalen Stammzelllinie KST302 abgeleitet wie in der Literatur vorbeschrieben (Adams u. a., 2011).

Die zweite Linie auf dem Background FVB/N (im weiteren Text **GST090** genannt) wurde wie folgt generiert: Nach Injektion von embryonalen Stammzellen der Linie GST090 in Blastozysten von 129P2/OlaHsd-Mäusen wurden diese in pseudoschwangere C57BL/6 Leihmütter (Charles River) implantiert. Deren Nachkommen wurden in den Stamm FVB/N (Charles River) rückgekreuzt. Durch Paarung von heterozygoten  $\text{prcp}^{\text{gt}/+}$ -Geschwistertieren der 8. Generation entstanden homozygote  $\text{prcp}^{\text{gt}/\text{gt}}$ -Tiere (PRCP-defizient) und  $\text{prcp}^{+/+}$ -Kontrolltiere (PRCP-Wildtyp, im Folgenden als WT bezeichnet).

### 4.2.2 Blutdruck

Blutdruck wurde im KST302-Modell per nicht-invasiver Plethysmographie und im GST090-Modell mittels kontinuierlicher invasiver Radiotelemetrie gemessen.

Zur nicht-invasiven Plethysmographie wurden die Tiere nach Einleitung einer flachen Ketamin-Narkose (200  $\mu\text{g}/\text{g}$  KG i.p.) in Restrainern auf einer Heizplatte gelagert und zum Erreichen stabiler Kreislaufverhältnisse wurde ihnen eine Ruhezeit von 10 Minuten gewährt. Daraufhin wurde der Blutdruck der Schwanzgefäße in 20 Messzyklen (30 sec Intervall) per Manschette plethysmographisch erfasst und mit einem Computersystem aufgezeichnet (Coda High-Throughput System, Kent Scientific). Zur Datenanalyse wurde der gemessene systolische Blutdruck herangezogen.

Die invasive Blutdruckmessung wurde kontinuierlich über ein Telemetrie-System mit implantierbaren Drucksensoren vorgenommen (Dataquest ART 4.0, Data Sciences International). Hierzu wurde in Isofluran-Anästhesie der Messkatheter über Punktion der A. femoralis retrograd in die Aorta eingebracht und der Transducer (TA11PA-C20) wurde subkutan implantiert. Nach einer Rekonvaleszenzperiode von 10 Tagen hatte sich bei den Tieren wieder ein zirkadianer Rhythmus der Kreislaufparameter Blutdruck und Herzfrequenz eingestellt, so dass die Baseline-Werte aufgezeichnet werden konnten. Für weitere Experimente mit chronischer

Infusion von Ang II wurden osmotische Minipumpen implantiert (Modell 1004, Alzet. Dosis 1,4 mg/kg KG/Tag, 0,12 µl/h, Füllvolumen 98 µl).

### **4.2.3 Nierenfunktion**

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde als die Plasma-Clearance von Inulin definiert und durch serielle Messungen der FITC-Plasmakonzentration nach Bolusinjektion von FITC-Inulin in narkotisierten Mäusen ermittelt. Nach Einleitung der Anästhesie (100 µg/g KG Ketamin und 8.3 µg/g KG Xylazin i.p.) wurde FITC-Inulin retroorbital injiziert. Zu vorbestimmten Zeitpunkten wurde Blut aus der Schwanzvene gewonnen (3, 7, 10, 15, 35, 55 und 75 min post injectionem). Durch Zentrifugation der Blutproben (10 min, 1800 g) wurde das Plasma gewonnen. Die FITC-Inulin-Konzentration wurde durch Bestimmung der FITC-abhängigen Fluoreszenz auf einer schwarzen Mikrotiter-Platte ermittelt (Anregung:  $\lambda = 485$  nm; Emission:  $\lambda = 528$  nm). Auf Grundlage dieser Messwerte wurde die Inulin-Plasma-clearance mittels eines pharmakokinetischen Zwei-Kompartiment-Modell ermittelt. Hierzu wurde für jedes Tier die FITC-Zeitkurve mit der Methode der kleinsten Quadrate auf ein Modell des zweiphasigen exponentiellen Abbaus gefittet (Software: GraphPad Prism, Version 5). Mit den best fit-Parametern wurde dann die GFR berechnet (Qi u. a., 2004).

Die Konzentration des Gesamt-Proteins und Albumin im Urin wurden mit dem BCA-Test bzw. mittels ELISA (Albuwell M, Exocell) gemessen. Beide Parameter wurden auf die Kreatinin-Konzentration im Urin bezogen, die mit der Jaffe-Methode kolorimetrisch ermittelt wurde (Creatinine Companion, Exocell).

### **4.2.4 Weitere Methoden**

Aus Platzgründen wird für die Schilderung der weiteren in vivo-, ex vivo- und in vitro-Methoden auf die Originalpublikation verwiesen.

### **4.2.5 Statistische Auswertung**

Sofern nicht anders gekennzeichnet sind die Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Als Signifikanztest wurde der Zweistichproben-t-test für unabhängige Gruppen mit Signifikanzniveau 0,05 verwendet. Für die statistischen Berechnungen wurden GraphPad Prism, Version 6, und IBM SPSS, Version 22, verwendet.

