

Aus der Klinik für Pädiatrische Kardiologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. Hashim Abdul-Khaliq

# **Analyse von sACE2 und sTMPRSS2 bei Kindern und Erwachsenen mit und ohne COVID-19**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2023**

vorgelegt von: Sarah Isabella Wissing  
geboren am: 28.06.1997 in München

Tag der Promotion: 27.07.2023  
Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hashim Abdul-Khaliq  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Boehm

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung und Abstract.....	1
1.1	Analyse von sACE2 und sTMPRSS2 bei Kindern und Erwachsenen mit und ohne COVID-19 .....	1
1.2	Analysis of sACE2 and sTMPRSS2 in children and adults with and without COVID-19 .....	2
2	Einleitung .....	3
2.1	Allgemeines zum Coronavirus SARS-CoV-2 und COVID-19 .....	3
2.1.1	Ausbruch der Pandemie und Entwicklung .....	3
2.1.2	Charakteristika von SARS-CoV-2 .....	6
2.1.2.1	Virusvarianten .....	8
2.1.2.2	Virusreplikationszyklus.....	8
2.1.3	COVID-19.....	10
2.1.3.1	Übertragung.....	10
2.1.3.2	Charakteristika der Infektion.....	10
2.1.3.3	Diagnostik .....	14
2.1.3.4	Impfung .....	14
2.1.3.5	Therapieansätze .....	15
2.1.3.6	Kinder und Jugendliche in der Pandemie .....	15
2.2	Schlüsselenzyme in der Infektion mit SARS-CoV-2: ACE2 und TMPRSS2.....	18
2.2.1	Angiotensin-converting-enzyme 2 (ACE2).....	18
2.2.1.1	Pathophysiologische Bedeutung von ACE2.....	20
2.2.1.2	Einflussfaktoren auf ACE2 – Krankheiten, Alter, Geschlecht.....	20
2.2.1.3	sACE2 und COVID-19 .....	21
2.2.2	Transmembrane protease serine subtype 2 (TMPRSS2).....	22
2.2.2.1	TMPRSS2 und COVID-19 – Pathophysiologie und Therapieansätze .....	22
2.2.2.2	Down-Syndrom und COVID-19 - Spielt TMPRSS2 eine Rolle? .....	23

3	Hypothese .....	23
4	Zielsetzung .....	24
5	Material und Methoden .....	25
5.1	Material .....	25
5.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	25
5.1.2	ELISA-Kits.....	25
5.1.3	Geräte und Software.....	25
5.2	Methoden.....	26
5.2.1	Studiendesign .....	26
5.2.2	Probensammlung .....	26
5.2.2.1	Ausschluss von Proben.....	27
5.2.3	Messung mittels ELISA .....	28
5.2.3.1	sACE2-Messung.....	28
5.2.3.2	sTMPRSS2-Messung .....	29
5.2.4	Statistische Auswertung .....	30
6	Ergebnisse.....	31
6.1	Deskriptive Statistik .....	31
6.2	sACE2 und Geschlecht.....	34
6.3	sACE2 und Alter .....	35
6.4	Unterschiede der sACE2-Konzentration zwischen den Gruppen.....	36
6.5	Vergleich von sACE2 im Serum und im Lithium-Heparin-Plasma .....	38
6.6	Messung von sTMPRSS2.....	38
7	Diskussion .....	39
7.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse .....	39
7.2	Diskussion der Methoden.....	39
7.2.1	Auswahl der Probanden und Studiendesign .....	39
7.2.2	ELISA als Nachweisverfahren .....	40

7.3	Diskussion der Ergebnisse.....	41
7.3.1	Höhere sACE2-Konzentrationen bei COVID-19 und Interpretation .....	41
7.3.2	sACE2 bei Kindern mit und ohne COVID-19 .....	42
7.3.3	sACE2 und Geschlecht.....	43
7.3.4	sACE2 und Down-Syndrom.....	44
7.3.5	sACE2-Werte im Vergleich zu anderen Studien.....	44
7.4	Ausblick .....	45
8	Literaturverzeichnis .....	47
9	Publikationen.....	65
10	Danksagung .....	66
11	Lebenslauf .....	67

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: 7-Tage Inzidenz der SARS-CoV-2-Nachweise/100.000 Einwohner (März 2020 bis Juni 2022).....	5
Abbildung 2: Altersverteilung der 7-Tage-Inzidenz der SARS-CoV-2-Infektionen/100.000 Einwohner (März 2020 bis Juni 2022).....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung von SARS-CoV-2.....	7
Abbildung 4: Replikationszyklus von SARS-CoV-2 (von Ueffing et al.) [195] .....	9
Abbildung 5: Symptome bei COVID-19 .....	12
Abbildung 6: Klinische Verläufe von COVID-19 .....	13
Abbildung 7: Wirkung von ACE2 im Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS).....	19
Abbildung 8: Medianen sACE2-Konzentration (pg/ml) in den verschiedenen Gruppen. ....	33
Abbildung 9: Medianen sACE2-Konzentration (pg/ml) nach Geschlecht.....	34
Abbildung 10: Zusammenhang von sACE2-Konzentration und Alter bei Patienten mit COVID-19.....	35
Abbildung 11: Vergleich der medianen sACE2-Konzentrationen bei Kindern und Erwachsenen mit und ohne COVID-19.....	36
Abbildung 12: Mediane sACE2-Konzentration zwischen Probanden mit Down-Syndrom, gesunden Kontrollen und Erwachsenen mit COVID-19.....	37

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Symptome bei COVID-19.....	11
Tabelle 2: Übersicht über die Studienpopulation.....	31
Tabelle 3: Einfluss des Geschlechts auf die Höhe der sACE2-Konzentration innerhalb verschiedener Gruppen .....	35
Tabelle 4: Übersicht über den Vergleich der sACE2-Konzentration innerhalb der verschiedenen Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test.....	38

## Abkürzungen

ACE	angiotensin converting enzyme
ADAM17	adisintegrin-like and metalloproteinase 17
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AT1	Angiotensin I
AT2	Angiotensin II
CI	Konfidenzintervall
COVID-19	corona virus disease 2019
E-Protein	Envelope-Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
IQR	Interquartilsabstand (25.-75.-Perzentile)
M-Protein	membrane-protein
mACE2	Membranständiges angiotensin converting enzyme 2
MERS	middle east respiratory syndrome-related coronavirus
mRNA	messenger RNA
PIMS	paediatric inflamatory multisystem syndrom
R <sub>0</sub>	Reproduktionszahl
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rACE2	Rekombinantes angiotensin converting enzyme 2
RBD	Rezeptor-Bindungs-Domäne
RKI	Robert Koch-Institut
S-Protein	Spike-Protein
sACE2	soluble angiotensin converting enzyme 2
SARS	Schweres akutes respiratorisches Syndrom
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
TMPRSS2	transmembrane protease serine subtype 2
UTR	Untranslatierte Region
VOC	variant of concern
VOI	variant of interest

# 1 Zusammenfassung und Abstract

## 1.1 Analyse von sACE2 und sTMPRSS2 bei Kindern und Erwachsenen mit und ohne COVID-19

Die durch das severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) ausgelöste coronavirus disease 2019 (COVID-19) Pandemie sorgt seit Dezember 2019 weltweit für Krankheitsfälle mit zum Teil letalem Verlauf. Während verschiedene Risikofaktoren, wie höheres Alter, männliches Geschlecht, Adipositas und Vorerkrankungen für einen schweren Krankheitsverlauf bekannt sind [125,194], ist es weitgehend unklar welche pathophysiologischen Unterschiede dem Risikoanstieg zugrunde liegen. Auffällig ist der milde Krankheitsverlauf insbesondere bei Kindern [122]. Schlüsselenzyme für die Infektion mit SARS-CoV-2 sind das angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), das als Rezeptor für SARS-CoV-2 dient, und die transmembrane protease serine subtype 2 (TMPRSS2) die durch Spaltung des viralen Spike-Proteins die Fusion des Virus mit der Zelle unterstützt [79]. Das gibt Grund zur Annahme, dass Unterschiede in der Verteilung beider Enzyme Hinweise auf verschiedene Krankheitsverläufe geben können.

Ziel dieser Arbeit war es, durch Messung der löslichen TMPRSS2- und ACE2-Konzentrationen (sTMPRSS2 bzw. sACE2) im Blut, Einblicke in die Bedeutung beider Enzyme als pathophysiologischen Risikofaktor für einen schweren Verlauf von COVID-19 zu erhalten. Hierzu wurden 576 Probanden in die Studie eingeschlossen, davon waren etwas weniger als die Hälfte (285) Kinder und Jugendliche. 41 Probanden, davon zehn Kinder, waren an COVID-19 erkrankt, 63 Probanden dienten als gesunde Kontrollen und 12 Probanden hatten das Down-Syndrom. Die restlichen Proben stammten von kranker Erwachsenen (197) bzw. Kindern (263). Mittels (ELISA) wurde die sACE2 und sTPRSS2-Konzentration in Lithium-Heparin-Plasma oder Serum gemessen und zwischen den Gruppen, und nach Alter und Geschlecht, verglichen.

Patienten mit COVID-19 hatten signifikant erhöhte sACE2-Werte im Vergleich zu Gesunden, und wiesen, im Vergleich zu allen anderen Gruppen, die höchste sACE2-Konzentration auf. Kinder mit COVID-19 hatten niedrigere sACE2-Werte als Erwachsene mit COVID-19 und die sACE2-Konzentration stieg mit dem Alter an. Probanden mit Down-Syndrom und Probanden mit internistischen Vorerkrankung hatten signifikant höhere sACE2-Level als Gesunde. Die sACE2-Konzentration bei männlichen Probanden war höher als die der weiblichen Probanden, wenn gleich der Unterschied nicht signifikant war. Die TMPRSS2-Messung verlief frustan. Die Ergebnisse zeigen, dass Risikogruppen (Vorerkrankung, Down-Syndrom) höhere sACE2-Level haben, wohingegen Kinder, die meist mild an COVID-19 erkranken, niedrigere sACE2-Level als Erwachsene mit COVID-19 aufweisen. Das gibt Hinweise auf die Bedeutung von sACE2 als Risikofaktor bei COVID-19 und bietet einen Erklärungsansatz für den milden Verlauf von COVID-19 bei Kindern.

Um die Ergebnisse weiter zu untersuchen sind prospektive Studien zur sACE2-Konzentration bei Personen mit und ohne COVID-19 notwendig. Dadurch könnte die sACE2-Konzentration als Risikomarker für COVID-19 im klinischen Setting an Bedeutung gewinnen.

## **1.2 Analysis of sACE2 and sTMPRSS2 in children and adults with and without COVID-19**

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) is responsible for illness and cases of death all over the world since it emerged in December 2019. While various risk factors for a severe course of the disease, such as higher age, male gender, obesity and preexisting illnesses are known [125,194], it is largely unclear which pathophysiological differences cause the increased risk. Notably the mild course of the disease in children is conspicuous [122]. Key enzymes for infection with SARS-CoV-2 are angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), which serves as a receptor for SARS-CoV-2, and transmembrane protease serine subtype 2 (TMPRSS2), which is involved in the fusion with the cell by cleaving the viral spike-protein [79]. Thus, differences in the distribution of both enzymes can provide insights in different courses of COVID-19.

The aim of this study was to gain insights into the relevance of both enzymes as a pathophysiological risk factor for a severe course of COVID-19, by measuring the soluble TMPRSS2 and ACE2 concentrations (sTMPRSS2 and sACE2) in blood samples. Therefore, 576 individuals were included in the study, about half of them (285) were children and adolescents. 41, including ten children, suffered from COVID-19, 63 individuals served as healthy controls, and 12 subjects had Down-syndrome. The remaining subjects were sick adults (197) or children (263). The sACE2 and sTMPRSS2 concentrations in lithium-heparin-plasma or serum were measured using an ELISA and were compared between the groups, by age and sex.

Patients with COVID-19 had significantly elevated sACE2 levels compared to healthy individuals and had the highest sACE2 concentration of all groups. Children with COVID-19 had lower sACE2 levels than adults with COVID-19, and the level of sACE2 increased with age. Subjects with Down-syndrome, as well as individuals with preexisting internal disease had significantly elevated sACE2 levels compared to healthy individuals. The influence of sex on sACE2 was not significant in the study, but the sACE2 concentration in male individuals was higher than that in female individuals. The TMPRSS2 measurement wasn't successful.

Our results show that risk groups (pre-existing illness, Down-syndrome) have higher sACE2 levels, whereas children, with mostly mild symptoms of COVID-19 present lower sACE2 levels than adults with COVID-19. This could indicate the importance of sACE2 as a risk factor in COVID-19 and it is a possible explanation for the mild course of COVID-19 in children.

To further investigate the results, prospective studies on sACE2 concentrations in individuals with and without COVID-19 are needed. With this, the sACE2 concentration could gain importance as risk marker for COVID-19 in clinical settings. (This abstract has been used in a similar form in a paper published as a part of this thesis [210]).

## **2 Einleitung**

Die nachfolgende Arbeit beschäftigt sich mit ACE2 (angiotensin-converting-enzyme 2) und TMPRSS2 (transmembrane protease serine subtype 2) die Schlüsselenzyme für die Infektion mit SARS-CoV-2 (severe acute respiratory corona virus 2) sind, das die COVID-19 Pandemie verursacht hat. Zuerst werden Charakteristika von SARS-CoV-2 und COVID-19 dargestellt, und anschließend werden ACE2 und TMPRSS2 näher beleuchtet.

### **2.1 Allgemeines zum Coronavirus SARS-CoV-2 und COVID-19**

#### **2.1.1 Ausbruch der Pandemie und Entwicklung**

Im Dezember 2019 kam es in Wuhan, China, zu einer Häufung viraler Pneumonien. Kurze Zeit später konnte ein bis dahin unbekanntes Coronavirus, zunächst 2019-novel Coronavirus (2019-nCoV) genannt, nachgewiesen und dessen Genom entschlüsselt werden [223]. Anhand der Charakteristika des Virus wurde es vom International Committee on Taxonomy of Viruses der Gruppe der severe acute respiratory corona viruses (SARS-CoVs) zugeordnet und in severe acute respiratory corona virus 2 (SARS-CoV-2) umbenannt [69]. Die durch SARS-CoV-2 verursachte Erkrankung wurde von der World Health Organisation (WHO) als „corona-virus disease 2019“ (COVID-19) bezeichnet [212] und zu einer Pandemie erklärt [213].

SARS-CoV-2 ist neben SARS-CoV-1 (severe acute respiratory virus 1) [53] und MERS-CoV (middle east respiratory syndrome-related coronavirus) [219] das dritte Coronavirus, das zu teils letal verlaufenden Infektionen führt.

Innerhalb von kurzer Zeit verbreitete sich SARS-CoV-2 weltweit und führte zur Überlastung der Gesundheitssysteme [182]. Durch die Kontagiosität und die, durch die Neuartigkeit des Virus, fehlende Immunantwort kam es zu einer raschen Ausbreitung des Virus. Zum Schutz der Bevölkerung wurden durch die Politik weitreichende Einschnitte in das öffentliche Leben vorgenommen [97]. Landesspezifisch wurden unterschiedliche Modelle zur Bekämpfung der Pandemie eingesetzt. Als Gemeinsamkeit sind die Instrumente der Kontaktreduktion und Quarantäne zu nennen [186]. Dies führte in Form von Lockdowns zu Einschränkungen im gesamten öffentlichen Leben.

Der Ausbruch der COVID-19-Pandemie hat ökonomische, soziale und psychologische Auswirkungen. So kam es durch Einschränkung des globalen Handels zu einer Destabilisierung der Wirtschaft [8]. Im Zusammenhang mit der Pandemie wurden vermehrt psychische Krankheiten, wie Depressionen und Angststörungen, festgestellt [83,182]

Der Verlauf der Pandemie ist landesspezifisch unterschiedlich. Dies ist begründet durch verschiedene Faktoren wie zum Beispiel Zusammensetzung und Gesundheitsstatus der Bevölkerung, die Belastbarkeit des Gesundheitssystems, klimatische Bedingungen, die die Übertragung des Virus beeinflussen, die Maßnahmen zur Eindämmung der Pandemie und deren Umsetzung, die Finanzkraft und der Zugang zu Impfstoffen und der Impfbereitschaft [41,141]. Zudem muss be-

rücksichtig werden, dass die Erfassung der Krankheitsfälle unterschiedlich valide ist, sodass gerade in Ländern des Globalen Südens von hohen Dunkelziffern auszugehen ist [97,136]. Bis Dezember 2022 wurde das SARS-CoV-2 Virus weltweit bei über 600 Millionen Menschen nachgewiesen und über sechs Millionen Menschen sind im Zusammenhang mit dem Virus verstorben [89].

Nachfolgend soll der Pandemieverlauf in Europa und insbesondere in Deutschland betrachtet werden. (vgl. Abbildung 1: 7-Tage Inzidenz der SARS-CoV-2-Nachweise/100.000 Einwohner (März 2020 bis Juni 2022))

Das Infektionsgeschehen in Deutschland kann in verschiedene Wellen mit unterschiedlichen Charakteristika bezüglich Altersverteilung der Infizierten, der Hospitalisierung und der Auslastung von Intensivstationen unterschieden werden.

Ende Januar 2020 wurde die erste Infektion mit SARS-CoV-2 in Deutschland festgestellt [153]. Im März und April 2020 kam es zur ersten Welle, in der insbesondere ältere Menschen erkrankten und verstarben. Von April bis Mai 2020 wurde ein Lockdown verhängt [18]. Im Oktober 2020 bis März 2021 kam es zur zweiten Welle mit höheren Inzidenzen als in der ersten Welle [155]. Das Altersverhältnis blieb im Wesentlichen unverändert, sodass in der Bevölkerungsgruppe über 80 Jahre der Anteil der hospitalisierten und verstorbenen Personen am höchsten war [172]. Ab Dezember 2020 galt erneut ein Lockdown [20]. Ende Dezember 2020 wurde in der EU der erste Impfstoff (Biontech/Pfizer) gegen COVID-19 zugelassen [139] und es wurde von neuen Virusvarianten berichtet (vgl. 2.1.2.1 Virusvarianten).

In der dritten Welle von März bis Juni 2021 verbreitet sich die alpha-Variante [173]. Durch die rasche Impfung der besonders vulnerablen Bevölkerungsgruppen, also insbesondere älterer Menschen stieg der Anteil der infizierten jüngeren Personen [155] (vgl. Abbildung 2: Altersverteilung der 7-Tage-Inzidenz der SARS-CoV-2-Infektionen/100.000 Einwohner (März 2020 bis Juni 2022)) und die Anzahl der Hospitalisierungen und Todesfälle war geringer [201]. Die Hospitalisierungsrate wurde als Marker der Schwere des Infektionsgeschehens eingeführt [45] und der Lockdown wurde bei niedrigen Hospitalisierungsraten im Mai 2021 aufgehoben [209]. Ab August 2021 zeigte sich erneut ein Anstieg der Infektionszahlen im Rahmen der vierten Welle, die von der Delta-Variante dominiert wurde [156]. Hier stieg insbesondere die Inzidenz bei Kindern und Jugendlichen deutlich an [157]. Ende Dezember 2022 begann die fünfte Welle, mit sehr hohen Inzidenzen, aber im Verhältnis wenigen Todesfällen, in der sich die Omikron-Variante verbreitet [158].