## 4.3 Wesentliche neue Ergebnisse

### 4.3.1 Kardiovaskulärer Phänotyp

In beiden Mauslinien führte die PRCP-Defizienz zu einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks: Bei KST302  $prcp^{gt/gt}$ -Mäusen im Alter von 14 Wochen wurde mittels nicht-invasiver Plethysmographie unter flacher Narkose ein Blutdruck (systolisch) von  $146 \pm 6,3$  vs. WT  $124 \pm 3,1$  mmHg ermittelt ( $p < 0,05$ ).

Dieser Befund konnte in weiteren Experimenten per kontinuierlicher invasiver Blutdruckmessung bestätigt werden. Hier war bei GST090  $prcp^{gt/gt}$ -Mäusen im Alter von 13 Wochen der Blutdruck (MAP) auf  $113,7 \pm 2,07$  vs. WT  $105,0 \pm 1,23$  mmHg erhöht ( $p < 0,05$ ). Zudem beobachteten wir eine Steigerung der Herzfrequenz auf  $667,2 \pm 9,58 \text{ min}^{-1}$  vs. WT  $631,3 \pm 5,32 \text{ min}^{-1}$ ;  $p < 0,05$  (*Abbildung 6a/b der Originalpublikation*).

Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich in GST090  $prcp^{gt/gt}$ -Mäusen echokardiographisch zudem eine linksventrikuläre Hypertrophie (LVPWd/LVd  $0,239 \pm 0,0163$  vs. WT  $0,193 \pm 0,0049$ ;  $p < 0,05$ ; *Abbildung 7a der Originalpublikation*). Auch im KST302-Modell zeigte sich echokardiographisch ein auffälliger Befund. So waren etwa der myokardiale Performance Index erhöht und die fraktionelle Verkürzung (FS) verringert (MPI  $0,53$  vs. WT  $0,4$ ;  $p < 0,05$  bzw. FS  $0,38$  vs. WT  $0,50$ ;  $p < 0,05$ ; *Tabelle S1 der Originalpublikation*). Diese kardiale Dysfunktion konnte in der KST302-Linie außerdem im Herz-MR und auch post mortem im Sinne eines gesteigerten Herzgewichts ( $0,45 \pm 0,011$  vs. WT  $0,42 \pm 0,0067$  % in Relation zum KG,  $p < 0,05$ ) verifiziert werden.

Zur Abklärung der Frage, ob die Hypertonie der  $prcp^{gt/gt}$ -Tiere auf einen eingeschränkten Abbau von Ang II zurückzuführen ist, wurde in der GST090-Linie mit osmotischen Minipumpen eine kontinuierliche Ang II-Infusion ( $1,4 \text{ mg/kg KG/Tag}$ ) vorgenommen. Unter dieser Ang II-Challenge stieg der Blutdruck im Vergleich zur Baseline sowohl bei  $prcp^{gt/gt}$ - als auch bei WT-Mäusen an, wobei sich der Unterschiede zwischen den Gruppen abdämpfte ( $prcp^{gt/gt}$   $144,7 \pm 6,56$  vs. WT  $131,9 \pm 4,14$  mmHg; *Abbildung 6c/e der Originalpublikation*). Parallel kam es zu einem Abfall der Herzfrequenz ( $prcp^{gt/gt}$   $603,4 \pm 11,37$  vs. WT  $586,2 \pm 8,30 \text{ min}^{-1}$ ; *Abbildung 6d/f der Originalpublikation*).

### 4.3.2 Renaler Phänotyp

Nierenfunktion und Nierenhistologie wurde in KST302  $prcp^{gt/gt}$ -Mäusen untersucht.

Zu keinem Zeitpunkt zwischen 18 und 30 Wochen Alter zeigten sich hierbei signifikante Unterschiede der Albuminurie zum WT. Ebenfalls beobachteten wir keine signifikanten Unterschiede des Gesamt-Proteins im Urin bei 8-10 Wochen (*Abbildung S6 der Originalpublikation*). Als Goldstandard der Nierenfunktion bestimmten wir außerdem die Plasma-Inulin-clearance im Alter von 16 Wochen, auch hier zeigten sich keine signifikanten Differenzen ( $5,0 \pm 0,51$  vs. WT  $4,8 \pm 0,31$   $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  KG; *Abbildung 5e der Originalpublikation*).

Histologisch zeigten sich demgegenüber bei  $prcp^{gt/gt}$ -Tieren im Alter von 31-34 Wochen eine Vergrößerung der glomerulären Fläche und eine Expansion der mesangialen Matrix als Zeichen einer glomerulären Schädigung (*Abbildung 5a-d der Originalpublikation*). Die glomeruläre Zellularität und tubulointerstitielle Fibrose hingegen blieben unberührt.

### 4.3.3 RAS-Peptide

In keinem der Modelle traten signifikante Veränderungen der gemessenen Konzentrationen von Ang II und Ang(1-7) auf:

Die per RIA gemessene Ang II-Konzentration der GST090  $prcp^{gt/gt}$ -Tiere betrug im Plasma  $93,5 \pm 23,8$  vs. WT  $82,8 \pm 28,8$  pg/ml; in der Niere  $3,9 \pm 0,6$  vs. WT  $5,8 \pm 1,1$  pg/mg Protein und im Herz  $7,1 \pm 1,3$  vs. WT  $7,2 \pm 1,5$  pg/mg Protein (*Abbildung 3a-c der Originalpublikation*).

Die per RIA gemessene Ang(1-7)-Konzentration der GST090  $prcp^{gt/gt}$ -Tiere betrug im Plasma  $27,3 \pm 9,2$  vs. WT  $37,3 \pm 6,3$  pg/ml; in der Niere  $135,9 \pm 17,5$  vs. WT  $95,4 \pm 19,1$  pg/mg Protein; und im Herz  $140,0 \pm 24,4$  vs. WT  $74,6 \pm 32,0$  pg/mg Protein (*Abbildung 3d-f der Originalpublikation*).

Auch im KST302  $prcp^{gt/gt}$ -Modell konnten per ELISA keine statistisch signifikanten Änderungen der Ang II-Konzentration nachgewiesen werden, im Plasma beobachteten wir  $4,8 \pm 1,6$  vs. WT  $3,4 \pm 1,2$  pg/ml und in der Niere  $0,18 \pm 0,061$  vs. WT  $0,15 \pm 0,039$  pg/mg Protein (*Abbildung S4a/b der Originalpublikation*).

#### 4.3.4 RAS-Enzyme und -Rezeptoren

Der genetische Mangel von PRCP könnte kompensatorische Änderungen der alternativen Pathways des Ang II-Abbaus nach sich ziehen. Daher untersuchten wir die enzymatische Aktivität von APA, ACE2 und NEP in KST302-Linie durch fluorometrische Assays (*Abbildung S4c-f der Originalpublikation*):

KST302  $prcp^{gt/gt}$ -Mäuse zeigten keine signifikant veränderte Serum-Aktivität von APA ( $38 \pm 3,2$  vs. WT  $48 \pm 5,1$  RFU/h/ $\mu$ l) oder ACE2 ( $0,96 \pm 0,074$  vs. WT  $0,79 \pm 0,036$  RFU/h/ $\mu$ l).

Im Nierenkortex zeigte sich ein statistisch signifikanter, wenn auch moderater Abfall der ACE2-Aktivität ( $prcp^{gt/gt}$   $28 \pm 1,1$  vs. WT  $33 \pm 2,1$  RFU/h/ $\mu$ g Protein). Dieser Befund war überraschend, da zumindest aus der Perspektive des Ang II-Metabolismus eher eine Zunahme der ACE2-Aktivität zu erwarten gewesen wäre.

Bezüglich der Aktivität von APA und NEP im Nierenkortex hingegen fanden wir keine signifikanten Unterschiede (APA:  $565 \pm 28$  vs. WT  $646 \pm 45$  RFU/h/ $\mu$ g; NEP:  $0,24 \pm 0,014$  vs. WT  $0,27 \pm 0,035$  RFU/h/ $\mu$ g Protein).

Ergänzend wurde die im GST090-Modell per mRNA-Analyse die Expression der wichtigsten Rezeptoren für Ang II und Ang(1-7) untersucht, hier zeigten sich weder renal noch kardial signifikante Veränderungen der Genexpression des AT<sub>1</sub>- oder Mas-Rezeptors (*Abbildung S5 der Originalpublikation*).

#### 4.3.5 Renale Lokalisation von PRCP im WT

Hinsichtlich der Organverteilung von PRCP beobachteten wir sowohl auf mRNA-Ebene (RT-PCR) als auch auf Protein-Ebene (enzymatische Aktivität) in WT-Mäusen vom C57BL/6 bzw. FVB-Stamm eine starke Expression in der Niere. Die genauere Lokalisation innerhalb der Niere wurde weiter mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht (in C57BL/6). Es zeigte sich eine starke Expression im kortikalen Sammelrohr unter Ko-Lokalisation mit der  $\alpha$ 4-Einheit der H<sup>+</sup>-ATPase, einem Marker für  $\alpha$ -Schaltzellen (*Abbildung 4 der Originalpublikation*).

## 4.4 Diskussion und Ausblick

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der (Patho-)Physiologie von PRCP und ist in erster Linie als grundlagenwissenschaftliche Arbeit einzuordnen. Für die eingehende Bewertung und Diskussion der Ergebnisse wird auf die Originalpublikation in Kapitel 7 verwiesen. Ergänzend gibt dieser Abschnitt einen orientierenden Ausblick auf mögliche klinische Anwendungen von PRCP.