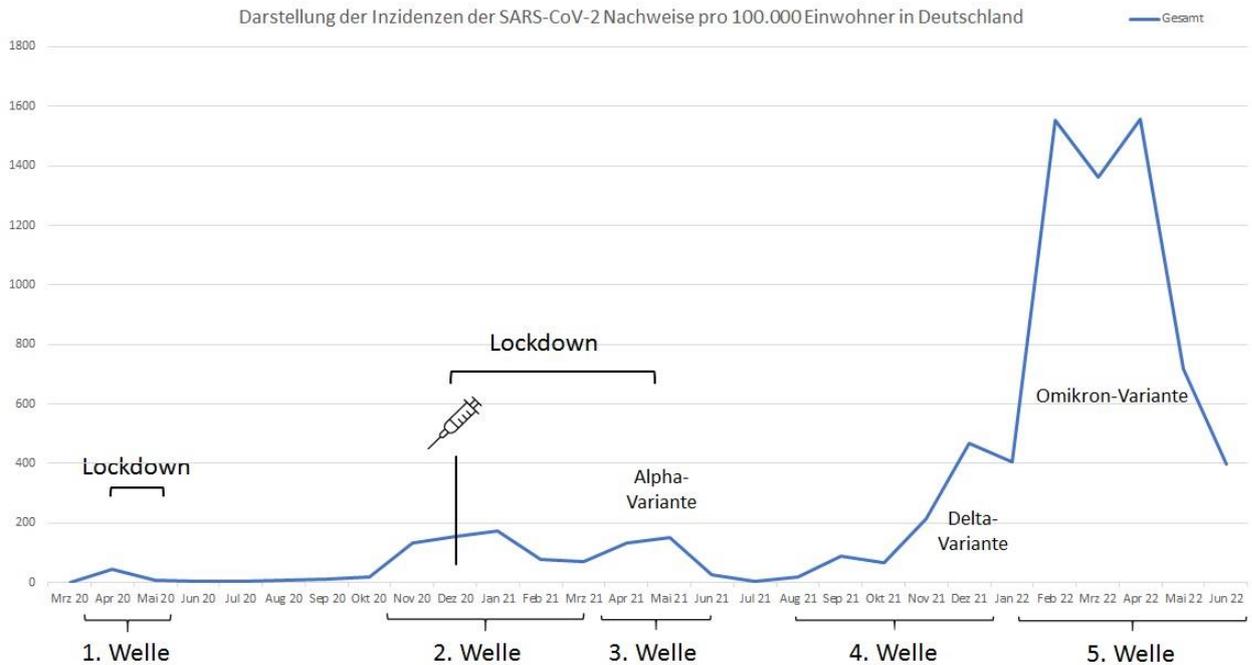


Abbildung 1: 7-Tage Inzidenz der SARS-CoV-2-Nachweise/100.000 Einwohner (März 2020 bis Juni 2022)  
Die Abbildung basiert auf den in Deutschland erhobenen Daten des RKI [145,160]

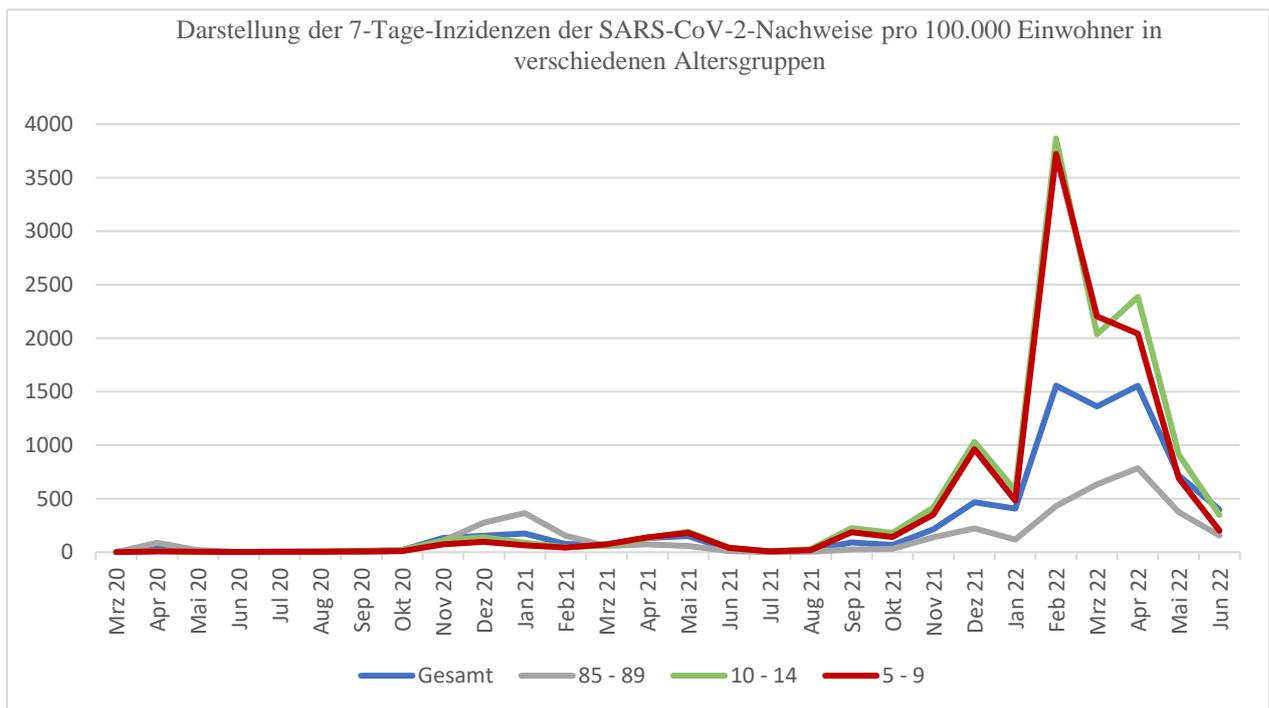


Abbildung 2: Altersverteilung der 7-Tage-Inzidenz der SARS-CoV-2-Infektionen/100.000 Einwohner (März 2020 bis Juni 2022)

Die Abbildung basiert auf den Daten und der Einteilung der Pandemie des RKI [140,159] und stellt die Inzidenzen in verschiedenen Altersgruppen in Deutschland dar.

In den ersten beiden Wellen im Frühjahr 2020 dominierten die älteren Menschen das Infektionsgeschehen, hier exemplarisch die 85 bis -89-Jährigen dargestellt. In der Dritten Welle im Frühjahr 2021 übersteigt die Inzidenz bei den Kindern und Jugendlichen (hier sind exemplarisch die 5- bis 14-Jährigen dargestellt), die Inzidenz der älteren Menschen. In der zweigipfligen fünften Welle zeigen sich die höchsten Inzidenzen bei den Kindern und Jugendlichen.

## 2.1.2 Charakteristika von SARS-CoV-2

Das severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) gehört zur Familie der Coronaviren [154]. Namensgebend für die Familie der Coronaviren ist das Spike-Protein, das als Oberflächenprotein für das charakteristische „kranz-/kronenähnliche“ Aussehen (corona= lat. Kranz/Krone) verantwortlich ist. Coronaviren sind behüllte positivsträngige RNA-Viren, die bei Mensch und Tier verbreitet sind [206]. Durch Infektion verschiedener Organsysteme können Coronaviren gastrointestinale, neurologische oder respiratorische Erkrankungen auslösen [206]. Die Unterteilung der Coronaviren erfolgt anhand des Genoms in vier Genus: Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronaviren. Alpha- und Betacoronaviren infizieren Säugetiere, und damit auch Menschen, während die Gamma- und Deltacoronaviren vorwiegend Vögel infizieren. SARS-CoV-2 gehört zum Genus der Betacoronaviren und dem Subgenus der Sarbecoviren [69]. Beim Menschen sind sieben verschiedene Coronavirusstämme bekannt. Vier davon (HCoV-229E (Alpha-Gruppe), HCoV-NL63 (Alpha-Gruppe), HCoV-OC43 (Beta-Gruppe) und HCoV-HKU1 (Beta-Gruppe)) verursachen bei Immunkompetenten milde Infektionen der oberen Atemwege und sind typische Erkältungsviren [99]. SARS-CoV-1 und MERS-CoV (beide Beta-Gruppe) können schwere respiratorische Infektionen mit teilweise letalem Verlauf verursachen [36]. Beide sind zoonotischen Ursprungs und haben in der Vergangenheit zu Krankheitsausbrüchen in China (SARS 2002) [53] und dem Mittleren Osten (MERS 2012) [219] geführt.

Die Herkunft des SARS-CoV-2 Virus ist umstritten [126]. Genomanalysen konnten eine Übereinstimmung von 96% mit Coronaviren von Fledermäusen feststellen, was einen zoonotischen Ursprung nahe legt [13,222].

Das Genom von Coronaviren besteht aus einzelsträngiger RNA positiver Polarität mit etwa 30kb [60]. Das Genom wird von einem 5'-Cap, das die RNA vor Abbau schützt und an der Translation beteiligt ist [22] und einem Poly-A-Schwanz am 3'-Ende, sowie untranslatierter Regionen (UTR), die regulatorische Funktionen haben [143], an beiden Enden umgeben. Somit kann es in der Wirtszelle als mRNA fungieren [60]. Das Genom von SARS-CoV-2 kodiert neben vier Strukturproteinen für Nicht-Strukturproteine (das pp1ab Polyprotein) und weitere akzessorische Proteine. Die Strukturproteine sind: Spike (S), Membrane (M), Envelope (E), Nucleocapsid (N). Das Genom hat folgenden linearen Aufbau: 5'-UTR-[nicht-struktur Polyprotein (pp1ab)]-Strukturproteine [Spike (S)-Envelop (E)-Membrane (M)-Nucleocapsid (N)] -UTR-3'-Poly-A-Schwanz [28,36] (vgl. Abbildung 3: Schematische Darstellung von SARS-CoV-2).

Die RNA des nicht-Struktur Polyproteins (pp1a/b) nimmt 2/3 des Genoms ein und kodiert für 16 verschiedene Proteine, die an der Virus-Replikation und Transkription beteiligt sind. Zwischen den Gensequenzen der Strukturproteine liegen Gensequenzen, die für akzessorischen Proteine kodieren. Diese sind ebenfalls an der Virusreplikation beteiligt und variieren zwischen den verschiedenen Coronaviren [36].

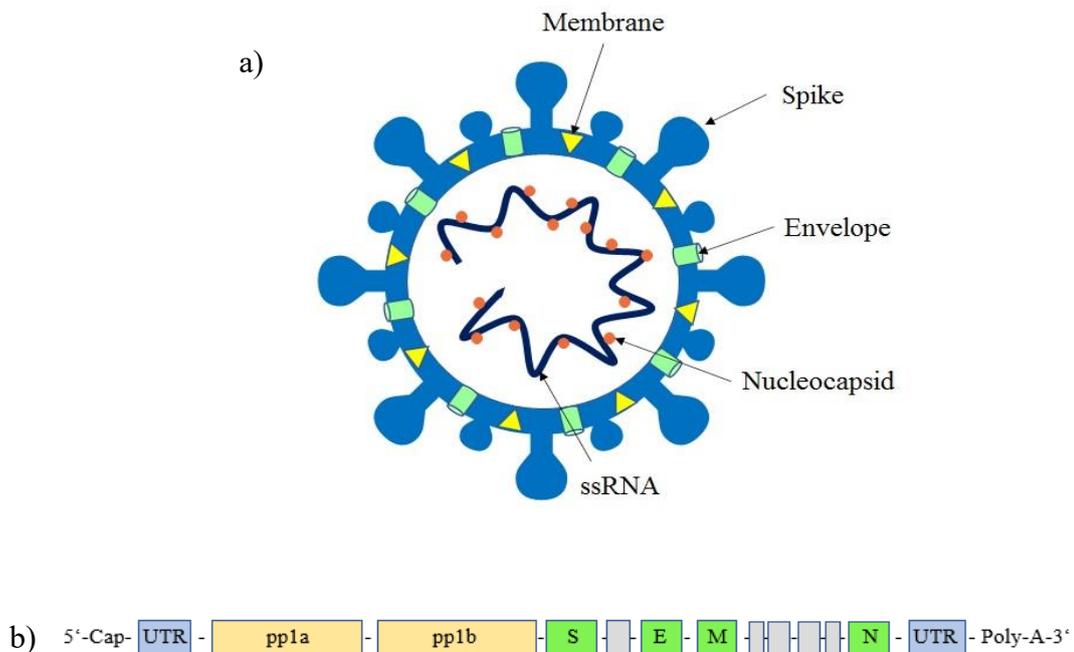


Abbildung 3: Schematische Darstellung von SARS-CoV-2

a) Aufbau von SARS-CoV-2: Das charakteristische Aussehen entsteht durch das Spike-Protein (S), In der Membran befinden sich das Envelope-Protein (E) und das Membrane-Protein (M). Das Virus verfügt über eine einzelsträngige RNA mit dem Nucleocapsid-Protein (N) [36,148]

b) Das Genom von SARS-CoV-2: Das Genom des Virus besteht aus einer 5'-Cap, der UTR, den Nicht-Strukturproteinen pp1a/pp1b (orange), den Strukturproteinen (grün) S, E, M und N und akzessorischen Proteinen (lila) die dazwischen liegen, sowie weiteren UTR und einem 3'-Poly-A-Schwanz. [28,36,148].

Beide Abbildungen sind schematisch und entsprechen nicht den wahren Größenverhältnissen der Gensequenzen bzw. Proteine.

Das Spike-Glycoprotein (S) ist ein Transmembranprotein, das sich als Trimer an der Virusoberfläche befindet und dem Virus sein charakteristisches corona/kronen-ähnliches Aussehen verleiht (vgl. Abbildung 3: Schematische Darstellung von SARS-CoV-2). Es ist für den Eintritt in die Wirtszelle über die Interaktion mit Rezeptoren der Wirtszelle verantwortlich [11]. Das S-Protein spielt eine Rolle bei der Immunantwort indem es als Bindungsstelle für neutralisierende Antikörper dient und ist somit für die Impfstoffentwicklung von Bedeutung [111,118]. Das S-Protein gliedert sich in zwei Untereinheiten. Die S1-Untereinheit liegt N-terminal und dient der Bindung am Rezeptor der Zielzelle, die S2-Untereinheit liegt C-terminal und ist für die Fusion mit der Wirtszelle verantwortlich. An der S1-Untereinheit unterscheidet man zudem die c- und die n-terminale Bindungsstelle. Beide können als Rezeptor-bindende-Domäne (RBD) für verschiedene Rezeptoren der Wirtszelle, z.B. dem angiotensin-converting-enzyme 2 (ACE2) dienen [10]. Das Membrane-Protein (M), das am häufigsten vorkommende Strukturprotein [130], stabilisiert die Membran des Virus und ist an der Zusammensetzung (Assembly) neuer Viren beteiligt [130].

Das Envelope-Protein (E) ist ein kleines membranständiges Polypeptid, das die Funktion eines Viroporins, also eines Ionenkanals hat [142]. Es ist bedeutsam für die Zusammensetzung neuer Viren. Das Fehlen des E-Proteins führt zu einer verringerten Virulenz [43].

Das Nucleocapsid-Protein (N) interagiert mit der viralen RNA. Es unterstützt das M-Proteins bei der Viruszusammensetzung und verbessert die Effektivität der Transkription [176]. Zudem wirkt es als Antagonist zu Interferonen und greift über RNA-Interferenz (RNA-silencing) in die Immunantwort des Wirts ein [37].

### **2.1.2.1 Virusvarianten**

Wie alle Organismen unterliegt SARS-CoV-2 genetischen Mutationen. Meistens haben diese keinen großen Einfluss auf die Eigenschaften des Virus. Kommt es allerdings zu Veränderungen in Schlüsselementen des Virus wie der Rezeptor-bindende-Domäne oder den Oberflächenmolekülen kann dies z.B. einen Einfluss auf die Übertragbarkeit, den Krankheitsverlauf, die Virulenz, die Immunantwort und Wirksamkeit von Impfstoffen, die Effektivität von Gegenmaßnahmen und Nachweismethoden haben. Sogenannte Variants of Concern (VOC) erfüllen erwiesenermaßen eine oder mehrere der oben genannten Eigenschaften und beeinflussen somit den Verlauf der Pandemie [214]. Daneben existieren Variants of Interest (VOI). VOI haben Mutationen die vermutlich oder nachgewiesenermaßen eine Änderung des Phänotyps verursachen und zu einer Häufung von Krankheitsfällen geführt haben [214]. Durch die WHO wurden fünf VOC festgestellt. (Stand Juli 2022) Zur Vereinfachung der Nomenklatur tragen diese griechische Buchstaben nach Zeitpunkt ihrer Entdeckung [214].

Alle Varianten haben Mutationen im S-Protein. Bei der Alpha-/Beta- und Gamma-Variante ist die Rezeptorbindungsdomäne an unterschiedlichen Positionen betroffen [59,189,218]. Das führt z.B. über eine erhöhte Affinität zum ACE2-Rezeptor zu einer erhöhten Virulenz [59,218]. Außerdem binden neutralisierende Antikörper schlechter und die Immunantwort ist verändert [4]. Bei der Delta-Variante wurde eine besonders hohe Virulenz und Übertragbarkeit im Vergleich zum Wildtyp bzw. der Alpha-Variante beobachtet [65,144]. Auch die Omikron-Variante weist Mutationen im S-Protein auf [92] die eine Immunevasion [164,174] und bessere Übertragbarkeit begünstigen [29]. Allerdings ist die Krankheitsschwere und Mortalität bei der Omikron-Variante geringer als bei vorhergehenden VOC [16,144].

### **2.1.2.2 Virusreplikationszyklus**

Unter virale Replikation versteht man die Vervielfältigung des Virus. Sie besteht aus dem Eindringen in die Zielzelle, der Translation der Strukturproteine, der Transkription der viralen RNA, der Zusammensetzung der Virus-Partikel (Assembly) und der Freisetzung des Virus [50].

Zum Eindringen in die Wirtszelle nutzt SARS-CoV-2 das Spike Protein (S-Protein), einen Rezeptor des Wirts und eine Protease des Wirts, die durch die Spaltung des S-Proteins (Priming) die Fusion mit der Zielzelle ermöglicht. Rezeptoren auf der Zelle sind das angiotensin converting-enzyme 2 (ACE2) oder Neuropilin [30,40].

Das Priming erfolgt durch Proteasen beispielsweise transmembrane protease serine subtype 2 (TMPRSS2), Furin oder Cathepsin B/L (Cat B/L) [79,96,202].