Der hypertensive Phänotyp der  $prcp^{gt/gt}$ -Mäuse wirft die Frage auf, ob PRCP auch im menschlichen Organismus an der Kreislauf-Homöostase bzw. an der Dysregulation bei kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt ist. In der Tat wurden genetische PRCP- Polymorphismen sowohl mit der Inzidenz der essentiellen Hypertonie als auch mit dem Therapieansprechen auf den ACE-Inhibitor Benazepril in Verbindung gebracht (Wu u. a., 2013) (Zhang u. a., 2009). Arterielle Hypertonie ist mit einer Prävalenz von ca. 1/3 in der erwachsenen Allgemeinbevölkerung eine der häufigsten Volkskrankheiten und als Risikofaktor für einen erheblichen Teil der kardiovaskulären Mortalität und Morbidität mitverantwortlich (Lewington u. a., 2002). Nur bei einem relativ kleinen Prozentsatz der Patienten mit AHT liegt ein sekundärer Hypertonus mit klinisch eruierbarer und kausal behandelbarer Ursache vor (z.B. Nierenarterienstenose oder Hyperaldosteronismus). Bei der überwiegenden Mehrheit der Fälle hingegen besteht eine sogenannte essentielle, multifaktoriell bedingte Hypertonie, die eine medikamentöse Dauertherapie notwendig macht. Trotz der anerkannten pathophysiologischen Bedeutung der arteriellen Hypertonie bleibt der Therapieerfolg in der klinischen Praxis oftmals unzureichend (Neuhauser u. a., 2017). Dies ist nur teilweise auf eingeschränkte Therapieadhärenz zurückzuführen. Denn es gibt Patienten, die trotz guter Therapieadhärenz mit den etablierten Erstlinientherapeutika ( $Ca^{2+}$ -Antagonisten, ACE-Inhibitoren,  $AT_1$ -Rezeptorblocker, Diuretika und  $\beta$ -Blocker) keine ausreichende Blutdrucksenkung erreichen. In diesen Fällen verbleibt der Rückgriff auf Medikamente der 2. Wahl mit ungünstigerem Verträglichkeits-/Sicherheitsprofil. Daher erscheint die Entwicklung neuer Therapeutika gegen AHT klinisch geboten.

Im Vergleich der verschiedenen antihypertensiv wirksamen Substanzklassen haben ACE-Inhibitoren und später auch  $AT_1$ -Rezeptorblocker seit der Markteinführung von Captopril 1981 stetig an Bedeutung gewonnen, da sie sich neben einem exzellenten Sicherheitsprofil auch durch den Nebeneffekt der Nephroprotektion auszeichnen. Somit erscheint es opportun, nach weiteren Therapeutika im RAS zu suchen.



Um PRCP in diesem Kontext unmittelbar therapeutisch auszunutzen, wäre aufgrund seiner Funktion im RAS-Peptidnetzwerk (Abbau der Vasopressoren Ang II/III) und angesichts der Erkenntnisse im  $prcp^{gt/gt}$ -Mausmodell eine Steigerung der PRCP-Aktivität erforderlich. Aktuell ist keine Substanz bekannt, die die katalytische Aktivität von PRCP steigert. Dank der Fortschritte auf dem Gebiet der Biotechnologie ist heute neben den althergebrachten small molecules zur Modulierung endogener Stoffe auch die Zufuhr von exogenen Proteinen als weitere Form der Pharmakotherapie möglich. So wurde im RAS-Umfeld vor kurzem eine Phase II-Studie zur Anwendung von rekombinantem humanen ACE2 bei Patienten im akuten Lungenversagen veröffentlicht (Khan u. a., 2017). Angesichts der ausgeprägten Präferenz von PRCP für das saure Milieu mit pH-Optimum bei 5,0 erscheint es allerdings fraglich, ob durch Zufuhr von exogenem PRCP der Ang II-Metabolismus im Plasma (pH 7,4) entscheidend gesteigert werden kann.

Neben der arteriellen Hypertonie und der damit eng verwobenen Präeklampsie, wo ebenfalls PRCP-Veränderungen beobachtet wurden (Wang u. a., 2006), ergeben sich aus aktuellen klinischen Arbeiten weitere Anknüpfungspunkte für die Aufklärung der Rolle von PRCP unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Bei Patienten mit glomerulären Erkrankungen wurde eine Hochregulation von PRCP in der Niere beobachtet (Krochmal u. a., 2017), angesichts der hier vorgestellten Ergebnisse im  $prcp^{gt/gt}$ -Modell möglicherweise eine kompensatorische Reaktion auf einen renalen Insult. In einer weiteren Arbeit wird die Rolle von PRCP-Polymorphismen als kardiovaskulärer Risikofaktor beleuchtet (Gittleman u. a., 2016). Auf Protein-Ebene berichteten zwei Gruppen über erhöhte PRCP-Plasmalevel bei Patienten mit metabolischem Syndrom (Xu u. a., 2012) (Kehoe u. a., 2018). Ob es sich dabei um einen primär-pathophysiologischen oder um einen sekundär-reparativen Effekt handelt ist noch offen, wobei letzteres zumindest angesichts der Daten aus dem Mausmodell wahrscheinlicher erscheint. Schließlich wurde bei Patienten mit ischämischem Schlaganfall eine verringerte PRCP-Serumaktivität mit schlechtem klinischen Outcome und großem Infarkt volumen in Verbindung gebracht (Kehoe u. a., 2015).