Innerhalb des S-Proteins liegen zwei Stellen für die proteolytische Spaltung vor, die S1/S2-Stelle, die zwischen der S1- und der S2-Untereinheit liegt, und die S2'-Stelle, die in der S2-Untereinheit lokalisiert ist. Zuerst wird die S1/S2-Stelle gespalten, wodurch es zu einer Konformitätsänderung innerhalb des S-Proteins kommt. Diese ermöglicht die Bindung der S1-Untereinheit an den Rezeptor der Zelle. Außerdem wird die S2'-Stelle für die proteolytische Spaltung freigelegt. Nach der Bindung an die Zelle wird die S2'-Stelle gespalten, wodurch die Fusion mit der Zelle eingeleitet wird [79,207]. Neue Einblicke in die Verteilung der an der Adhäsion beteiligten Moleküle wie ACE2 und TMPRSS2 zu erhalten ist relevant für ein besseres Verständnis der Infektion mit SARS-CoV-2.

Die einzelsträngige virale RNA wird in der Zelle freigesetzt und wirkt wie eine Messenger-RNA (mRNA) welche dann in die viralen Proteine und Strukturproteine (S,M,N,E) translatiert wird [195]. Die virale RNA wird durch die viruseigene RNA-abhängige-RNA-Polymerase transkribiert. Im Rahmen des Assemblys werden, die Strukturproteine und die viralen RNA im Endoplasmatischen Retikulum zusammengesetzt und dann aus der Wirtszelle freigesetzt [195] (vgl. Abbildung 4: Replikationszyklus von SARS-CoV-2 (von Ueffing et al.) [195]).

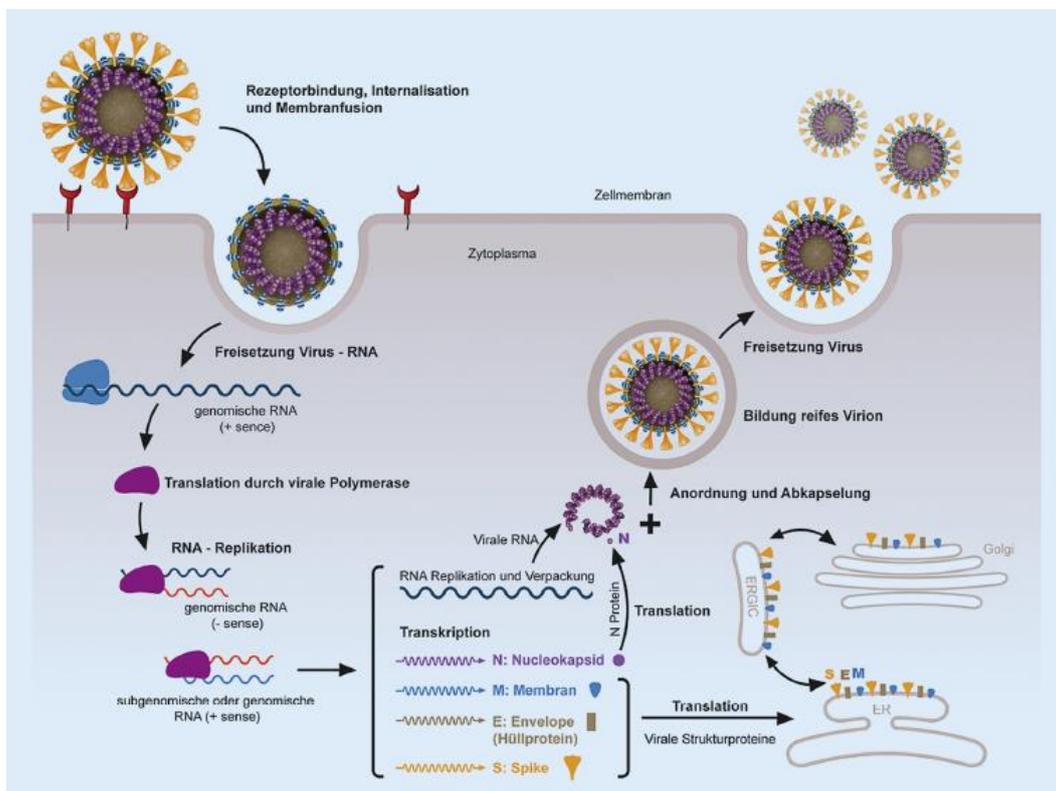


Abbildung 4: Replikationszyklus von SARS-CoV-2 (von Ueffing et al.) [195]

Nach Priming des S-Proteins kommt es zur Adhäsion des Virus an den Rezeptor der Wirtszelle (z.B. ACE2), das Virus wird internalisiert und die virale RNA freigesetzt. Es folgt die Virus-Transkription durch die virale RNA-Polymerase und die Translation der viralen Proteine. Das Virus wird zusammengesetzt (Assembly) und freigesetzt.

## **2.1.3 COVID-19**

### **2.1.3.1 Übertragung**

Die Übertragung des Virus erfolgt vorwiegend über Tröpfchen und virushaltige Aerosole aus dem Respirationstrakt der infizierten Person [168]. Zudem wird SARS-CoV-2 über den Stuhl ausgeschieden, sodass auch eine fäkal-orale Übertragung möglich ist [204]. Daneben wurde auch eine vertikale Übertragung über die Plazenta beschrieben [200]. SARS-CoV-2 persistiert auf Oberflächen wodurch Schmierinfektionen nicht auszuschließen sind. Eine Übertragung auf diesem Weg setzt vermehrungsfähigen Viren voraus, was bisher nicht gezeigt werden konnte [12,34].

Die Reproduktionszahl ( $R_0$ ) ist eine Maßeinheit, die beschreibt wie viele Personen von einer infizierten Person angesteckt werden. In einem Review wurde für den SARS-CoV-2-Wildtyp ein medianes  $R_0$  von 2,79 ermittelt [119], bei den Virusvarianten kann dieser Wert höher liegen [154]. Durch infektionspräventive Maßnahmen kann  $R_0$  gesenkt werden [154].

#### **2.1.3.1.1 Schutzmaßnahmen**

Um das Übertragungsrisiko von SARS-CoV-2 zu minimieren ist das Tragen einer Mund-Nasen-Bedeckung, das Einhalten eines Mindestabstands zu anderen Personen und regelmäßiges Lüften sinnvoll [154]. Besonders effektiv ist der Schutz, wenn sowohl infizierte als auch gesunde Personen Masken tragen. Hierbei sind FFP2-Masken den medizinischen Mund-Nasen-Bedeckungen überlegen [32].

Infektiosität besteht vor Eintreten von Symptomen [77] und Übertragungen von asymptomatischen Personen sind möglich [17]. Zudem ist auch eine Übertragung von SARS-CoV-2 durch infizierte geimpfte Personen möglich, aber weniger wahrscheinlich als bei Ungeimpften [58].

### **2.1.3.2 Charakteristika der Infektion**

#### **2.1.3.2.1 Inkubationszeit und Kontagiösität**

Die Inkubationszeit, also die Zeitspanne zwischen der Infektion und dem Symptombeginn beträgt für den Wildtyp etwa 6 Tage [128], für die Virus-Varianten scheint die Inkubationszeit kürzer zu sein [81,110]. Die Kontagiösität ist rund um den Symptombeginn am höchsten [77]. 10 Tage nach Symptombeginn nimmt die Kontagiösität bei moderatem Krankheitsverlauf deutlich ab [211]. Bei schweren Verläufen kann die Kontagiösität länger bestehen [197].

### 2.1.3.2.2 Typische Symptome

COVID-19 kann sich in unterschiedlichen Organsystemen manifestieren. Hierbei spielt, neben der direkten Zellschädigung, eine überschießende Immunreaktion, eine Hyperkoaguabilität (verstärkte Blutgerinnung) sowie die Verteilung des ACE2-Rezeptors innerhalb der Organe eine Rolle [170,226].

Häufig verläuft die Infektion mild. Typische Symptome sind Husten, Fieber, Schnupfen und Störungen des Geruchs- und Geschmackssinnes [47,67,154]. Seltener treten gastrointestinale Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall auf [67]. Es wurden auch Kopf und Gliederschmerzen, Hautausschlag und Exantheme beobachtet [154] (vgl. Tabelle 1: Symptome bei COVID-19).

<b>Allgemeinsymptome</b>		<b>Gastrointestinale Symptome</b>	
Fieber	79%	Erbrechen	5%
Abgeschlagenheit	32%	Bauchschmerzen	5%
Myalgie	21%	Durchfall	10%
Schüttelfrost	16%	Übelkeit	7%
<b>Respiratorische Symptome</b>		<b>Neurologische Symptome</b>	
Husten	54%	Schwindel	9%
Kurzatmigkeit	19%	Kopfschmerzen	9%
Schnupfen	8%		

*Tabelle 1: Symptome bei COVID-19*

*Übersicht über die verschiedenen Symptome und ihre Häufigkeiten bei einer SARS-CoV-2-Infektion basierend auf einem Review von Studien von 01.2020-04.2020 [113]*

Die pulmonale Symptomatik reicht von leichten Infekten der oberen Atemwege über Pneumonie bis hin zum Lungenversagen (Acute respiratory distress syndrome (ARDS)) [84,215]. Es können auch schwerere gastrointestinale Symptome wie Leberfunktionsstörungen auftreten [150]. In Zusammenhang mit einer SARS-CoV-2-Infektion kann es zu verschiedenen neurologischen Symptomen wie Anosmie, Kopfschmerzen, oder Verwirrtheit kommen. Es wurden auch Enzephalopathien, Schlaganfälle oder Autoimmunerkrankungen wie das Guillan-Barré-Syndrom beobachtet [14]. Auch das kardiovaskuläre System ist betroffen z.B. durch Myokarditis, Herzinfarkte und Herzrhythmusstörungen, aber auch venöse thromboembolische Ereignisse [52]. Dabei ist das Auftreten von D-Dimeren  $> 1\mu\text{g/ml}$  mit einer signifikant erhöhten Mortalität assoziiert [221]. Bei Patienten mit einer schweren COVID-19 Erkrankung kann Nierenversagen auftreten [221]. Zudem wurden milde Hautmanifestationen wie Urtikaria, Papeln und makulopapulöse Exantheme bis hin zu Nekrosen der Akren beobachtet (vgl. Abbildung 5: Symptome bei COVID-19).

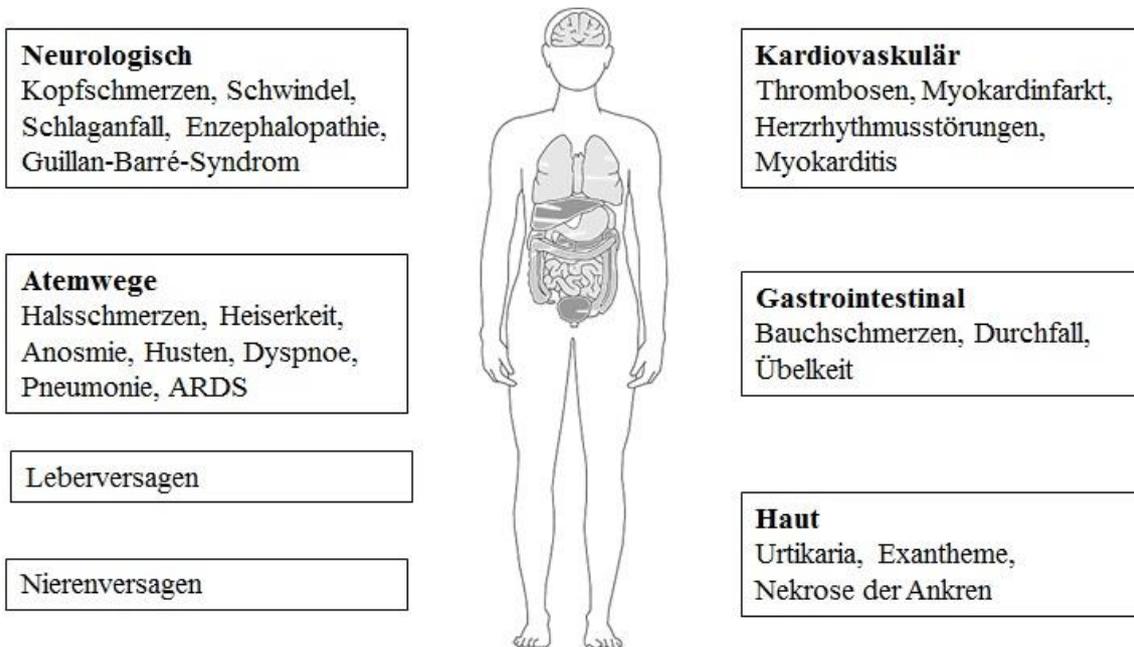


Abbildung 5: Symptome bei COVID-19

Bei einer Infektion mit SARS-CoV-2 können verschiedene Organsysteme betroffen sein [73]. Diese sind beispielhaft dargestellt.

### 2.1.3.2.3 Krankheitsverlauf und Komplikationen

Die Erkrankung kann nach Siddiqi et al. in drei Phasen eingeteilt werden wobei zu Beginn der Erkrankung die direkte Schädigung durch das Virus und später die Immunantwort des Körpers im Vordergrund steht (vgl. Abbildung 6: Klinische Verläufe von COVID-19) [179].

In der ersten Phase (frühe Infektion) kommt es durch die Virusreplikation zur lokalisierten Entzündungsreaktion. Hierbei stehen klinisch Fieber und Husten im Vordergrund, es handelt sich um einen milden Verlauf. In der zweiten Phase, der pneumovaskulären Erkrankung kommt es zur Lungenbeteiligung im Sinne einer viralen Pneumonie, welche sich CT-morphologisch darstellen lässt. In dieser Phase kommt es durch die Immunreaktion des Körpers zur Produktion von Zytokinen. Bei den meisten Patienten wird diese Entzündungsreaktion durch den Körper kontrolliert und es kommt zu einem moderaten Verlauf [179].

In der dritten Phase (hyperinflammatorische Phase) kommt es durch einen Zytokinsturm zu einer systemischen Entzündungsreaktion bis hin zum Multiorganversagen im Sinne eines schweren Krankheitsverlaufs [179]. Die klinische Verschlechterung tritt meist 8-15 Tage nach Symptombeginn auf [62]. Laborchemisch ist eine Erhöhung von CRP, Interleukin 6 und Procalcitonin zu beobachten, was sowohl prognostische Bedeutung hat, als auch für eine Superinfektion sprechen kann [62]. Eine progrediente Lymphozytopenie und eine Erhöhung von Ferritin kann als Marker für einen schweren Verlauf eingesetzt werden [116,221].

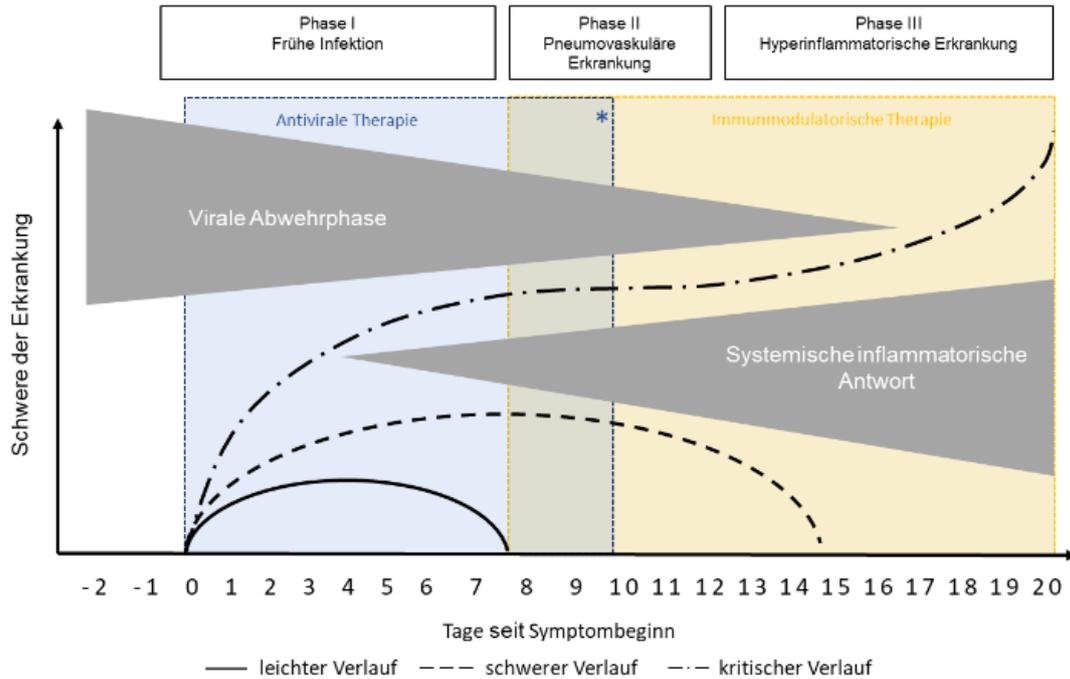


Abbildung 6: Klinische Verläufe von COVID-19 von Feldt et al. (RKI)[62], modifiziert nach Siddiqi et al.[179]

Durch eine COVID-19 Erkrankung sind Langzeitfolgen möglich. Laut der Definition der WHO wird von Post-COVID-19 gesprochen, wenn nach einer nachgewiesenen SARS-CoV-2-Infektion innerhalb von drei Monaten gesundheitliche Beschwerden fortbestehen oder neu auftreten, diese über 2 Monate anhalten und nicht durch andere Ursachen erklärbar sind [180]. Typische Symptome sind Kurzatmigkeit, kognitive Einschränkungen wie Konzentrationsschwierigkeiten, und Abgeschlagenheit oder Müdigkeit [26,154].

#### 2.1.3.2.4 Risikofaktoren für einen schweren Verlauf

Der wichtigste Risikofaktor für einen schweren Verlauf ist ein höheres Alter [194] (dazu mehr bei 2.1.3.6 Kinder und Jugendliche in der Pandemie). Männer und Frauen erkranken etwa gleich häufig an COVID-19, allerdings haben Männer ein erhöhtes Risiko für einen schweren Verlauf und eine erhöhte Mortalität [125,134]. Weitere Risikofaktoren sind Nikotinkonsum [198], Schwangerschaft [3] und Trisomie 21 [33,127].

Grundsätzlich wurden auch schwere Verläufe bei jungen Menschen [39] und Personen ohne Vorerkrankungen [38] beobachtet, allerdings wird das Risiko durch bestimmte Erkrankungen erhöht. Dazu zählen kardiovaskuläre Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Übergewicht, chronische Lungenerkrankung, Demenz, Diabetes mellitus, Immunsuppression (HIV, iatrogen, hämatologische Erkrankungen), aktive Malignome und chronische Leber- oder Nierenerkrankungen [85,116,194].

### **2.1.3.2.5 Krankheitsschwere in Deutschland**

Häufig geht die Infektion mit SARS-CoV-2 mit einem milden Verlauf einher. Je jünger, und gesünder eine Person, desto wahrscheinlicher kommt es zu keinerlei Symptomen. Ein internationales Review geht von 35% asymptomatischen Infektionen aus [166]. Bis Juli 2022 sind in Deutschland etwa 29 Millionen Fälle gemeldet worden. Bei einem Drittel sind Angaben zu den Symptomen vorhanden, davon waren 14% asymptomatisch. Bei etwa der Hälfte der Fälle (48%) liegen Informationen zur Hospitalisierung vor. Hiervon wurden 4,2% hospitalisiert. 0,5% der gemeldeten Fälle verstarben in Folge ihrer COVID-19-Erkrankung [159].