## 4.5 Quellenangaben für den Manteltext

- Abeywickrema, P.D., Patel, S.B., Byrne, N.J., Diehl, R.E., Hall, D.L., Ford, R.E., Rickert, K.W., Reid, J.C., Shipman, J.M., Geissler, W.M., Pryor, K.D., SinhaRoy, R., Soisson, S.M., Lumb, K.J., Sharma, S., 2010. Expression, purification and crystallization of human prolylcarboxypeptidase. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66, 702–5. <https://doi.org/10.1107/S1744309110014041>
- Adams, G.N., LaRusch, G. a, Stavrou, E., Zhou, Y., Nieman, M.T., Jacobs, G.H., Cui, Y., Lu, Y., Jain, M.K., Mahdi, F., Shariat-Madar, Z., Okada, Y., D'Alecy, L.G., Schmaier, A.H., 2011. Murine prolylcarboxypeptidase depletion induces vascular dysfunction with hypertension and faster arterial thrombosis. *Blood* 117, 3929–37. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-318527>
- Adams, G.N., Stavrou, E.X., Fang, C., Merkulova, A., Alaiti, M.A., Nakajima, K., Morooka, T., Merkulov, S., Larusch, G. a, Simon, D.I., Jain, M.K., Schmaier, A.H., 2013. Prolylcarboxypeptidase promotes angiogenesis and vascular repair. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-460360>
- Bruschetta, G., Jin, S., Kim, J.D., Diano, S., 2018. Prolyl carboxypeptidase in Agouti-related Peptide neurons modulates food intake and body weight. *Mol. Metab.* 10, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.003>
- Chajkowski, S.M., Mallela, J., Watson, D.E., Wang, J., McCurdy, C.R., Rimoldi, J.M., Shariat-Madar, Z., 2011. Highly selective hydrolysis of kinins by recombinant prolylcarboxypeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.036>
- Duan, L., Motchoulski, N., Danzer, B., Davidovich, I., Shariat-Madar, Z., Levenson, V. V., 2011. Prolylcarboxypeptidase regulates proliferation, autophagy, and resistance to 4-hydroxytamoxifen-induced cytotoxicity in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 286, 2864–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143271>
- Duan, L., Ying, G., Danzer, B., Perez, R.E., Shariat-Madar, Z., Levenson, V. V., Maki, C.G., 2014. The prolyl peptidases PRCP/PREP regulate IRS-1 stability critical for rapamycin-induced feedback activation of PI3K and AKT. *J. Biol. Chem.* 289, 21694–21705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.550038>
- Gittleman, H.R., Merkulova, A., Alhalabi, O., Stavrou, E.X., Veigl, M.L., Barnholtz-Sloan, J.S., Schmaier, A.H., 2016. A Cross-sectional Study of KLKB1 and PRCP Polymorphisms in Patient Samples with Cardiovascular Disease. *Front. Med.* 3, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2016.00017>

- Grobe, N., Leiva, O., Morris, M., Elased, K.M., 2015. Loss of prolyl carboxypeptidase in two-kidney, one-clip goldblatt hypertensive mice. *PLoS One* 10, e0117899.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117899>
- Gurley, S.B., Coffman, T.M., 2008. Angiotensin-converting enzyme 2 gene targeting studies in mice: mixed messages. *Exp. Physiol.* 93, 538–42.  
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.040014>
- Holappa, M., Vapaatalo, H., Vaajanen, A., 2017. Many Faces of Renin-angiotensin System - Focus on Eye. *Open Ophthalmol. J.* 11, 122–142.  
<https://doi.org/10.2174/1874364101711010122>
- Jackman, H.L., Tan, F., Schraufnagel, D., Dragović, T., Dezső, B., Becker, R.P., Erdős, E.G., 1995. Plasma membrane-bound and lysosomal peptidases in human alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13, 196–204.
- Javerzat, S., Franco, M., Herbert, J., Platonova, N., Peille, A.-L., Pantesco, V., De Vos, J., Assou, S., Bicknell, R., Bikfalvi, A., Hagedorn, M., 2009. Correlating global gene regulation to angiogenesis in the developing chick extra-embryonic vascular system. *PLoS One* 4, e7856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007856>
- Jeong, J.K., Diano, S., 2014. Prolyl carboxypeptidase mRNA expression in the mouse brain. *Brain Res.* 1542, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.031>
- Jeong, J.K., Szabo, G., Kelly, K., Diano, S., 2012. Prolyl carboxypeptidase regulates energy expenditure and the thyroid axis. *Endocrinology* 153, 683–9.  
<https://doi.org/10.1210/en.2011-1399>
- Kehoe, K., Brouns, R., Verkerk, R., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Hendriks, D., De Meester, I., 2015. Prolyl carboxypeptidase activity decline correlates with severity and short-term outcome in acute ischemic stroke. *Neurochem. Res.* 40, 81–8.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-014-1468-y>
- Kehoe, K., Noels, H., Theelen, W., De Hert, E., Xu, S., Verrijken, A., Arnould, T., Franssen, E., Hermans, N., Lambeir, A.M., Venge, P., Van Gaal, L., De Meester, I., 2018. Prolyl carboxypeptidase activity in the circulation and its correlation with body weight and adipose tissue in lean and obese subjects. *PLoS One* 13, 1–15.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197603>
- Kehoe, K., Van Elzen, R., Verkerk, R., Sim, Y., Van der Veken, P., Lambeir, A.M., De Meester, I., 2016. Prolyl carboxypeptidase purified from human placenta: its characterization and identification as an apelin-cleaving enzyme. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1864, 1481–1488.

- Khan, A., Benthin, C., Zeno, B., Albertson, T.E., Boyd, J., Christie, J.D., Hall, R., Poirier, G., Ronco, J.J., Tidswell, M., Hardes, K., Powley, W.M., Wright, T.J., Siederer, S.K., Fairman, D.A., Lipson, D.A., Bayliffe, A.I., Lazaar, A.L., 2017. A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care* 21, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1823-x>
- Krochmal, M., Cisek, K., Filip, S., Markoska, K., Orange, C., Zoidakis, J., Gakiopoulou, C., Spasovski, G., Mischak, H., Delles, C., Vlahou, A., Jankowski, J., 2017. Identification of novel molecular signatures of IgA nephropathy through an integrative -omics analysis. *Sci. Rep.* 7, 9091. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09393-w>
- Kumamoto, K., Stewart, T.A., Johnson, A.R., Erdös, E.G., 1981. Prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) in human lung and cultured cells. *J. Clin. Invest.* 67, 210–5. <https://doi.org/10.1172/JCI110015>
- Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R., Collins, R., Prospective Studies Collaboration, 2002. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360, 1903–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11911-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11911-8)
- Liu, J., Hakucho, A., Fujimiya, T., 2015. Angiotensinase C mRNA and Protein Downregulations Are Involved in Ethanol-Deteriorated Left Ventricular Systolic Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biomed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/409350>
- Maier, C., Schadock, I., Haber, P.K., Wysocki, J., Ye, M., Kanwar, Y., Flask, C.A., Yu, X., Hoit, B.D., Adams, G.N., Schmaier, A.H., Bader, M., Batlle, D., 2017. Prolylcarboxypeptidase deficiency is associated with increased blood pressure, glomerular lesions, and cardiac dysfunction independent of altered circulating and cardiac angiotensin II. *J. Mol. Med.* 95, 473–486. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>
- Marangoni, R.A., Santos, R.A., Piccolo, C., 2014. Deficient prolylcarboxypeptidase gene and protein expression in left ventricles of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Peptides* 61, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.08.016>
- Moreira, C.R.C., Schmaier, A.H.A., Mahdi, F., da Motta, G., Nader, H.B., Shariat-Madar, Z., 2002. Identification of prolylcarboxypeptidase as the cell matrix-associated prekallikrein activator. *FEBS Lett.* 523, 167–70.
- Neuhauser, H., Kuhnert, R., Born, S., 2017. 12-Monats-Prävalenz von Bluthochdruck in Deutschland. *J. Heal. Monit.* 2, 57–63. <https://doi.org/10.17886/RKI-GBE-2017-007>

- O'Donoghue, A., Eroy-Reveles, A., 2012. Global identification of peptidase specificity by multiplex substrate profiling. *Nat. Methods* 9. <https://doi.org/10.1038/nMeth.2182>
- Ody, C.E., Marinkovic, D. V, Hammon, K.J., Stewart, T. a, Erdös, E.G., 1978. Purification and properties of prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) from human kidney. *J. Biol. Chem.* 253, 5927–31.
- Qi, Z., Whitt, I., Mehta, A., Jin, J., Zhao, M., Harris, R.C., Fogo, A.B., Breyer, M.D., 2004. Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F590-6. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00324.2003>
- Santos, R.A.S., Sampaio, W.O., Alzamora, A.C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., Campagnole-Santos, M.J., 2018. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol. Rev.* 98, 505–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016>
- Schröder, B.A., Wrocklage, C., Hasilik, A., Saftig, P., 2010. The proteome of lysosomes. *Proteomics* 10, 4053–76. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000196>
- Shariat-Madar, Z., Mahdi, F., Schmaier, A.H., 2004. Recombinant prolylcarboxypeptidase activates plasma prekallikrein. *Blood* 103, 4554–61. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2510>
- Soisson, S.M., Patel, S.B., Abeywickrema, P.D., Byrne, N.J., Diehl, R.E., Hall, D.L., Ford, R.E., Reid, J.C., Rickert, K.W., Shipman, J.M., Sharma, S., Lumb, K.J., 2010. Structural definition and substrate specificity of the S28 protease family: the crystal structure of human prolylcarboxypeptidase. *BMC Struct. Biol.* 10, 16. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-10-16>
- Tamaoki, J., Sugimoto, F., Tagaya, E., Isono, K., Chiyotani, A., Konno, K., 1994. Angiotensin II 1 receptor-mediated contraction of pulmonary artery and its modulation by prolylcarboxypeptidase. *J. Appl. Physiol.* 76, 1439–44.
- Tanco, S., Lorenzo, J., Garcia-Pardo, J., Degroev, S., Martens, L., Aviles, F.X., Gevaert, K., Van Damme, P., 2013. Proteome-derived Peptide Libraries to Study the Substrate Specificity Profiles of Carboxypeptidases. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 2096–110. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.023234>
- Wallingford, N., Perroud, B., Gao, Q., Coppola, A., Gyengesi, E., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Diamant, A., Haus, K.A., Shariat-Madar, Z., Mahdi, F., Wardlaw, S.L., Schmaier, A.H., Warden, C.H., Diano, S., 2009. Prolylcarboxypeptidase regulates food intake by inactivating  $\alpha$ -MSH in rodents. *J. Clin. Invest.* 119, 2291–303.

<https://doi.org/10.1172/JCI37209>.