### **2.1.3.3 Diagnostik**

Der Nachweis einer Infektion mit SARS-CoV-2 mittels Polymerasekettenreaktion mit Reverser Transkriptase (RT-PCR) gilt als Goldstandard [47,84,165,205] und wird meist aus Material eines Abstrichs der oberen Atemwege (Oro-/ Nasopharynx) durchgeführt. Der Virusnachweis ist auch in anderen Probenmaterialien wie aus Sekret der unteren Atemwege, Blut oder Stuhlproben mittels RT-PCR möglich [205]. Die Viruslast kann in der RT-PCR mittels des crossing threshold-Wert (Ct-Wert) bestimmt werden. Je niedriger der Ct-Wert desto höher die Viruslast. Durchschnittlich wird ein Ct-Wert von  $>30$  als nicht mehr infektiös angesehen [160].

Im Verlauf der Pandemie wurden Antigen-Schnelltests entwickelt. Hierbei wird meist mittels Lateral-Flow-Test das N-Protein, seltener das S-Protein nachweisen [160]. Die Sensitivität von Antigen Schnelltests ist geringer als die der RT-PCR [160].

Zudem können spezifische Antikörper gegen SARS-CoV-2 nachgewiesen werden. Sie zeigen eine aktuelle oder durchgemachte Infektion oder eine Impfung an [160]. Noch ist unklar, wie lange neutralisierende Antikörper vorhanden sind und wie gut die Schutzwirkung vor Erkrankung und schwerem Krankheitsverlauf ist [160,165].

Radiologisch kann eine SARS-CoV-2-Diagnostik durch ein CT-Thorax unterstützt werden. Dabei zeigen sich charakteristische milchglasartige Verschattungen und Konsolidierungen, insbesondere basal [171,177].

### **2.1.3.4 Impfung**

Die Impfung wirkt als Individualschutz, indem das Risiko für einen schweren Verlauf gesenkt wird und als Bevölkerungsschutz, indem das Ausbruchsgeschehen besser kontrolliert werden kann [76]. Es wurden große Bemühungen in die Entwicklung von Impfstoffen gesteckt und diese standen nach einer sehr kurzen Zulassungsdauer ab Dezember 2020 in Europa zur Verfügung. Es wurden verschiedene Impfstofftypen entwickelt, wobei in Deutschland mRNA (Biontech, Moderna) und Vektorimpfstoffe (Astra Zeneca, Janssen) die größte Rolle spielen. Alle in Deutschland zugelassenen Impfstoffe werden von der STIKO als gleichwertig hinsichtlich der Wirksamkeit betrachtet und die Grundimmunisierung ist nach 2 Impfungen gegeben, allerdings werden

weitere Auffrischimpfungen (Boosterungen) empfohlen [76]. Häufige Nebenwirkungen sind Lokalreaktionen. Selten kann es bei mRNA-Impfstoffen zu einer Myokarditis, und bei Vektorimpfstoffen zu Thrombosen mit Thrombozytopenie kommen [161].

### **2.1.3.5 Therapieansätze**

Die Therapieoptionen zu COVID-19 werden aktuell intensiv erforscht.

Bei mildem Krankheitsverlauf ist eine symptomatische Therapie ausreichend [44]. Liegen Risikofaktoren für einen schweren Verlauf vor wirkt eine Inhalation mit Budesonid (Cortison Derivat) in der frühen Krankheitsphase protektiv [146]. Zudem kann der Einsatz von monoklonalen Antikörpern, die gegen das Spike Protein gerichtet sind, erwogen werden [102].

Bei hospitalisierten Patienten ist eine ausreichende Oxygenierung entscheidend. Hierbei kann je nach Krankheitsschwere eine Sauerstoffgabe über die Nasenbrille, mit Highflow und NIV (nicht invasive Beatmung) bis hin zur invasiven Beatmung (bevorzugt in Bauchlagerung) oder ECMO (extrakorporale Membranoxygenierung) eskaliert werden [100].

Je nach Krankheitsphase (vgl 2.1.3.2.3 Krankheitsverlauf und Komplikationen) kann eine antivirale Therapie oder eine immunmodulatorische Therapie angewendet werden.

Als antivirales Mittel steht Remdesivir, das ursprünglich gegen Ebola entwickelt wurde, zur Verfügung, allerdings ist der Nutzen umstritten [100].

Bei einem schweren Verlauf haben sich JAK-Inhibitoren (Hemmung der Januskinase [93]), Tocilizumab (IL6-Antagonist) und Dexamethason als hilfreich erwiesen. Die Substanzen wirken auf unterschiedlichen Wegen antiinflammatorisch und immunmodulatorisch und können so die Wirkung des Zytokinsturms mildern [100].

Zudem ist für Patienten im stationären Setting eine Thrombembolie-Prophylaxe (z.B. mit niedermolekularem Heparin) empfohlen [100].

Außerdem wird versucht mit neuen Medikamenten in den Virusreplikationszyklus einzugreifen. Vielversprechen sind hierbei die Hemmung von TMPRSS2 mittels Camostat mesylat (CM), was das Priming von S-Protein hemmt [79]. und rekombinantes ACE2 (rACE2), was SARS-CoV-2 neutralisieren kann [217,227] (mehr dazu in den Abschnitten 2.2.1.3 und 2.2.2.1 zu ACE2 und TMPRSS2).

### **2.1.3.6 Kinder und Jugendliche in der Pandemie**

#### **2.1.3.6.1 Epidemiologie von COVID-19 bei Kindern**

Wie bereits oben erwähnt ist höheres Alter einer der größten Risikofaktoren für einen schweren Verlauf von COVID-19 [125].

Kinder haben im Vergleich zu Erwachsenen eine bessere Prognose und erkranken meist milde [122]. Epidemiologische Daten des RKI zeigen, dass Kinder im Vergleich zu Erwachsenen seltener schwer erkranken: Von allen Erkrankten wurden etwa 6% stationär behandelt (Angaben zur Hospitalisierung lagen bei 57% alle gemeldeten Fälle vor). Der Anteil von Personen unter 15

Jahren an allen Hospitalisierten macht 2,8% aus, wohingegen der Anteil der über 60-Jährigen 63% beträgt (Stand 19.02.2022) [163]. Die Letalität in der Altersgruppe unter 20 Jahre ist extrem gering. In Deutschland verstarben (Stand 04.03.2022) 124.051 Menschen durch das Coronavirus, davon waren 57 (0,05%) jünger als 20 Jahre [19,162].

Wie oben beschrieben hat sich die Inzidenz der infizierten Kinder und Jugendlichen im Verlauf der Pandemie verändert. Während sie initial kaum betroffen waren stieg die Inzidenz im Verlauf der vierten (v.a. Delta-Variante) und fünften (v.a. Omikron-Variante) Welle deutlich an [157]. Es muss beachtet werden, dass neben der tatsächlichen Suszeptibilität (Empfänglichkeit) von Kindern auch der Lockdown und die Teststrategien eine Rolle spielen. Initial wurden vor allem symptomatische Patienten getestet und Kinder sind häufig asymptomatisch [117].

#### **2.1.3.6.2 Infektiosität**

Die Frage der Infektiosität von Kindern ist noch nicht abschließend geklärt. Studien deuten darauf hin, dass Kinder weniger infektiös und empfänglich für eine SARS-CoV-2 Infektion sind als Erwachsene [124,190]. Hinsichtlich der Viruslast wurde eine Zunahme mit dem Alter beobachtet [57]. Andere Studien mit einer kleineren Population konnten keine Altersunterschiede feststellen [57,90].

#### **2.1.3.6.3 Klinische Aspekte – Symptome und PIMS**

COVID-19 verläuft bei Kindern milder als bei Erwachsenen und asymptomatische Infektionen sind häufig [9,122,131]. Wie bei Erwachsenen sind typische Symptome Fieber und Husten [117]. Gastrointestinale Symptome wie Durchfall, Erbrechen oder Bauchschmerzen werden bei Kindern öfter beobachtet als bei Erwachsenen und können auch als alleiniges Symptom vorliegen [191]. Selten werden schwerwiegende Krankheitsmanifestationen wie Myokarditis, Nierenversagen oder neurologische Komplikationen beobachtet [131].

Schwere Verläufe treten vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern und bei Kindern mit Vorerkrankungen auf [70].

Eine Komplikation im Kindesalter ist das paediatric inflammatory multisystem syndrome (PIMS) oder auch multisystem inflammatory syndrome in Children (MIS-C) genannt. Das Krankheitsbild ähnelt dem Kawasaki-Syndrom, einer Vaskulitis im Kindesalter und dem toxic-shock-syndrome (TSS) [56]. PIMS tritt einige Wochen nach der Infektion mit SARS-CoV-2 auf, häufig ist eine intensivmedizinische Therapie notwendig und ein letaler Verlauf ist möglich [61].

#### **2.1.3.6.4 Erklärungsansätze für einen milderen Krankheitsverlauf**

Der milde Verlauf von COVID-19 bei Kindern ist im Vergleich zu anderen respiratorischen Erkrankungen ungewöhnlich. So erkranken Kinder häufig an Influenza oder RSV und insbesondere jüngere Kinder haben ein erhöhtes Risiko für einen schweren Verlauf [88]. Vergleichsweise machte in der Influenzasaison 2019/20 in den USA die Altersgruppe der unter 17-jährigen einen

Anteil von 14% aller hospitalisierten Fälle aus [27], deutlich mehr als die bei COVID-19 beschriebenen 2,8% der unter 15 Jährigen [163].

Für den milden Krankheitsverlauf gibt es verschiedene Erklärungsansätze.

Kinder leiden seltener an Vorerkrankungen wie Hypertonie, Diabetes oder chronischen Lungenerkrankungen, die für einen schweren Verlauf prädisponieren [194].

Ein anderer Erklärungsansatz ist eine Schutzwirkung von Antikörpern gegen saisonale Coronaviren. Bei etwa 75% der Kinder ist bis im 4. Lebensjahr eine Antikörperantwort gegen saisonale Coronaviren nachweisbar. Diese lässt mit zunehmende Lebensalter nach. Es wird vermutet, dass die hohen Antikörpertiter bei jungen Menschen einen protektiven Effekt haben, während sie bei älteren Menschen über ein antibodydependent enhancement zu einer verbesserten Aufnahme des Virus in die Zelle führen [63].

Zudem bestehen Unterschiede zwischen der kindlichen und der erwachsenen Immunantwort. Kinder haben eine starke angeborene Immunantwort und eine erworbene Immunantwort, die durch häufige Infekte und Impfungen trainiert wird. Das könnte vorteilhaft zur Abwehr einer SARS-CoV-2 Infektion sein [48]. Im Rahmen der Immunseneszenz (Alterung des Immunsystems) kommt es zu einem Verlust der T-Zell Vielfalt und zu einer spezifischeren Reaktion auf Antigene, was eine überschießende Immunantwort begünstigen kann. Die diverseren T-Zellen in jungen Jahren könnten einen schützenden Effekt haben [63].

Ferner haben kindliche Lungen haben eine bessere regenerative Kapazität. Dies könnte eine schnellere Genesung begünstigen [48].

Auch ACE2, als Rezeptor zum Eindringen des Virus in die Zelle ist ein Ansatzpunkt für den milderen Verlauf bei Kindern. Fraglich ist, ob niedrige Werte, die den Zelleintritt erschweren oder ein hohes Level von ACE2, das unter anderem antiinflammatorisch wirkt und vor Lungenversagen schützt, protektiv sind [48]. Hierzu soll diese Arbeit neue Einblicke liefern.

Erkenntnisse zum milderen Krankheitsverlauf könnten Ansätze für Therapieoptionen bei Erwachsenen geben und sind hilfreich, um angemessene Gegenmaßnahmen zur Verbreitung des Virus innerhalb der Bevölkerung festzulegen aber auch um besonders vulnerable Patienten zu schützen.

## **2.2 Schlüsselenzyme in der Infektion mit SARS-CoV-2: ACE2 und TMPRSS2**

Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) und transmembrane protease serine subtype 2 (TMPRSS2) sind an dem Eindringen von SARS-CoV-2 in die Zelle beteiligt. Somit tragen Kenntnisse zur Physiologie beider Enzyme zu einem besseren Verständnis von COVID-19 bei und sind Ansatzpunkte für Therapiemöglichkeiten.

### **2.2.1 Angiotensin-converting-enzyme 2 (ACE2)**

ACE2 ist ein auf dem X-Chromosom lokalisiertes Typ I integrales Membran-Glykoprotein mit extrazellulär gelegenen aktiven Zentren [75]. Es spaltet als Zink-Metalloprotease eine C-terminal gelegene Aminosäure ab (Carboxy-Monopeptidase)[192]. Substrate sind vasoaktive Substanzen wie Angiotensin I (AT1), Angiotensin II (AT2), verschiedene Apeline und des-Arg<sup>9</sup>-Bradikinin, welches bei Verletzung zur Vasodilatation über den Bradikinin-1-Rezeptor führt [51,199]. Zudem werden auch Kinetensin, das über Mastzelldegranulierung eine verstärkte Vasopermeabilität verursacht [185] und weitere Peptide wie Casomorphine, Dynorphin A, und Neurotensin (jeweils verschiedene Funktionen im ZNS und Gastrointestinaltrakt) hydrolysiert [51,199].

ACE2 kann als Gegenspieler zum angiotensin-converting-enzyme 1 (ACE) gesehen werden. Während die Dipeptidase ACE über die Spaltung von AT1 zu AT2 innerhalb des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (RAAS) vasokonstriktiv wirkt und über Aldosteron zur Natriumresorption beiträgt, hat ACE2 u.a. vasodilatative Effekte und hemmt das RAAS [75]. ACE2 bildet aus AT1 Angiotensin 1-9 und aus AT2 Angiotensin 1-7, wobei die Affinität von ACE2 zu AT2 deutlich höher ist [25,54]. Angiotensin 1-7 wirkt antioxidativ, antiinflammatorisch und antiproliferativ auf Endothelzellen und glatte Muskelzellen [64,72,105]. Es bindet dabei an den MAS-Rezeptor [169] (vgl. Abbildung 7: Wirkung von ACE2 im Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS)).

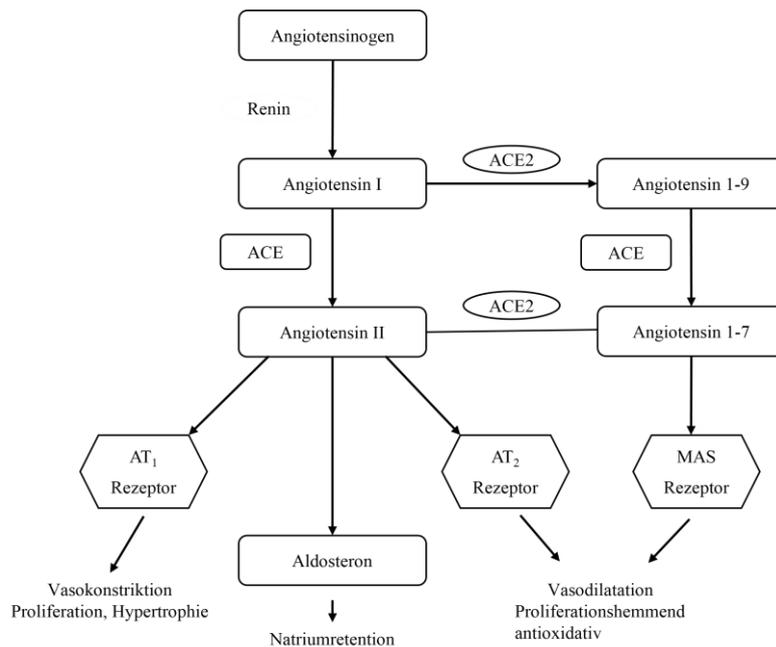


Abbildung 7: Wirkung von ACE2 im Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS).

Im RAAS entsteht aus Angiotensinogen, durch Spaltung mittels Renin, Angiotensin I. Dieses wird durch ACE in Angiotensin II umgewandelt welches über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor vasokonstriktiv wirkt und für Zellproliferation und -hypertrophie verantwortlich ist. Bei Bindung von Angiotensin 2 an den AT<sub>2</sub>-Rezeptor hat es eine entgegengesetzte Wirkung. Angiotensin II führt zur Aldosteronausschüttung was eine Natriumretention zur Folge hat.

ACE2 baut Angiotensin I zu Angiotensin 1-9 und Angiotensin II zu Angiotensin 1-7 ab. Angiotensin 1-7 kann auch durch Proteolyse mittels ACE2, ausgehend von Angiotensin 1-9, entstehen. Angiotensin 1-7 wirkt über den MAS-Rezeptor vasodilatativ, hemmt die Zellproliferation und wirkt antioxidativ. Modifiziert nach Hamming et al. [75].

ACE2 kann von der adisintegrin-like and metalloproteinase 17 (ADAM17) von der Zelle abgespalten werden, dabei entsteht im Blut zirkulierendes lösliches ACE2 (sACE2) [75].

ACE-Hemmer haben keine Wirkung auf ACE2 [6,192].

ACE2 wird in vielen Geweben exprimiert. Analysen auf RNA-Basis haben ergeben, dass in Niere, Herz, Dünndarm und Fettgewebe große Mengen ACE2 exprimiert werden, etwas weniger findet sich in Lunge, Leber, Colon, Harnblase und Nebenniere. Die niedrigste ACE2-Expression wurde im Blut, in den Blutgefäßen, Milz, Gehirn, Knochenmark und Muskel gefunden. Zudem wird ACE2 in der Placenta exprimiert [196]. Die ubiquitäre Verbreitung von ACE2 deckt sich mit der Beobachtung von extrapulmonalen Symptomen von COVID-19 [114]. In der Lunge wird ACE2 vor allen von Epithelzellen exprimiert. Auf Typ II Pneumozyten, welche Surfactant bilden [49], Becherzellen der oberen Atemwege und Enterozyten des Ileums konnten eine Coexpression von ACE2 und TMRSS2 festgestellt werden. Es ist unklar ob für eine Infektion mit SARS-CoV-2 beide Enzyme auf der Zelle vorhanden sein müssen, oder ob ein Priming auch durch gelöste Enzyme erfolgen kann [224].

### **2.2.1.1 Pathophysiologische Bedeutung von ACE2**

ACE2 hat einen Einfluss auf verschiedene Organsysteme und dient als Rezeptor für die Coronaviren SARS-CoV-1, HCoV-NL63 und SARS CoV-2 [30,80,115].

In verschiedenen Tierexperimentellen Studien konnte ein kardioprotektiver Effekt von ACE2 nachgewiesen werden. So zeigten ACE2-knockout-Mäuse Zeichen einer Herzinsuffizienz, und erhöhte Angiotensin-II-Spiegel. Wurde zudem das ACE-Gen ausgeschaltet, zeigten die Mäuse eine normale kardiale Funktion [35]. Eine vermehrte ACE2-Konzentration konnte im Tierexperiment nach ischämischen Myokardinfarkt und bei menschlichen Herzen bei ischämischer oder dilatativer Kardiomyopathie festgestellt werden [23,71,225]. Es ist anzunehmen, dass ACE2 über den vasodilatatorischen Effekt von Angiotensin 1-7 eine protektive Wirkung im ischämischen Myokard ausübt [75].