- Wang, L., Feng, Y., Zhang, Y., Zhou, H., Jiang, S., Niu, T., Wei, L.-J., Xu, X., Xu, X., Wang, X., 2006. Prolylcarboxypeptidase gene, chronic hypertension, and risk of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195, 162–71. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.01.079>
- Wang, L., Sui, L., Panigrahi, S.K., Meece, K., Xin, Y., Kim, J., Gromada, J., Doege, C.A., Wardlaw, S.L., Egli, D., Leibel, R.L., 2017. PC1/3 Deficiency Impacts Pro-opiomelanocortin Processing in Human Embryonic Stem Cell-Derived Hypothalamic Neurons. *Stem Cell Reports* 8, 264–277. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.12.021>
- Wu, Y., Yang, H., Yang, B., Yang, K., Xiao, C., 2013. Association of polymorphisms in prolylcarboxypeptidase and chymase genes with essential hypertension in the Chinese Han population. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* 14, 263–70. <https://doi.org/10.1177/1470320312448949>
- Xu, S., Lind, L., Zhao, L., Lindahl, B., Venge, P., 2012. Plasma prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) is increased in obesity and diabetes mellitus and related to cardiovascular dysfunction. *Clin. Chem.* 58, 1110–5. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.179291>
- Yang, H.Y., Erdös, E.G., Chiang, T.S., 1968. New enzymatic route for the inactivation of angiotensin. *Nature* 218, 1224–6.
- Zhang, Y., Hong, X., Xing, H., Li, J., Huo, Y., Xu, X., 2009. E112D polymorphism in the prolylcarboxypeptidase gene is associated with blood pressure response to benazepril in Chinese hypertensive patients. *Chin. Med. J. (Engl.)* 122, 2461–5.
- Zhao, X., Southwick, K., Cardasis, H.L., Du, Y., Lassman, M.E., Xie, D., El-Sherbeini, M., Geissler, W.M., Pryor, K.D., Verras, A., Garcia-Calvo, M., Shen, D.-M., Yates, N. a, Pinto, S., Hendrickon, R.C., 2010. Peptidomic profiling of human cerebrospinal fluid identifies YPRPIHPA as a novel substrate for prolylcarboxypeptidase. *Proteomics* 10, 2882–6. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000145>
- Zhu, L., Carretero, O. a, Xu, J., Wang, L., Harding, P., Rhaleb, N.-E., Yang, J.J., Summers, C., Yang, X.-P., 2012. Angiotensin II type 2 receptor-stimulated activation of plasma prekallikrein and bradykinin release: role of SHP-1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H2553-9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01157.2011>
- Zhu, L., Carretero, O.A., Liao, T.-D., Harding, P., Li, H., Summers, C., Yang, X.-P., 2010. Role of prolylcarboxypeptidase in angiotensin II type 2 receptor-mediated bradykinin release in mouse coronary artery endothelial cells. *Hypertension* 56, 384–90. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.155051>

## **5 Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Christoph Maier, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Kardiovaskuläre Funktion, renaler Phänotyp und Angiotensin II-Metabolismus PRCP-defizienter Mäuse* 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, 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 mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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: C. Maier, I. Schadock, P. K. Haber, J. Wysocki, M. Ye, Y. Kanwar, C. A. Flask, X. Yu, B. D. Hoit, G. N. Adams, A. H. Schmaier, M. Bader, D. Batlle, *Prolylcarboxypeptidase deficiency is associated with increased blood pressure, glomerular lesions, and cardiac dysfunction independent of altered circulating and cardiac angiotensin II*, J Mol Med. 2017 May;95(5):473-486.

Beitrag im Einzelnen:

- Entwurf der Hypothese
- Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente mit rekombinantem PRCP:
  - Charakterisierung der PRCP-Aktivität in Abhängigkeit von pH und Inhibitoren
  - Ang II-Degradation mit rPRCP
- Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente in C57BL/6-WT Mäusen zur Gewebeverteilung von PRCP
- Planung, Durchführung und Auswertung von Experimenten in  $prcp^{gt/gt}$ -Mäusen/WT-Kontrolltieren:
  - Blutdruckmessung in-vivo
  - Nierenfunktion/Inulin-Clearance in-vivo
  - Aktivität von RAS-Enzymen
  - Angiotensin-Peptidkonzentrationen
  - Proteinurie/Albuminurie
- Statistische Auswertung und graphische Aufarbeitung
- Verfassen des Manuskripts sowie der Revisionen

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden



## 6 Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"MEDICINE, RESEARCH and EXPERIMENTAL"**

Selected Category Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 133 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE MEDICINE	75,461	32.621	0.171980
2	Science Translational Medicine	26,691	16.710	0.126450
3	Annual Review of Medicine	6,111	14.970	0.010320
4	JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION	107,818	13.251	0.165270
5	TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE	9,213	11.021	0.019720
6	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE	62,537	10.790	0.078310
7	EMBO Molecular Medicine	6,402	10.293	0.026160
8	Theranostics	5,761	8.537	0.015710
9	MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE	5,157	7.344	0.009700
10	MOLECULAR THERAPY	16,013	7.008	0.029180
11	Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine	9,338	6.500	0.015670
12	Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology	2,088	6.350	0.004260
13	EBioMedicine	3,378	6.183	0.015290
14	Molecular Therapy-Nucleic Acids	2,180	5.660	0.008200
15	EXPERIMENTAL AND MOLECULAR MEDICINE	3,538	5.584	0.007100
16	ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation	1,261	5.232	0.001990
17	CLINICAL SCIENCE	10,321	5.220	0.013630
18	mAbs	3,767	5.165	0.011220
19	Stem Cell Research & Therapy	4,578	4.963	0.012630
20	JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE-JMM	7,120	4.938	0.011400
21	Translational Research	3,416	4.880	0.009000
22	XENOTRANSPLANTATION	1,479	4.717	0.002550
23	Cancer Biology & Medicine	816	4.607	0.002330
24	MOLECULAR PHARMACEUTICS	15,754	4.556	0.029080
25	JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE	10,938	4.302	0.015770
26	LABORATORY INVESTIGATION	10,461	4.254	0.010460
27	HUMAN GENE THERAPY	5,559	4.241	0.007690