ACE2 scheint einen nephroprotektiven Effekt zu haben [75]. Bei ACE2-Knock-out Mäusen wurden keine renalen Auffälligkeiten gesehen. Allerdings führt eine Inhibition von ACE2 bei diabetischen Mäusen zu einer glomerulären Schädigung im Sinne einer vermehrten Albuminurie [35,216].

Bei verschiedenen Lungenerkrankungen wie pulmonale Hypertension, Sarkoidose, idiopathischer Lungenfibrose und dem acute-respiratory-distress-syndrome (ARDS, akutes Lungenversagen) ist eine Erhöhung von ACE zu beobachten [66,133,193]. Da ACE2 als Gegenspieler zu ACE wirkt ist ein protektiver Effekt anzunehmen. Nachgewiesen wurde dieser tierexperimentell beim ARDS [86]. Die Infektion mit SARS-CoV-1 führt zu einer verminderten Expression von ACE2 [103]. Ebenso kann das SARS-CoV-2-S-Protein die ACE2-Expression in Epithelzellen herabsetzen [107], was eine Schädigung der Lunge begünstigt.

### **2.2.1.2 Einflussfaktoren auf ACE2 – Krankheiten, Alter, Geschlecht**

Verschiedene Einflussfaktoren führen zu einer Erhöhung von sACE2, dazu gehören kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Übergewicht und Diabetes [151]. Ebenso ist sACE2 in der Schwangerschaft erhöht [109]. Eine erhöhte Konzentration von sACE2 korreliert mit einer erhöhten sACE2-Aktivität wie sie bei Patienten mit Herzinsuffizienz festgestellt wurde [55,220]. Auf genetischer Ebene konnte eine Erhöhung der Expression von ACE2 in der Niere bei Patienten mit Nierenerkrankungen und in der Lunge bei Rauchern festgestellt werden. [108,112]

Zum Einfluss des Geschlechts auf ACE2 gibt es heterogene Ergebnisse. Einerseits konnte in einer Studie mit Patienten mit Koronarer-Herz-Krankheit das männliche Geschlecht als Prädiktor für eine hohe sACE2-Aktivität festgestellt werden [147]. Andererseits besteht bei Frauen mit essentieller Hypertonie eine positive Korrelation zwischen sACE2-Aktivität und dem Östrogenspiegel [220]. Auf RNA-Ebene konnte kein Unterschied in der Expression hinsichtlich des Geschlechts festgestellt werden [196].

Ein hohes Alter ist ein entscheidender Risikofaktor für einen schweren Verlauf von COVID-19 [194]. Zum Einfluss des Lebensalters auf ACE2 gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Zum einen

ist ein höheres Alter ist mit einer höherem sACE2-Aktivität assoziiert [151] und im nasalen Epithel und im Lungengewebe konnte eine signifikant erhöhte Genexpression von ACE2 für Erwachsene im Vergleich zu Kindern nachgewiesen werden [21,31]. Andererseits ließ sich in einer Studie die die ACE2-RNA-Expression in verschiedenen Organen in den Altersgruppen unter bzw. über 49 Jahren verglichen hat, kein Altersunterschied [196]. Zudem scheint sich die Aktivität von ACE2 in verschiedenen Altersgruppen von Patienten mit ARDS in der Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage nicht zu unterscheiden [175]. In einer Studie mit Patienten mit Asthma wurde bei über 70-Jährigen eine signifikant niedrigere sACE2-Konzentration gemessen als bei Jüngeren [106].

Alle genannten Erkrankungen oder Faktoren (männliches Geschlecht, hohes Alter) korrelieren auch mit einem schweren Verlauf [85,116,194] von COVID-19. Deswegen soll durch diese Arbeit ein besseres Verständnis des Zusammenhangs von ACE2 und COVID-19 erzielt werden.

### **2.2.1.3 sACE2 und COVID-19**

In-vitro Studien konnten zeigen, dass der Eintritt von SARS-CoV-2 in die Zelle nicht nur über membranständiges ACE2 (mACE2) stattfindet, sondern auch von sACE2 anhängt, das durch shedding mittels ADAM17 entsteht. Hierbei bildet sich ein Komplex mit dem S-Protein von SARS-CoV-2, welcher über den AT1-Oberflächenrezeptor mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Zudem ist die Bildung eines sACE2-SARS-CoV-2-Vasopressin-Komplex möglich [217]. Vasopressin (oder antidiuretisches Hormon ADH) wirkt vasokonstriktiv und antidiuretisch, und wird neben Volumenmangel und Hyperosmolarität auch durch AT2 freigesetzt [148,203]. Somit besteht ein Zusammenhang zum RAAS. Der sACE2-SARS-CoV-2-Vasopressin-Komplex wird über einen Vasopressin-Rezeptor (AVPR1B) in die Zelle aufgenommen [217]. Im Verlauf der COVID-19-Erkrankung kommt es zu einem Anstieg der sACE2-Konzentration. Diese ist bei Patienten mit schweren Verlauf signifikant höher als bei solchen mit mildem Verlauf oder Patienten mit einem schweren Verlauf von Influenza [149]. Das legt die Vermutung nahe, dass SARS-CoV-2 die Expression oder das Shedding von ACE2 beeinflusst.

Wird rekombinantes ACE2 (rACE2) zu einer Zellkultur gegeben, verbessert sich die Suszeptibilität der Zielzelle für SARS-CoV-2 [217]. Allerdings ist dieser Effekt nur bei niedrigen Dosen von rACE2 zu beobachten. Werden sehr hohe Dosen von rACE2 verwendet, wird SARS-CoV-2 neutralisiert und rACE2 hemmt so die Aufnahme des Virus in die Zielzelle [129,217,227]. Dies stellt einen vielversprechenden Therapieansatz dar [217]. Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die Aktivität von ADAM17 zu senken, da durch eine verringerte sACE2-Menge im in-vitro Experiment die Infektiosität von SARS-CoV-2 abnimmt [217]. Unter Berücksichtigung des Einflusses von sACE2 auf die Infektion mit SARS-CoV-2 ist es relevant, Ursachen für Unterschiede in der sACE2-Konzentration zu untersuchen.

## **2.2.2 Transmembrane protease serine subtype 2 (TMPRSS2)**

TMPRSS2 ist eine membranständige Typ-II-Serinprotease, die N-Terminal in der Plasmamembran verankert ist und eine C-terminal gelegene Serin-Domäne aufweist [82]. TMPRSS2 ist auf dem langen Arm von Chromosom 21 lokalisiert [137]. Es kommt in Epithelzellen vieler Gewebe vor, dazu gehört der Gastrointestinaltrakt mit Leber und Pankreas, Niere, Lunge, Speicheldrüsen und besonders stark ausgeprägt im Prostatagewebe [5,87]. Die Transkription von TMPRSS2 kann durch Androgene beeinflusst werden und ist beim Adeno-Carcinom der Prostata erhöht [120]. Zudem kann die Protease-Domäne von TMPRSS2 abgespalten werden, dabei entsteht sTMPRSS2, welches im Blut nachweisbar ist [2,94]. Es sind einige Substrate bekannt, die von TMPRSS2 gespalten werden können. Dazu gehört die Aktivierung von epithelialen Natriumkanälen (ENaC) [183], die Aktivierung des protease-activated receptor-2 (PAR-2), der über die Freisetzung von Calcium eine Rolle in der Signaltransduktion und dem Tumorwachstum spielt [208], die Abspaltung und Aktivierung von Kallikrein-2, das eine gerinnungshemmende Wirkung auf Spermienflüssigkeit hat und das Spalten des hepatocyte growth factor (HGF), der an der Metastasierung beim Prostata-Karzinom beteiligt ist [121,183,207,208]. Trotzdem ist die physiologische Rolle von TMPRSS2 nach wie vor unklar. So zeigten TMPRSS2-Knockout Mäuse keinerlei Auffälligkeiten in Entwicklung und Fertilität [98].

### **2.2.2.1 TMPRSS2 und COVID-19 – Pathophysiologie und Therapieansätze**

TMPRSS2 dient der Aktivierung verschiedener Viren, wie Influenza, Parainfluenza-virus, humanes Metapneumovirus und verschiedenen humanen Coronaviren [1,15,178,207]. Neben SARS-CoV-1 und MERS-CoV wird auch SARS-CoV-2 durch das sogenannte Priming des S-Proteins aktiviert, was die Fusion mit der Zelle ermöglicht [207]. Der genaue Ablauf des Primings ist unter dem Punkt 2.1.2.2 Virusreplikationszyklus beschrieben.

Da TMPRSS2 am Virusreplikationszyklus von SARS-CoV-2 beteiligt ist, ist seine Hemmung als medikamentöse Therapieoption von Interesse. Das Medikament Camostat mesylate (CM) hemmt TMPRSS2 und damit den Zelleintritt von SARS-CoV-2 in vitro [79]. Auch andere Proteasen, wie Trypsin, Plasmin, Thrombin und C1-Esterase, werden durch CM gehemmt [188]. Das Medikament wurde für die Therapie der Refluxösophagitis und chronischer Pankreatitis entwickelt und wird in Japan klinisch eingesetzt [101,132,207]. Für ein vollständiges Unterbinden der Infektion muss neben CM auch E-64d, ein Inhibitor von CATB/L gegeben werden, da auch CATB/L das S-Protein primen kann [79].

### **2.2.2.2 Down-Syndrom und COVID-19 - Spielt TMPRSS2 eine Rolle?**

Down-Syndrom (Trisomie 21) ist eines der häufigsten genetischen Syndrome (ca. 1:700 Geburten), das mit geistiger Einschränkung und verschiedenen Organfahlbildungen einhergehen kann [24]. Da TMPRSS2 auf Chromosom 21 lokalisiert ist [137], ist es hinsichtlich des Risikos an COVID-19 zu erkranken interessant, ob bei Menschen mit Trisomie 21 sTMPRSS2 in anderem Maße vorhanden, ist als bei Gesunden. In verschiedenen Geweben konnte gezeigt werden, dass TMPRSS2 bei Trisomie 21 verstärkt exprimiert wird [42].

Menschen mit Down-Syndrom sind durch COVID-19 besonders gefährdet. Dabei ist das Risiko im Vergleich zur Normalbevölkerung für einen schweren Verlauf vierfach, und für Tod durch COVID-19 zehnfach erhöht [33,127]. Mögliche Erklärungsansätze sind Komorbiditäten wie Organfahlbildungen (insb. angeborene Herzfehler) ein eingeschränktes Immunsystem, Übergewicht oder Diabetes mellitus, die als Risikofaktoren für einen schweren Verlauf gelten [24,181,194]. Wird das Risiko nach kardiovaskulären und pulmologischen Risikofaktoren adjustiert, ist das Risiko für einen schweren Verlauf und Tod im Vergleich zur Normalbevölkerung immer noch erhöht [33]. Hierfür müssen andere Erklärungsansätze gefunden werden. Ob und in welchem Maße auch TMPRSS2 oder ACE2 eine Rolle spielen, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden und kann Einblicke in die Pathophysiologie von COVID-19 bei Menschen mit Down-Syndrom geben

## **3 Hypothese**

Aufgrund der Unterschiede im Krankheitsverlauf von COVID-19 bei Kindern und Erwachsenen [122] und der Schlüsselrollen von ACE2 und TMPRSS2 für die Infektion mit SARS-CoV-2 [30,79], könnte eine unterschiedliche Expression beider Enzyme eine Rolle für die Krankheits-schwere spielen. Es ist bekannt, dass ACE2 und TMPRSS2 in ihrer löslichen Form (sACE2, sTMPRSS2) im Blut nachweisbar sind [2,75,95]. Da Blutproben leichter zu gewinnen sind als Gewebeproben wurden diese als Probenmaterial gewählt. In der vorliegenden Arbeit wurde angenommen, dass die Höhe von sACE2 und sTMPRSS2 einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf von COVID-19 widerspiegeln könnte. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde in der vorliegenden Dissertation die Altersabhängigkeit und Expression beider Enzyme in verschiedenen Gruppen untersucht.

## 4 Zielsetzung

Seit Beginn der durch SARS-CoV-2 ausgelösten COVID-19-Pandemie haben sich mehr als 600 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert und etwa 6 Millionen Menschen sind in Folge dessen verstorben (Stand 12/2022) [89]. Neben milden und asymptomatischen Verläufen erkranken einige Menschen schwer [47], was zu einer Überlastung des Gesundheitssystems führen kann [182]. Insbesondere ist auffällig, dass Kinder zu Beginn der Pandemie sehr selten und im Verlauf der Pandemie weniger schwer als Erwachsene und insbesondere alte Menschen erkranken [122,125,131].

ACE2 und TMPRSS2 wurden als wichtige Faktoren für die Infektion mit SARS-CoV-2 identifiziert [30,79].

Ziel dieser Arbeit ist es, über die Messung von sACE2 und sTMPRSS2 in verschiedenen Gruppen Erklärungsansätze für unterschiedlichen Verlaufsformen zu finden. Vorhergehende Studien haben Einflussfaktoren für eine vermehrte ACE2-Expression, sACE2-Konzentration oder-Aktivität beschrieben, welche auch als Risikofaktoren für einen schweren Verlauf von COVID-19 gelten. Dazu gehören verschiedene Vorerkrankungen wie Hypertonie, Diabetes, Adipositas und Nierenerkrankungen [55,108,151,220]. Ein hohes Alter und männliches Geschlecht sind ebenfalls Risikofaktoren für einen schweren Verlauf von COVID-19 [125]. Die Ergebnisse des Zusammenhangs von sACE2 und Alter sowie Geschlecht sind heterogen [147,151,175,220]. Zudem ist bisher wenig über die sACE2-Konzentration bei Kindern bekannt. Diese Arbeit soll zu Erkenntnissen über Einflussfaktoren auf sACE2 bei Kindern und Erwachsenen führen. Dies ist von besonderem Interesse, weil die Identifizierung von pathophysiologischen Risikofaktoren für ein tiefergehendes Verständnis des Infektionsgeschehens, zum Schutz von Risikogruppen und zur Entwicklung von Therapieansätzen bei COVID-19 relevant ist.

Zudem soll untersucht werden, ob sich die Konzentration von sACE2 bei COVID-19-Erkrankten von Gesunden unterscheidet, und ob das Alter die sACE2-Konzentration von Patienten mit COVID-19 beeinflusst. Die Datenlage zur sACE2-Konzentration bei COVID-19, insbesondere bei Kindern ist dürftig. Erkenntnisse hierzu könnten zum Verständnis des milden Verlaufs von COVID-19 bei Kindern beitragen.

TMPPRSS2 ist auf Chromosom 21 lokalisiert [137]. Menschen mit Down-Syndrom (Trisomie 21) haben ein erhöhtes Risiko für einen schweren Verlauf vom COVID-19 [33]. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich die sTMPRSS2-Konzentration und die sACE2-Konzentration zwischen Menschen mit Down-Syndrom und Gesunden unterscheiden, um einen Erklärungsansatz für das höhere Erkrankungsrisiko von Menschen mit Down-Syndrom zu finden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Lithium-Heparin-Plasma Blutentnahmeröhrchen	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
PBS (phosphate buffered saline) Dulbecco's, D8537	Sigma Aldrich, Missouri, USA
(Filter-) Pipettenspitzen (20 µl, 100 µl, bzw. 1000 µl)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Serum Blutentnahmeröhrchen	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Sicherheits-Reaktionsgefäß 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

#### 5.1.2 ELISA-Kits

ACE2 ELISA Human ACE2 <sup>®</sup>	Cloud-Clone Corporation, Houston, Texas, USA
TMPRSS2 ELISA Human Transmembrane Protease, Serine 2 (TMPRSS2) ELISA Kit, MBS2019705	MyBioSource, San Diego, USA

#### 5.1.3 Geräte und Software

Inkubator	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Microplate Reader FLUOstar <sup>®</sup> Omega	BMG LABTECH Inc., Cary, North Carolina, USA
Multichannel Pipette (30-300µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (20 µl, 100 µl, bzw. 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SPSS	Version 25; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA
Sterilbank	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Vortex-Mischer	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Wasserkocher	WMF, Geislingen an der Steige, Deutschland
Zentrifuge Sigma 1-14	SIGMA, Osterode, Deutschland

## **5.2 Methoden**

### **5.2.1 Studiendesign**

Diese Arbeit wurde am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg durchgeführt. Es wurde die sACE2-Konzentration und die sTMPRSS2-Konzentration in Blutproben verschiedener Gruppen gemessen. Diese beinhalten Patienten aus der dermatologischen Ambulanz, Patienten der Inneren Medizin (Kardiologie, Pulmonologie, Dialyse), Kinder und Erwachsene mit COVID-19 und von Gesunden.

Die spezifisch für diese Studie vorgesehenen Proben wurden im Zeitraum von Juni bis September 2020 gesammelt. Weitere Proben waren bereits für andere Forschungsarbeiten gesammelt worden (vgl. unten).

Ziel war es, zu untersuchen, ob sich die sACE2/sTMPRSS2-Konzentration bei Kindern und Erwachsenen und von COVID-19-Erkrankten zu Nicht-Erkrankten unterscheidet. Auch die Auswirkung des Geschlechts sollte untersucht werden.

Nach Messung der sACE2 bzw. sTMPRSS2-Konzentration mittels ELISA wurden die statistischen Unterschiede mit dem Statistikprogramm SPSS berechnet.

Die Studie entspricht den Vorgaben der Deklaration von Helsinki und die Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes hat der Durchführung der Studie zugestimmt. Die Nummer der Zustimmung lautet 177/09 und 211/20.

### **5.2.2 Probensammlung**

Die gesammelten Proben können in vier Gruppen unterteilt werden.

Die erste Gruppe wird von Patienten verschiedener Fachrichtungen ohne COVID-19 gebildet. Die Proben wurden zwischen dem 01.06.2020 und dem 04.09.2020 gesammelt. Eingeschlossen wurden Blutproben von Patienten der Inneren Medizin, die am Universitätsklinikum Homburg auf den Normalstationen der Pulmonologie, Kardiologie und auf der Dialyse-Station behandelt wurden und keine COVID-19 Erkrankung hatten. Die Proben der dermatologischen Patienten wurden in der Dermatologischen Ambulanz entnommen. Die Proben der pädiatrischen Patienten stammen aus den folgenden Bereichen der Kinderklinik: Allgemeine Pädiatrie, Neurologie, Hämatologie, Onkologie, Kardiologie, Neonatologie und Kinderintensivstation. Die Patienten sind ambulant oder stationär behandelt worden.

Für die Forschung wurden Lithium-Heparin-Plasma-Proben verwendet. Die Proben wurden aufgrund einer klinischen Indikation entnommen und nach Eingang im Zentrallabor mit 4000 Umdrehungen/Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem die klinisch relevanten Laboruntersuchungen abgeschlossen waren, wurden die verbleibenden Plasma-Proben bei 4°C gelagert und anonymisiert. Die Proben, die für die Forschungsarbeit genutzt wurden, wurden zufällig aus allen anonymisierten Proben ausgewählt. Am Morgen nach der Abnahme der Proben von Patienten, wurde 300-500µl Plasma aliquotiert, welches sofort tiefgefroren und bei -20 °C gelagert wurde.

Die zweite Gruppe besteht aus Patienten mit COVID-19, die im Rahmen der CORSAAR bzw. CORSAAR-Pädiatrie Studien gesammelt wurden. Ziel beider Studien war es einen Einblick in Risikofaktoren für eine SARS-CoV-2-Infektion und die Mechanismen von COVID-19 zu bekommen, sowie neue Therapieoptionen zu finden [46]. Alle Probanden haben der Teilnahme an der Studie zugestimmt und die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt. Die Serum-Proben wurden 20 min bei 2500g und 4°C zentrifugiert, aliquotiert und bei unter -70 °C gelagert. Die Proben wurden zwischen April und Dezember 2020 gesammelt. Die genaue Durchführung der Studie wurde bereits publiziert [78].

Die dritte Gruppe besteht aus Serum-Proben von gesunden Personen. Diese wurden im Rahmen einer Studie zu Erwachsenen mit angeborenem Herzfehler gesammelt. Das Studienprotokoll wurde bereits ausführlich beschrieben [104,145]. Die Proben wurden zwischen Januar 2015 und Dezember 2019 gesammelt, alle Probanden haben der Durchführung der Studie schriftlich zugestimmt und die Ethik-Kommission des Universitätsklinikums des Saarlandes hat die Studie genehmigt.

Die vierte Gruppe beinhaltet Serum-Proben von Patienten mit Down-Syndrom.

Um festzustellen, ob die sACE2-Konzentration in Serum und Plasma vergleichbar ist, wurde von pädiatrischen Patienten zeitgleich eine Serum- und eine Lithium-Heparin-Plasma-Probe abgenommen. Um die Beeinträchtigung der Patienten so gering wie möglich zu halten, erfolgte die Blutentnahme während der Herzkatheteruntersuchung oder bei Patienten aus der endokrinologischen Ambulanz, die aus einem klinischen Grund eine Blutentnahme benötigten. Alle Probanden bzw. ihre Sorgeberechtigten wurden über die Durchführung der Studie informiert und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Proben wurden 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen /min zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### **5.2.2.1 Ausschluss von Proben**

Hämolytische Proben oder sichtbar dunkle Proben z.B. durch ein hohes Bilirubin, wurden nicht verwendet.

Außerdem wurden Proben von identischen Patienten ausgeschlossen. Da die Proben anonymisiert waren, wurden sie nach Station, Geschlecht und Geburtsdatum sortiert. Wenn Proben die gleichen Parameter in allen drei Kategorien aufwiesen und der Abnahmezeitpunkt weniger als 14 Tage auseinander lag, wurde nur die erste Probe verwendet und alle nachfolgenden von der Analyse ausgeschlossen.

Bei den Patienten mit Dialyse wurden nur Proben ausgewertet, die vor Beginn der Dialyse abgenommen wurden.

## **5.2.3 Messung mittels ELISA**

### **5.2.3.1 sACE2-Messung**

Um die sACE2-Konzentration in den Blutproben zu messen, wurde ein kommerziell erhältlicher Sandwich enzyme-linked immunoabsorbant assay (ELISA) verwendet. Die Messung wurde wie unten beschrieben durchgeführt.

Die niedrigste messbare sACE2 Konzentration wird seitens des Herstellers mit 6.3pg/ml angegeben, mit einem intra-assay coefficient of variation (CV) < 10% und einem inter-assay CV < 12%.

#### **Vorbereitung der Reagenzien und Proben (sACE2)**

Alle Reagenzien und die Proben wurden auf Raumtemperatur gebracht. Die Proben für die Standardkurve wurden wie folgt hergestellt: Die Standardlösung mit einer Konzentration von 5.000 pg/ml wurde zehn Minuten lang vorsichtig bewegt und anschließend mit dem Standardverdünnungsmittel auf 1.000 pg/ml verdünnt. Anschließend wurden 7 Probenröhrchen mit 250µl Standardverdünnungslösung gefüllt und eine Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurden 250µl aus der Lösung mit 1.000pg/ml entnommen und in das, mit 250µl Standardverdünnungslösung gefüllte, Probenröhrchen gegeben. Die neue Lösung wurde gemischt und der Schritt für die nachfolgenden Röhrchen wiederholt, sodass Proben mit folgenden Konzentrationen entstanden: 1.000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,2pg/ml, 15,6pg/ml. Als Leerwert (0pg/ml) wurde die Standardverdünnungslösung verwendet.

Detektionsreagenz A und Detektionsreagenz B wurden kurz zentrifugiert und mit dem Verdünnungsmittel A bzw. B 100-fach verdünnt.

Für die Waschlösung wurden 20 ml Waschlösungskonzentrat mit 580ml destilliertem Wasser verdünnt.

In der Anleitung wurde eine 50-fache Verdünnung von Plasma-/Serum-Proben empfohlen. Da die Proben mit dieser Verdünnung unterhalb der Standardkurve lagen nutzte ich eine 10-fache Verdünnung. Hierzu wurden 50µl der Probe mit 450 µl PBS (phosphate buffered saline) gemischt.

#### **Durchführung des sACE2-ELISA**

Um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen, wurde innerhalb der Sterilbank mithilfe eines Wasserkochers Wasserdampf erzeugt.

Jeweils 100µl der Proben der Standardkurve und der zu messenden Proben wurden in die 96 Wells Platte pipettiert, mit einer Folie (plate sealer) abgedeckt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Proben entfernt, ohne zu waschen. Mit einer Multichannel-Pipette wurden 100µl vom Detektionsreagenz A in jedes Well gegeben, die Platte wurde abgedeckt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit einer Multichannel Pipette entfernt und vier Mal mit 250 µl Waschflüssigkeit mit einer Einwirkzeit von 1-2 Minuten, gewaschen. Um verbleibende Waschflüssigkeit zu entfernen wurde die Platte auf saugfähiges Papier geklopft. Danach wurde 100µl des Detektionsreagenz B hinzugefügt, die Platte mit einer Folie

abgedeckt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Waschschrirte wurden fünf Mal wie oben beschreiben wiederholt. Es wurden 90µl der TMB-Substratlösung in jedes Well gegeben, die Platte mit einer Folie abgedeckt und vor Licht geschützt für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 50µl der Stopp-Lösung hinzugegeben, was zu einem Farbumschlag von blau zu gelb führte. Durch Berühren der Platte wurden die Proben vorsichtig gemischt. Direkt anschließend wurde die Absorption bei 450nm mit dem Microplate Reader gemessen.

### **5.2.3.2 sTMPRSS2-Messung**

Für die Messung des sTMPRSS2 wurde ein kommerziell erhältlicher Sandwich-ELISA von MyBioSource (Human Transmembrane Protease, Serine 2 (TMPRSS2) ELISA Kit, MBS2019705, MyBioSource, San Diego (USA)) verwendet.

Die niedrigste messbare sTMPRSS2-Konzentration liegt nach Angaben des Herstellers bei 0,054ng/ml. Die intra-assay coefficient of variation (CV) und die inter-assay CV für das Test-Kit wurden mit <10% bzw. <12% angegeben.

Die sTMPRSS2-Messung erfolgte zu großen Teilen analog zur sACE2-Messung (vgl. 5.2.3.1. sACE2-Messung). Abweichende Schritte werden nachfolgend erläutert.

### **Vorbereitung der Reagenzien und Proben (sTMPRSS2)**

Die Proben für die Standardkurve wurden wie folgt hergestellt: Die Standardlösung mit einer Konzentration von 80ng/ml wurde zehn Minuten lang vorsichtig bewegt und anschließend mit dem Standardverdünnungsmittel auf 10ng/ml verdünnt. Anschließend wurden 7 Probenröhrchen mit 250µl Standardverdünnungslösung gefüllt und eine Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurden 250µl aus der Lösung mit 10ng/ml entnommen und in das mit 250µl Standardverdünnungslösung gefülltem Probenröhrchen gegeben. Die neue Lösung wurde gemischt und der Schritt für die nachfolgenden Röhrchen wiederholt, so dass Proben mit folgenden Konzentrationen entstanden: 10ng/ml, 5ng/ml, 2,5ng/ml, 1,25ng/ml, 0,625ng/ml, 0,312ng/ml, 0,156ng/ml. Als Leerwert (0ng/ml) wurde die Standardverdünnungslösung verwendet.

Detektionsreagenz A und Detektionsreagenz B und die Waschlösung wurden analog zum sACE2-ELISA hergestellt.

Die erste ELISA-Platte wurde mit einer 2-fachen Verdünnung der Probe durchgeführt (60 µl Probe und 60µl PBS. Hier lagen die sTMPRSS2-Werte unterhalb der Standardkurve, sodass ich anschließend mit unverdünnten Proben arbeitete.

### **Durchführung des sTMPRSS2-ELISA**

Alle Schritte des sTMPRSS2-ELISA erfolgten analog zum sACE2-ELISA (vgl. Durchführung des sACE2-ELISA).

#### **5.2.4 Statistische Auswertung**

Die Daten wurden mit SPSS, Version 25, ausgewertet.

Da die Variablen nicht normalverteilt sind werden sie als Median und Interquartilsabstand (IQR) angegeben. Der IQR bildet den Wert der 25. und der 75. Perzentile ab. Für sACE2-Werte, die unterhalb des Y-Achsen-Messbereichs lagen, wurde 2pg/ml angenommen.

Zur deskriptiven Statistik wurden Median (IQR) und die Verteilung der Variablen Alter, Geschlecht und sACE2 in den einzelnen Gruppen und der Gesamtheit aller Messwerte bestimmt.

Um die Gleichheit zwischen der sACE2-Konzentration im Serum und im Lithium-Heparin-Plasma zu untersuchen, wurde ein Wilcoxon-Test durchgeführt.

Um Unterschiede zwischen den Gruppen zu detektieren wurde ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Mithilfe einer linearen multifaktoriellen Regressionsanalyse für Alter und Geschlecht wurde der Einfluss auf die sACE2-Konzentration innerhalb der Gesamtheit der Messwerte und in den einzelnen Gruppen untersucht.

Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Deskriptive Statistik

In der Arbeit wurden insgesamt 576 Probanden eingeschlossen, die in sieben Gruppen unterteilt wurden (vgl. Tabelle 2: Übersicht über die Studienpopulation). Dazu gehören Patienten aus der Dermatologischen Ambulanz (nachfolgend Dermatologie), Patienten, die stationär in der Inneren Medizin (Kardiologie, Dialyse und Pneumologie (ohne COVID-19)) behandelt wurden, Patienten aus der Kinderklinik, Proben von Erwachsenen und Kindern mit COVID-19, eine Gruppe von Menschen mit Down-Syndrom und eine gesunde Vergleichsgruppe. Bei 553 Probanden lagen Informationen zu Alter und Geschlecht vor. Die Daten sind nicht normalverteilt und werden als Median und Interquartilsabstand (IQR) (25.-27. Perzentile) angegeben. Das Alter der Probanden betrug 20 (5,73- 61,6) Jahre, 241 (43,6%) davon waren weiblich. Die weiblichen Probanden hatten ein Alter von 19,8 (5,25-62,3) Jahren. Männliche Probanden waren 18,58 (5,7- 60,5) Jahre alt.

	<b>Anzahl der Probanden</b>	<b>Alter (bei Durchführung) in Jahren</b> Median (IQR (25.-75. Perzentile))	<b>Geschlecht</b> (Weiblich/Gesamt)	<b>Konzentration von sACE2 (pg/ml)</b> Median (IQR (25.-75. Perzentile))
<b>Dermatologische Ambulanz</b>	59	60 (40,25-76,75)	35/59 (59,3%)	272,87 (176,32-438,54)
<b>Innere Medizin</b>	138	69,9 (59,7-78,33)	54/138 (39,1%)	518,56 (280,1-868,90)
Dialyse	37	67,75 (59,1-78,0)	10/37(27%)	545,67 (317,198-735,88)
Kardiologie	47	76,1 (67,1-83,6)	26/47 (55,3%)	426,53 (252,25-922,41)
Pneumologie (kein COVID-19)	54	63,45 (56,8-72,2)	18/54 (33,3%)	565,15 (291,43-1025,98)
<b>Pädiatrie</b>	263	5,25 (0,7-13,3)	113/260 (43,5%) 3 fehlen	704,46 (102,00-2017,798)
<b>Patienten mit Down-Syndrom</b>	12	nicht bekannt	nicht bekannt	911,34 (435,022-2358,91)
<b>Erwachsene mit COVID-19</b>	31	69,6 (53,7-80,1)	10/23 (45,5%) 8 fehlen	2013,33 (1043,1-3792,24)
<b>Kinder mit COVID-19</b>	10	8,4 (5,6-14,3)	4/10 (40%)	1286,45 (768,34-1696,819)
<b>Gesunde Kontrollen</b>	63	30 (22-38)	25/63 (39,7%)	365,2 (237,7-656,3)
<b>Gesamt</b>	576	20 (5,73- 61,6)	241/553 (43,6%)	567,73 (188,1-1332,1)

*Tabelle 2: Übersicht über die Studienpopulation*

*Angegeben sind die Anzahl der Probanden, die epidemiologischen Daten und die sACE2-Konzentration (pg/ml) in den verschiedenen Gruppen, als Median (Interquartilsabstand (25.-57.-Perzentile)). Die vorliegenden Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und zum Teil bereits in ähnlicher Form veröffentlicht [210].*

In der dermatologischen Ambulanz wurden 59 Proben entnommen. Das Patientenalter betrug 60 (40,25-76,75) Jahre und umfasst 35 weibliche und 24 männliche Patienten.

138 erwachsene Patienten wurden stationär in der Inneren Medizin behandelt. Dabei lagen sie auf den Normalstationen der Kardiologie, Pulmonologie (ohne COVID-19) und der Dialyse. 54 Patienten waren weiblich (39,1%). Von 37 Dialysepatienten, waren 10 weiblich (27%). Hier betrug das mediane Alter 67,75 (59,1-78,0) Jahre. 47 Patientenproben wurden auf der kardiologische Normalstation (für Erwachsene) abgenommen, hierunter waren 26 Frauen (55,3%) und das Alter betrug 76,1 (67,1-83,6) Jahre. Die 54 Patientenproben aus der Pulmonologie umfassen 18 Frauen (33,3%), Das Alter lag bei 63,45 (56,8-72,2) Jahren.

Aus der Kinderklinik stammen 263 Proben, von 113 weiblichen und 147 männlichen Patienten. Nicht alle Proben stammen von Minderjährigen, das mediane Alter beträgt 5,25 (0,7-13,3) Jahre. Es wurden 12 Patienten mit Down-Syndrom eingeschlossen. Das Alter und Geschlecht der Patienten waren nicht bekannt.

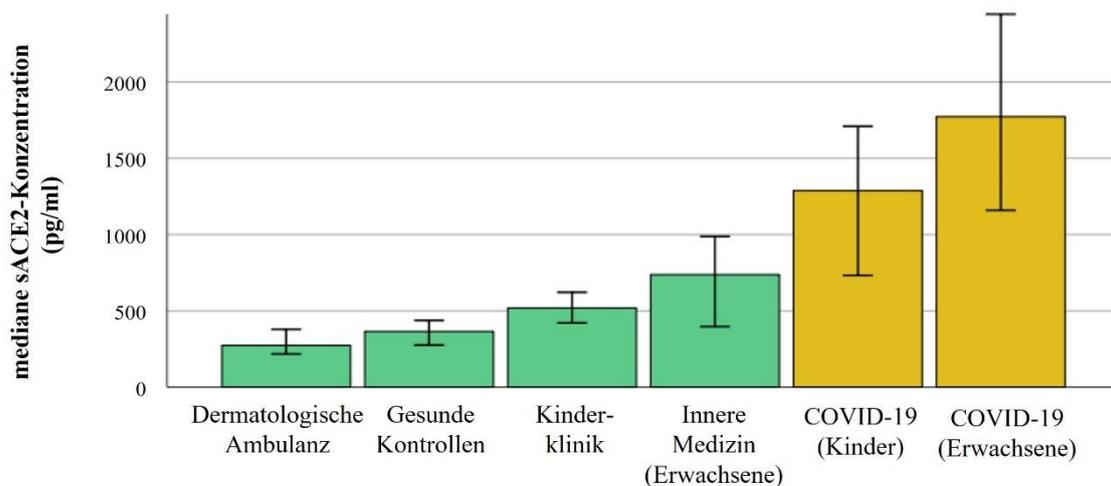
Von den 31 Erwachsenen mit COVID waren 10 weiblich (45,5%). Das Alter lag bei 69,6 (53,7-80,1) Jahren.

10 Kinder mit COVID-19, davon 4 weiblich (40%) wurden eingeschlossen. Das Alter lag bei 8,4 (5,6-14,3) Jahren.

Die gesunde Kontrollgruppe besteht aus 63 Probanden, davon 25 weiblich (39,7%) mit einem Alter von 30 (22-38) Jahren.

Der Median der sACE2-Konzentration bei Einbezug aller Messwerte liegt bei 567,73pg/ml (IQR 1243,48). Die höchste mediane sACE2-Konzentration im Blut liegt bei den Erwachsenen mit COVID-19 vor (2013,33pg/ml), absteigend folgen Kinder mit COVID-19 (1286,45pg/ml), Kinder mit Down-Syndrom (911,34pg/ml), Patienten der Pädiatrie (704,46pg/ml), Patienten der Inneren Medizin (518,56pg/ml), die gesunden Kontrollen (365,2pg/ml) und die Patienten der Dermatologie (272,87pg/ml) (vgl. Abbildung 8: Mediane sACE2-Konzentration (pg/ml) in den verschiedenen Gruppen.)

**Histogramm der medianen sACE2-Konzentration (pg/ml) in unterschiedlichen Gruppen**



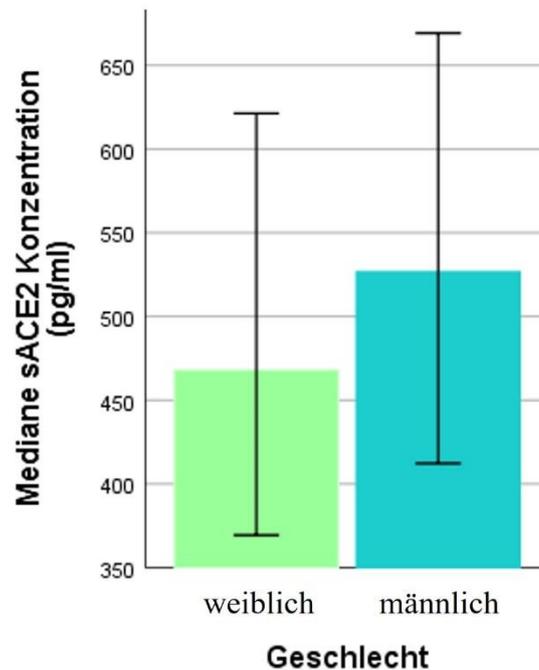
*Abbildung 8: Mediane sACE2-Konzentration (pg/ml) in den verschiedenen Gruppen.*

*Histogramm mit 95% Konfidenzintervall als Fehlerbalken.*

## 6.2 sACE2 und Geschlecht

Bei weiblichen Probanden liegt die mediane Konzentration von sACE2 mit 468,02pg/ml (183,15-1298,15) etwas niedriger als bei männlichen Probanden. Median: 526,57pg/ml (185,45-1284,76). Berücksichtigt sind alle Probanden, bei denen eine Angabe zum Geschlecht vorlag (vgl. Abbildung 9: Mediane sACE2-Konzentration (pg/ml) nach Geschlecht).