## 7 Publikation

C. Maier, I. Schadock, P. K. Haber, J. Wysocki, M. Ye, Y. Kanwar, C. A. Flask, X. Yu,  
B. D. Hoit, G. N. Adams, A. H. Schmaier, M. Bader, D. Battle:

Prolylcarboxypeptidase deficiency is associated with increased blood pressure, glomerular  
lesions, and cardiac dysfunction independent of altered circulating and cardiac angiotensin II.

J Mol Med. 2017 May;95(5):473-486.

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>



<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>



<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>



<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1513-9>

## **8 Lebenslauf**

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

## 9 Publikationsliste

### Publikationen

C. Maier, I. Schadock, P. K. Haber, J. Wysocki, M. Ye, Y. Kanwar, C. A. Flask, X. Yu, B. D. Hoit, G. N. Adams, A. H. Schmaier, M. Bader, D. Battle:

*Prolylcarboxypeptidase deficiency is associated with increased blood pressure, glomerular lesions, and cardiac dysfunction independent of altered circulating and cardiac angiotensin II.*

J Mol Med. 2017 May;95(5):473-486.

P. K. Haber, M. Ye, J. Wysocki, C. Maier, S. Haque, D. Battle:

*Angiotensin-Converting Enzyme 2–Independent Action of Presumed Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activators.*

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

J. Wysocki, L. Garcia-Halpin, M. Ye, C. Maier, K. Sowers, K. Burns, D. Battle:

*Regulation of Urinary ACE2 in Diabetic Mice.*

Am J Physiol Renal Physiol. 2013 Aug 15;305(4):F600-11.

### Kongressbeiträge

J. Wysocki, K. Evora, M. Salem, C. Maier, M. Ye, D. Battle:

*ACE2-Independent Sex Differences In Oxidative Stress (abstract)*

Hypertension. 2014; 64: A612

Posterpräsentation, American Heart Association High Blood Pressure Research 2014 Scientific Sessions; San Francisco, CA.

C. Maier, J. Wysocki, M. Ye, P. K. Haber, A. H. Schmaier, D. Battle:

*Blood pressure and kidney function in PRCP deficient mice (abstract)*

Hypertension. 2013; 62: A630

Posterpräsentation, American Heart Association High Blood Pressure Research 2013 Scientific Sessions; New Orleans, LA.

J. Wysocki, P. K. Haber, M. Ye, C. Maier, M. J. Osborn, D. Battle:

*Effective And Sustained ACE2 Delivery Using Minicircles Technology (abstract)*

Hypertension. 2013; 62: A603

Posterpräsentation, American Heart Association High Blood Pressure Research 2013

Scientific Sessions; New Orleans, LA.

C. Maier, J. Wysocki, M. Ye, L. Garcia-Halpin, D. Battle:

*Divergence of activities of ACE and ACE2 in the urine from diabetic mice: Implications for kidney Ang II metabolism (abstract)*

Posterpräsentation, American Society of Hypertension 2013 Annual Meeting; San Francisco, CA.

## 10 Danksagung

*„Wenn ich weiter gesehen habe, so deshalb, weil ich auf den Schultern von Riesen stehe“*

*Isaac Newton*

Ich danke Prof. Michael Bader, der dieses Projekt vom ersten Tag an vertrauensvoll unterstützte und immer exzellent betreute. Gleichmaßen danke ich Prof. Daniel Batlle für die enge persönliche Betreuung und für die familiäre Aufnahme in Chicago. Die rückhaltlose Förderung durch meinen Doktorvater und meinen Betreuer hat diese Arbeit erst ermöglicht.

Dem Team des Batlle-Labors an der Northwestern University, allen Mitstreitern und Ko-Autoren aus Berlin, Chicago und Cleveland gebührt mein Dank für eine tolle Zeit im Labor, die reibungslose Zusammenarbeit und den Austausch im Projekt. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Jan Wysocki, der mich mit der experimentellen Arbeitsweise vertraut machte. Ohne seine unendliche Geduld, ohne seinen freundschaftlichen Rat im Labor und darüber hinaus wäre das Projekt nicht dieser Form realisiert worden.

Prof. Hilmar Stolte (r.i.p.) ebnete nicht nur den Weg für die finanzielle Förderung dieses Unterfangens durch den DAAD, sondern brachte im BMEP-Programm auch eine vielfältige Gruppe junger Forscher zum wissenschaftlichen und menschlichen Austausch zusammen.

Meine Familie und meine Freunde begleiten mich nicht erst seit dieser Dissertation. Auch zu ihr haben sie durch ihren Beistand und die ein oder andere Ermunterung beigetragen.