**Histogramm der medianen sACE2-Konzentration und dem Geschlecht**



Fehlerbalken: 95% CI

*Abbildung 9: Mediane sACE2-Konzentration (pg/ml) nach Geschlecht  
Histogramm mit dem 95% Konfidenzintervall als Fehlerbalken.*

Dieser Unterschied ist bei Berücksichtigung aller Gruppen nicht signifikant ( $p=0,432$ ). Auch wenn Probanden unter 18 Jahren von der Analyse ausgeschlossen werden, besteht keine Korrelation zwischen Geschlecht und der Höhe des sACE2 ( $p=0,564$ ).

Bei den Patienten aus der Dermatologie ist das sACE2 bei Männern signifikant niedriger als bei Frauen ( $B=-152,627$ ,  $p=0,041$ ) bei allen anderen Gruppen besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen Geschlecht und der Höhe des sACE2 (Innere Medizin  $p=0,934$ , Kinderklinik  $p=0,618$ , Erwachsene mit COVID-19  $p=0,601$ , Kinder mit COVID-19  $p=0,919$ , gesunde Kontrollen  $p=0,174$ ) (vgl. Tabelle 3: Einfluss des Geschlechts auf die Höhe der sACE2-Konzentration innerhalb verschiedener Gruppen).

Gruppe	p-Wert	Gruppe	p-Wert
Alle	0,432	Kinderklinik	0,618
Alle > 18 Jahre	0,564	Dermatologische Ambulanz	B= -152,627, p=0,041
Innere Medizin	0,934	Gesunde Kontrollen	0,184
Kardiologie	0,227	Erwachsene mit COVID-19	0,601
Dialyse	0,390	Kinder mit COVID-19	0,854
Pulmologie	0,224		

Tabelle 3: Einfluss des Geschlechts auf die Höhe der sACE2-Konzentration innerhalb verschiedener Gruppen.

Nur in der dermatologischen Ambulanz gib es einen signifikanten Unterschied bezüglich des Geschlechts, hierbei ist die sACE-2-Konzentration bei Männern signifikant niedriger.

### 6.3 sACE2 und Alter

Bei Betrachtung aller Messwerte ergibt sich eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Alter in Monaten (unabhängige Variable) und der Konzentration des sACE2 Regressionskoeffizient B:  $-0,842 \pm 0,243$  (Standardfehler),  $p = 0,001$ .

Interessanterweise besteht bei den Patienten mit COVID-19 (Kinder und Erwachsene) eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Alter und der Höhe des sACE2 ( $B=2,309 \pm 1,012$ ,  $p=0,03$ ). Also je höher das Alter desto höher die sACE2-Konzentration (vgl. Abbildung 10: Zusammenhang von sACE2-Konzentration und Alter bei Patienten mit COVID-19).

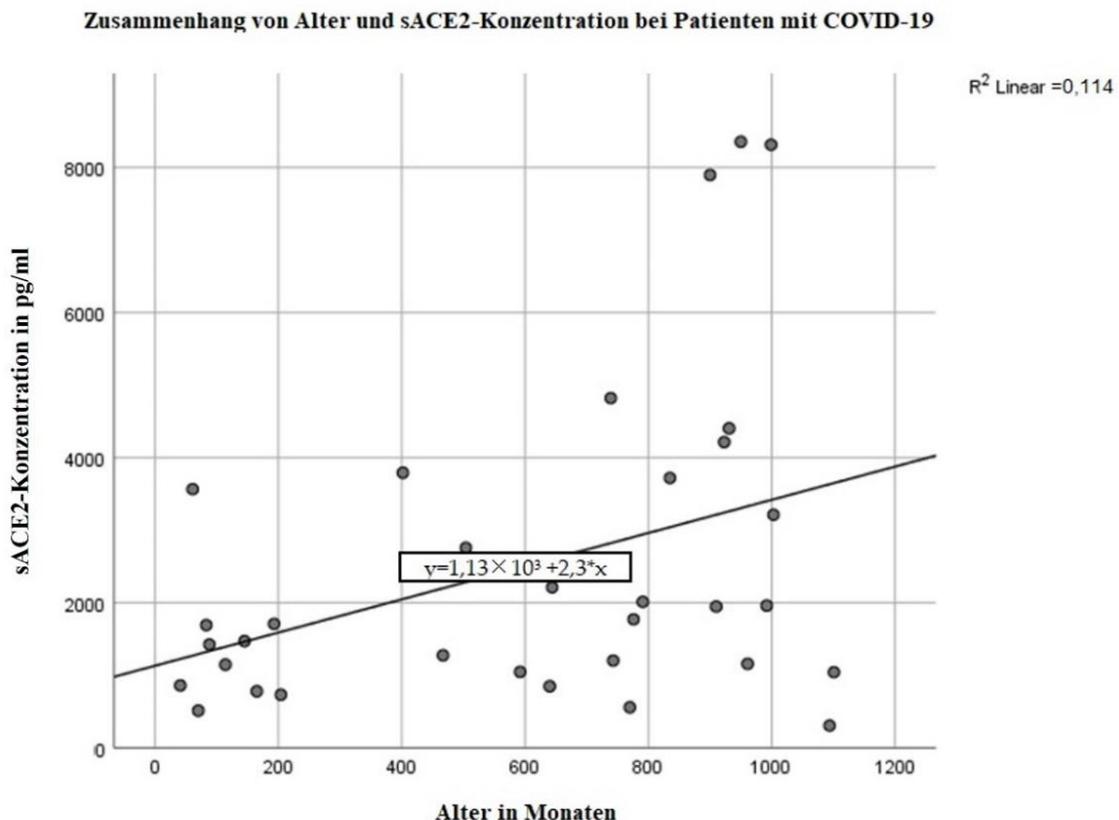


Abbildung 10: Zusammenhang von sACE2-Konzentration und Alter bei Patienten mit COVID-19  
Pro Monat nimmt die sACE2-Konzentration um  $2,309 \pm 1,012$  pg/ml zu. Die dargestellten Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und bereits in ähnlicher Form veröffentlicht [210].

Bei der Betrachtung der einzelnen Teilgruppen findet sich ein statistisch signifikanter positiver Alterszusammenhang nur bei Patienten der dermatologischen Ambulanz ( $B=0,45$ ,  $p=0,005$ ). In den anderen Gruppen, also in der Inneren Medizin ( $p=0,675$ ), Kinderklinik ( $p=0,184$ ) und in der Pulmonologie ( $p=0,56$ ), bei Erwachsenen mit COVID-19 ( $p=0,364$ ), bei den Kindern mit COVID-19 ( $p=0,510$ ) und den gesunden Kontrollen ( $p=0,558$ ) besteht keine signifikante Alterskorrelation zur Höhe der sACE2-Konzentration.

#### 6.4 Unterschiede der sACE2-Konzentration zwischen den Gruppen

Die Höhe der sACE2-Werte unterscheidet sich zwischen den Gruppen (vgl. 6.1 Deskriptive Statistik).

Die sACE2-Konzentration der Erwachsenen mit COVID-19 ist signifikant höher als die der gesunden Kontrollen ( $p<0,001$ ), der Inneren Medizin ( $p<0,001$ ), der Kinderklinik ( $p<0,001$ ) und der dermatologischen Ambulanz ( $p=0,004$ ). Die Kinder mit COVID-19 unterschieden sich signifikant von den gesunden Kontrollen ( $p<0,001$ ), zur Inneren Medizin ( $p=0,001$ ) und zur dermatologischen Ambulanz ( $p<0,001$ ) (vgl. Tabelle 4 und vgl. Abbildung 11). Zur sACE2-Konzentration der gesunden Kontrollgruppe lässt sich zudem ein signifikanter Unterschied zu den Patienten der Inneren Medizin feststellen ( $p=0,010$ ).

**Histogramm der medianen sACE2-Konzentration bei Kindern und Erwachsenen mit und ohne COVID-19**

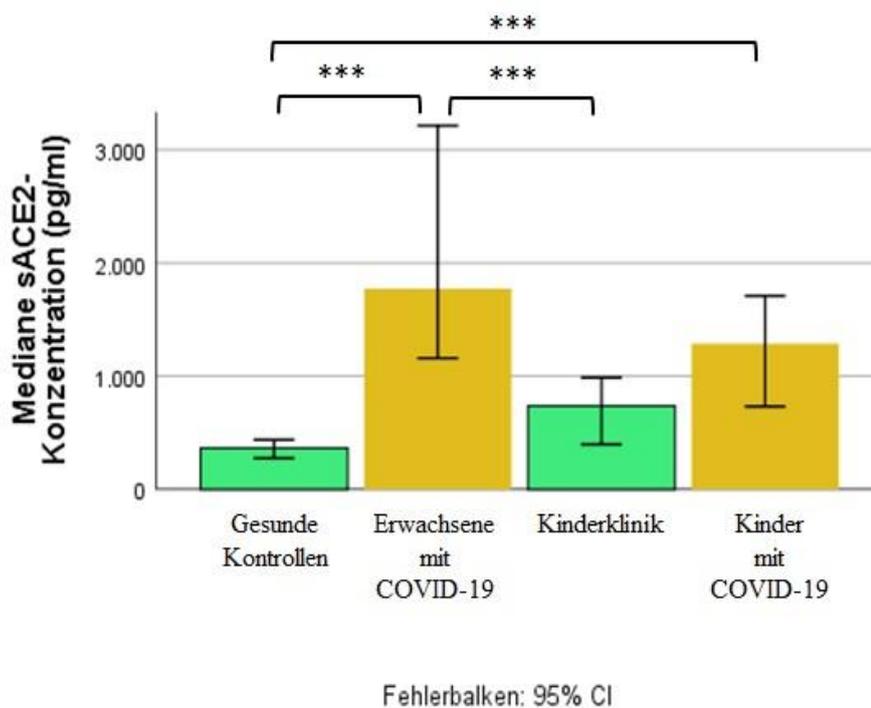


Abbildung 11 : Vergleich der medianen sACE2-Konzentrationen bei Kindern und Erwachsenen mit und ohne COVID-19

\*\*\* signifikanter Unterschied mit  $p<0,001$ . Die dargestellten Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und bereits in ähnlicher Form veröffentlicht [210]

Die sACE2 Konzentration der Patienten mit Down-Syndrom unterscheiden sich signifikant zu den Gesunden Kontrollen ( $p=0,003$ ) und der Inneren Medizin ( $p=0,046$ ), allerdings nicht zu den Patienten mit COVID-19 (vgl. Abbildung 12: Mediane sACE2-Konzentration zwischen Probanden mit Down-Syndrom, gesunden Kontrollen und Erwachsenen mit COVID-19).

### Histogramm der medianen sACE2-Konzentration (pg/ml) bei Probanden mit Down-Syndrom, Gesunden und Patienten mit COVID-19

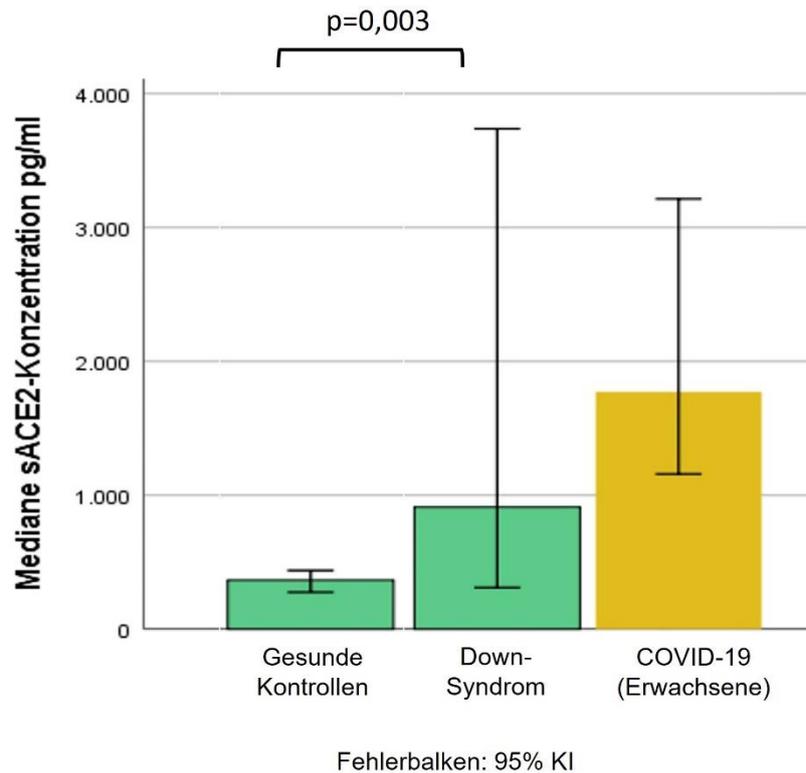


Abbildung 12: Mediane sACE2-Konzentration zwischen Probanden mit Down-Syndrom, gesunden Kontrollen und Erwachsenen mit COVID-19

Histogramm mit 95%-Konfidenzintervall als Fehlerbalken. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Gesunden und Probanden mit Down-Syndrom ( $p=0,003$ )

	p-Wert		p-Wert
COVID-19-Erwachsene vs. Gesunde Kontrollen	<b>&lt;0,001</b>	Gesunde Kontrollen vs. Innere Medizin	<b>0,010</b>
COVID-19-Erwachsene vs. Innere Medizin	<b>&lt;0,001</b>	Gesunde Kontrollen vs. Dermatologische Ambulanz	0,094
COVID-19-Erwachsene vs. Kinderklinik	<b>&lt;0,001</b>	Down-Syndrom vs. Gesunde Kontrollen	<b>0,003</b>
COVID-19-Erwachsene vs. COVID-19-Kinder	0,114	Down-Syndrom vs. Kinderklinik	0,270
COVID-19-Erwachsene vs. Dermatologische Ambulanz	<b>&lt;0,001</b>	Down-Syndrom vs. COVID-19-Kinder	0,705
COVID-19-Kinder vs. Gesunde Kontrollen	<b>&lt;0,001</b>	Down-Syndrom vs. COVID-19-Erwachsene	0,064
COVID-19-Kinder vs. Kinderklinik	0,222	Down-Syndrom vs. Innere Medizin	<b>0,046</b>
COVID-19-Kinder vs. Innere Medizin	<b>0,001</b>	Kinderklinik vs. Innere Medizin	0,275
COVID-19-Kinder vs. Dermatologische Ambulanz	<b>&lt;0,001</b>	Kinderklinik vs. Dermatologische Ambulanz	<b>0,004</b>
Gesunde Kontrollen vs. Kinderklinik	0,065	Dermatologische Ambulanz vs. Innere Medizin	<b>&lt;0,001</b>

*Tabelle 4: Übersicht über den Vergleich der sACE2-Konzentration innerhalb der verschiedenen Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test*

## 6.5 Vergleich von sACE2 im Serum und im Lithium-Heparin-Plasma

Um zu untersuchen, ob sich die sACE2-Konzentration in Serum- und Lithium-Heparin-Plasma-Proben unterscheiden, wurden die sACE2-Konzentration in zeitgleich gewonnenen Proben beider Materialien gemessen. Soweit aus der Literatur bekannt ist, wurde bisher kein Unterschied in der sACE2-Konzentration in unterschiedlichen Blutproben-Materialien beschrieben. Hierzu wurde Serum bzw. Plasma von 12 Patienten, davon 7 weiblich (63,6%), (bei einer Person ist das Geschlecht nicht bekannt) zeitgleich abgenommen. Das Alter betrug 4,5 (2-17,25) Jahre. Die mediane sACE2-Konzentration lag im Serum mit 301,82 (129,58-839,54) pg/ml höher als im Plasma mit 20,0 (20,0-111,31) pg/ml. Allerdings ist der Unterschied nicht statistisch signifikant. Im Wilcoxon-Test ergibt sich ein p-Wert von 0,110. Somit können die sACE2-Konzentrationen im Serum und Lithium-Heparin-Plasma verglichen werden.

## 6.6 Messung von sTMPRSS2

Die Messung der sTMPRSS2-Konzentration verlief frustrierend. Bei der ersten Durchführung des ELISAs lagen fast alle Messwerte bei einer 1:1 Verdünnung unterhalb des Messniveaus von 0,054ng/ml. Auch bei Wiederholung des Versuchs mit unverdünnten Proben gelang kein Nachweis von sTMPRSS2. Es wurden sowohl Serum als auch Plasma-Proben verwendet. Die Messwerte der Standardkurve waren in beide Fällen korrekt.

## **7 Diskussion**

Teile der Diskussion wurden bereits in ähnlicher Form in einem Paper, das im Rahmen dieser Arbeit entstanden ist, veröffentlicht [210].

### **7.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse**

In dieser Promotion wurde die sACE2- und die sTMPRSS2-Konzentration im Blut in verschiedenen Patientenkollektiven, darunter Kinder und Erwachsene mit COVID-19 und Kinder und Erwachsene mit unterschiedlichen Vorerkrankungen, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe gemessen. Beide Enzyme spielen eine Schlüsselrolle in der Infektion mit SARS-CoV-2. Das Ziel, Einblicke in die sACE2-Konzentrationen in den einzelnen Gruppen zu erhalten, die mit unterschiedlichen Verlaufsformen von COVID-19 assoziiert sind, wurde erreicht. Die Messung von sTMPRSS2 blieb leider erfolglos.

Insgesamt wurden über 550 Probanden in die Studie eingeschlossen, darunter waren etwas weniger als die Hälfte Kinder und Jugendliche. Die wesentlichen Ergebnisse der Studie sind:

- Die Konzentration von sACE2 ist bei an COVID-19 Erkrankten höher, als bei allen anderen Gruppen und unterscheidet sich signifikant zur Kontrollgruppe gesunder Erwachsener. Das gilt für Kinder und Erwachsene mit COVID-19 gleichermaßen.
- Kinder mit COVID-19 weisen ein niedrigeres sACE2 auf als Erwachsene mit COVID-19. Je höher das Alter bei COVID-19 Erkrankten, desto höher die sACE2-Konzentration.
- Patienten mit Down-Syndrom haben ein signifikant höheres sACE2 als die gesunden Erwachsenen.
- Gesunde Erwachsene haben geringere sACE2-Werte als Patienten der Inneren Medizin.
- Weibliche Probanden haben ein niedrigeres sACE2 als Männliche, der Unterschied ist allerdings nicht signifikant.

### **7.2 Diskussion der Methoden**

#### **7.2.1 Auswahl der Probanden und Studiendesign**

Die Proben wurden, abgesehen von der gesunden Vergleichsgruppe, von Patienten gesammelt, die sich im Krankenhaus vorgestellt hatten oder dort stationär oder ambulant behandelt wurden. Aufgrund des Studiendesigns, das bereits anonymisierte Proben verwendete, standen keine klinischen Daten wie Diagnose, Medikation oder Outcome der Probanden zur Verfügung. Die Einteilung der Gruppen erfolgte nach der Abteilung, in der die Patienten behandelt wurden. Bei weiteren Studien, die sich mit der sACE2-Konzentration im Blut befassen, wäre es empfehlenswert klinische Charakteristika der Probanden zu kennen, um mögliche Einflussfaktoren wie die Vorerkrankungen auf die sACE2-Konzentration quantifizieren zu können.

Im Unterschied zu anderen Arbeiten, die die sACE2-Konzentration im Blut bei COVID-19-Patienten gemessen haben, wurden hier verschiedene Vergleichsgruppen, insbesondere eine gesunde Kontrollgruppe zu den an COVID-19 Erkrankten, verwendet. Beispielsweise haben Rieder

et al. [152] die sACE2-Konzentration von Patienten mit respiratorischen Symptomen mit und ohne COVID-19 untersucht. Lerner et al. [95] haben die sACE2-Konzentration bei Patienten mit COVID-19 im Krankheitsverlauf gemessen. Beide haben auf eine gesunde Kontrollgruppe verzichtet. Eine Stärke der Studie ist, dass durch die Verwendung von Vergleichsgruppen die Ergebnisse in einen Kontext zur gesunden Allgemeinbevölkerung gesetzt werden können.

Zum Vergleich der sACE2-Werte bei Kindern wäre eine Vergleichsgruppe mit gesunden Kindern wünschenswert gewesen. Da eine Blutabnahme für Kinder sehr unangenehm ist sollte diese möglichst restriktiv erfolgen. Somit wurde hier darauf verzichtet, gesunden Kindern für Forschungszwecken Blut abzunehmen.

Alle Patienten mit COVID-19 wurden stationär betreut. Somit ist die Aussagekraft hinsichtlich Patienten mit einem milden Verlauf limitiert.

Die Kohortenstärke der Patienten mit COVID-19 (n=31 Erwachsene n=10 Kinder) und der Personen mit Trisomie 21 (n=12) ist relativ gering. Das kann die Ergebnisse verzerren. Somit sollten erneute Studien mit größeren Kohorten durchgeführt werden.

In dieser Studie wurden Blutproben als Untersuchungsmaterial gewählt, weil sie relativ einfach zu gewinnen sind und einen Einblick in die Bedeutung von sACE2 in vivo geben. Allerdings ist anzumerken, dass die sACE2-Konzentration im Blut nicht zwangsläufig Rückschlüsse auf die membrangebundene Form zulässt [55,167]. Zudem erfolgt der erste Kontakt von SARS-CoV-2 meist über die Schleimhäute des Respirationstrakts [168] und es kommt erst sekundär zu einer Verbreitung des Virus innerhalb des Körpers und über das Blut. Somit können bei der initialen Infektion auch andere Schutzmechanismen von Bedeutung sein, über die durch das gewählte Probenmaterial keine Aussage getroffen werden kann.

## **7.2.2 ELISA als Nachweisverfahren**

In dieser Arbeit wurde die sACE2-Konzentration mittels Sandwich-ELISA gemessen und zufriedenstellende Ergebnisse erzielt. Die Verwendung eines ELISAs ist gängig für die Quantifizierung von sACE2 und wurde in vielen anderen Studien genutzt [95,106,152,187]. Eine andere Möglichkeit der sACE2 Messung ist die Verwendung der proprietary proximity extension assay (PEA) technology, bei der mit Oligonukleotiden markierte Antikörper an sACE2 binden und dann mittels PCR quantifiziert werden [7]. Dieses Verfahren wurde z.B. von Sama et al. [167] und Swärd et al. [184] zur Messung von sACE2 verwendet. Hier besteht der Nachteil, dass das Ergebnis relativ ist und nicht in absolute Zahlen umgerechnet werden kann [167].

Die Messung von sTMPRSS2 mittels ELISA wurde in der Literatur beschrieben und von Lee et al. [106] und Lerner et al. [95] genutzt. Bei mir lagen die Messwerte von sTMPRSS2 unterhalb des Messbereichs. Bei Lerner et al. [95] lagen die medianen Werte der sTMPRSS2-Konzentrationen zwischen 3,58 und 8,34 ng/ml, was innerhalb des Messbereichs des hier verwendeten

ELISA-Kits (0,054ng/ml-10ng/ml) liegt. Trotzdem gelang keine valide Messung. Die Standardkurven des ELISAs und ein aus der Standardkurve gewonnener Kontrollwert waren akzeptabel, sodass ein methodischer Fehler oder ein Versagen des ELISA-Kits unwahrscheinlich sind. Lee et al. [106] und Lerner et al. [95] haben für die sTMPRSS2-Messung mit ELISA-Kits verschiedener Hersteller Serum-Proben verwendet während in der vorliegenden Studie neben Serum- auch Plasma-Proben genutzt wurden. Das hier genutzte ELISA-Kit ist auch für die Messung in Lithium-Heparin-Plasma geeignet, möglicherweise ist sTMPRSS2 aber im Serum besser messbar. Weitere Erklärungsansätze für das Ergebnis könnten ein mehrmaliges Auftauen der Proben, oder eine längere Lagerungsdauer (max. 5 Monate bei -20°C) sein, die den Nachweis von sTMPRSS2 erschwert haben. Auch möglich wäre, dass die Konzentrationen von sTMPRSS2 in den Proben tatsächlich unter 0,054ng/ml liegt, da bisher keine Normwerte für sTMPRSS2 bestimmt wurden. Zusammenfassend ist anzunehmen, dass die Messung aufgrund von technischen Aspekten oder der Probenasservierung und Lagerung nicht gelang. Hier sollten weitere Untersuchungen mittels ELISA eines anderen Herstellers mit Serum-Proben folgen, um die sTMPRSS2-Level im Blut exakt zu bestimmen.

### **7.3 Diskussion der Ergebnisse**

#### **7.3.1 Höhere sACE2-Konzentrationen bei COVID-19 und Interpretation**

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit COVID-19 ein hohes sACE2 Level haben, das sich signifikant von dem sACE2 Level der Gesunden unterscheidet. Dies gilt für Kinder und Erwachsene gleichermaßen. Passend zu diesem Ergebnis wurden hohe sACE2-Konzentrationen bei Patienten mit COVID-19, auch von Lundström et al. [123] beschrieben. Auch konnte eine erhöhte sACE2-Konzentration von Reindl-Schwaighofer et al. [138]. bei Patienten mit einem schweren Verlauf von COVID-19 festgestellt werden. Patel et al. [149] wies eine höhere sACE2-Aktivität bei genesenen COVID-19-Patienten im Vergleich zu Gesunden nach. Zuvor wurde ein Zusammenhang zwischen der sACE2-Aktivität und der sACE2-Konzentration beschrieben [220], weswegen auch diese Forschungsarbeiten dieses Ergebnis stützt.

Überraschenderweise haben Osman et al. [135] eine verminderte sACE2-Konzentration bei Patienten mit einer prolongierten Virusausscheidung im Vergleich zu Gesunden festgestellt. Rieder et al. [152] konnten zwischen Patienten mit respiratorischen Symptomen mit bzw. ohne COVID-19 keine Unterschiede in der sACE2-Konzentration feststellen. Möglicherweise ist dies durch die in diesen Studien verwendete geringe Kohortengröße oder den unterschiedlichen Zeitpunkt der Abnahme der Proben nach Erkrankungsbeginn zu erklären.

Hier konnte nachgewiesen werden, dass das sACE2-Level bei Erwachsenen mit COVID-19 signifikant höher ist als das sACE2-Level von Patienten der Kinderklinik und der Inneren Medizin. Hierbei wiesen internistische Patienten und die Patienten der Kinderklinik eine höhere sACE2-Konzentration auf als gesunde Kontrollen. Der Unterschied zwischen den internistischen Patienten und den gesunden Kontrollen ist signifikant. Dieses Ergebnis lässt zwei mögliche Hypothesen

zu, die nachfolgend im Detail erläutert werden: 1) Hohes sACE2 könnte ein Risikofaktor für die Infektion mit SARS-CoV-2 und einen schweren Krankheitsverlauf darstellen und 2) die Infektion mit SARS-CoV-2 könnte über das Virus selbst oder die Inflammation zu einer Erhöhung von sACE2 führen.

Zu 1): Personen mit internistischen Erkrankungen scheinen generell ein höheres sACE2 zu exprimieren als Gesunde, signifikant ist der Unterschied zwischen den internistischen Patienten und den Gesunden Kontrollen sowie den Patienten der Dermatologischen Ambulanz. Das passt zu der Studie von Rice et al. [151], die einen Zusammenhang zwischen verschiedenen Vorerkrankungen (z.B. Kardiovaskulär, Diabetes, Adipositas) und einer hohen sACE2-Konzentration beschreibt. Treskova-Schwarzbach et al. [194] haben in ihrem Review genannte Vorerkrankungen als Risikofaktor für einen schweren Verlauf von COVID-19 identifiziert. Dermatologische Vorerkrankungen stellen laut Treskova-Schwarzbach et al. [194] keinen Risikofaktor für einen schweren Verlauf dar, entsprechend zeigte sich in dieser Gruppe eine niedrige sACE2-Konzentration.

Zusammengenommen legt das die Vermutung nahe, dass eine hohe sACE2-Konzentration ein Risikofaktor für eine Infektion mit SARS-CoV-2 bzw. einen schweren Verlauf ist. Hierfür sprechen auch die in vitro-Experimente von Yeung et al. [217], bei welchen ein im physiologischen Bereich gelegenes höheres sACE2 die Infektion der Zellen verbessert. Hohe sACE2-Werte (>7200 pg/ml) bei COVID-19 Patienten sind laut Lerner et al. [95] mit der Notwendigkeit einer Beatmung assoziiert, was die Hypothese von hohen sACE2-Werten als Risikofaktor stützt. Um diese Hypothese zu prüfen wäre eine prospektive Studie, die das sACE2-Level und das Risiko an COVID-19 zu erkranken untersucht, zielführend.

Zu 2) Der signifikante Unterschied des sACE2-Levels der internistisch erkrankten Personen zu den Personen mit COVID-19 legt die Vermutung nahe, dass SARS-CoV-2 selbst, oder die mit der Infektion einhergehende pathophysiologische Veränderungen, wie Inflammation, die sACE2-Konzentration erhöht. Entsprechend haben Reindl-Schwaighofer et al. [149] höheres sACE2 bei Patienten mit schwerer COVID-19-Erkrankung nachgewiesen. Auch wurde für SARS-CoV-1 festgestellt, dass es über Shedding ACE2 von der Zelle abspalten kann, wodurch sACE2 entsteht [68,74]. Dies wäre auch für SARS-CoV-2 denkbar. Auch Hypoxie, ein typisches Problem bei COVID-19, kann die sACE2-Konzentration erhöhen [91]. Hier könnten weiterführende Studien, die Effekte einer SARS-CoV-2-Infektion auf zellulärer Ebene untersuchen, Einblicke liefern.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass sehr hohe Dosen an rekombinantem humanen sACE2 SARS-CoV-2 neutralisieren können [129], was im Rahmen einer Case Study erfolgreich angewendet wurde und zu einer zügigen Verbesserung der klinischen Symptome der Patientin beitrug [227]. Somit scheint sACE2 je nach Konzentration eine Doppelrolle zu spielen.

### **7.3.2 sACE2 bei Kindern mit und ohne COVID-19**

Eine Stärke der vorliegenden Studie ist, dass Kinder und Jugendliche in die Messungen eingeschlossen wurden. Bisher sind wenige Studien zu sACE2 bei Kindern durchgeführt worden

[140,184] und soweit bekannt, wurde hier erstmals die sACE2-Konzentration bei Kindern mit COVID-19 gemessen und mit anderen Gruppen verglichen. Die ist relevant, da das Alter ein wesentlicher Risikofaktor für einen schweren Verlauf von COVID-19 ist und Kinder meist mild erkranken [122,125].

Das Ergebnis, dass Patienten der Kinderklinik ein höheres sACE2-Level haben als die erwachsenen Patienten der Inneren Medizin, ist überraschend. Studien mit gesunden Kindern zeigten niedrigere sACE2-Werte im Vergleich zu Erwachsenen. Bei Pavel et al. [140] lagen die sACE2-Werte gesunder Kinder unter fünf Jahren niedriger als bei gesunden Erwachsenen und Swärd et al. [184] stellten einen Anstieg der sACE2-Konzentration während der Pubertät fest. Auf Ebene der Genexpression in nasalen Epithelzellen konnten Bunyanvanich et al. [21] ebenfalls eine niedrigere Genexpression von ACE2 bei Kindern feststellen. Im Gegensatz zu den genannten Studien sind die Kinder in der vorliegenden Arbeit erkrankt, was ein Erklärungsansatz für die höhere sACE2-Konzentration darstellen könnte. Zudem ist die Gruppe von der Schwere der Erkrankung her sehr heterogen, was eine höhere sACE2-Konzentration begünstigen könnte. Trotzdem besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den sACE2-Konzentrationen der Patienten der Kinderklinik und den an COVID-19 erkrankten Erwachsenen, was zu dem Ergebnis des Alters als Risikofaktor für einen schweren Verlauf von COVID-19 passt [125]. Wie bereits oben erwähnt, sollte in weiteren Studien eine Kontrollgruppe mit gesunden Kindern für ein tiefergehendes Verständnis von sACE2 bei Kindern verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit haben Kinder mit COVID-19 niedrigere sACE2-Konzentrationen aufgewiesen als die Erwachsenen mit COVID-19. Auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant ist, kann es Hinweise auf die besondere Rolle von sACE2 hinsichtlich eines mildereren Verlaufs bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen geben, da ein hohes sACE2 mit einem schwererem Verlauf assoziiert ist [149].

Zudem wurde bei der Gruppe mit COVID-19 ein positiver Alterszusammenhang nachgewiesen. Dies passt zu den Daten von Pavel et al. [140] und Swärd et al. [184], die einen Anstieg von sACE2 mit dem Alter beschreiben.

Abgesehen von den Patienten mit COVID-19 und der Dermatologie wurde in keiner anderen Gruppe ein Anstieg von sACE2 mit dem Alter gefunden, dies könnte möglicherweise durch die kleine Menge an Patienten oder durch verschiedene Vorerkrankungen der Patienten, die einen Einfluss auf sACE2 haben, zu erklären sein.

### **7.3.3 sACE2 und Geschlecht**

Entsprechend vorheriger Studien [123,140,147], lag die sACE2-Konzentration bei weiblichen Probanden niedriger als bei männlichen. Allerdings ist der Unterschied nicht signifikant. In anderen Studien konnte für Männer ein signifikant höhere sACE2-Werte festgestellt werden [123,140,147]. Dies ist relevant, da männliches Geschlecht einen Risikofaktor für einen schweren

Verlauf von COVID-19 darstellt [134]. Die Gruppen dieser Studie waren nicht nach Krankheits-schwere entsprechend des Geschlechts angeglichen, was erklären könnte weswegen kein signifi-kanter Unterschied gefunden werden konnte.

### **7.3.4 sACE2 und Down-Syndrom**

In der vorliegenden Studie haben Probanden mit Down-Syndrom die höchste sACE2-Konzentra-tion von allen Probandengruppen ohne COVID-19. Es ist signifikant höher als das der gesunden Kontrollen. Pathophysiologisch könnten Komorbiditäten, die beim Down-Syndrom vorkommen und mit einem hohen sACE2 assoziiert sind, ursächlich sein. Dazu gehören beispielsweise Diabe-tes, Adipositas oder Organfehlbildungen, wie angeborene Herzfehler [145,151,181]. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in andere Studien wurde bei Patienten mit COVID-19, insbe-sondere bei schwerem Verlauf, erhöhte sACE2-Werte festgestellt [123,149]. Höhere sACE2-Werte konnten im in-vitro Experiment die Infektion der Wirtszelle mit SARS-CoV-2 verbessern [217]. Somit können höhere sACE2 bei Personen mit Down-Syndrom eine pathophysiologische Ursache für den schwereren Verlauf von COVID-19 [24,33] in dieser Gruppe darstellen. Da die hier verwendete Kohorte klein war, wäre es vielversprechend die sACE2-Messung mit einer grö-ßeren Anzahl an Probanden von Personen mit Down-Syndrom zu wiederholen.

### **7.3.5 sACE2-Werte im Vergleich zu anderen Studien**

Das mediane sACE2 lag bei den gesunden Kontrollen bei 365,2 (237-656,3) pg/ml, bei den Er-wachsenen mit COVID-19 bei 2013,33 (1043,1-3792,24) pg/ml und den Kindern mit COVID-19 1286,45 (768,34-1696,819) pg/ml. Die Messwerte der anderen Gruppen lagen dazwischen (vgl. 5. Ergebnisse).

Die Angaben zu sACE2-Messwerten innerhalb der Literatur differieren stark. So haben Rieder et al. [152] bei COVID-19-Patienten ein sACE2 im Serum von 1,264pg/ml gefunden, wohingegen Lerner et al. [95] bei COVID-19-Patienten mediane sACE2-Konzentrationen von 6700pg/ml (Normal-Station) bzw. 9840pg/ml (Intensivstation) gemessen haben. Bei Reindl-Schwaighofer et al. [149] lagen die höher gemessene medianen sACE2-Konzentration bei COVID-19 Patienten bei 15100pg/ml. Lundström et al.[123] geben mediane sACE2-Level für Gesunde von 1400pg/ml und bei COVID-19-Erkrankten von 5000pg/ml an.

Im Vergleich liegen die hier gemessenen Werte im unteren Bereich. Die starken Differenzen der sACE2-Konzentrationen sind möglicherweise auf Unterschiede innerhalb der Studienprotokolle, wie Kohortengröße, Dauer der SARS-CoV-2-Infektion bei Abnahme der Probe (laut Reindl-Schwaighofer et al. [149] steigt die sACE2-Konzentration im Krankheitsverlauf an) oder Dauer bis zur Verarbeitung der Probe zurückzuführen. Zudem wurden unterschiedliche ELISA-Kits ver-wendet. Um Normwerte für sACE2-Werte feststellen zu können, sind Studien mit einer großen Anzahl gut charakterisierter Probanden notwendig.

## **7.4 Ausblick**

COVID-19 wird die Welt auch noch in den kommenden Jahren beschäftigen. Somit ist es wichtig die Pathophysiologie der Erkrankung bestmöglich zu verstehen. Die vorliegende Promotion hat neue Einblicke in die Bedeutung von sACE2 bei Patienten und insbesondere Kindern mit COVID-19 geliefert. Die Daten sprechen dafür, dass eine höhere sACE2-Konzentration im Blut für eine COVID-19 Erkrankung und einen schweren Verlauf prädisponiert. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse können weitere Forschungsarbeiten aufgebaut werden. Hierbei sollte die sACE2-Konzentration im Blut großer Kohorten klinisch gut charakterisierter Probanden und Kontrollgruppen mit gesunden Kindern und Erwachsenen, gemessen werden. Mittels eines prospektiven Studiendesigns könnten so tiefergehende Zusammenhänge zwischen sACE2-Konzentration und dem Risiko an COVID-19 zu erkranken bzw. einen schweren Verlauf zu erleiden, untersucht werden. Basierend darauf könnte sACE2 als Risikomarker im klinischen Alltag für Patienten mit COVID-19 eingesetzt werden.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Abe M, Tahara M, Sakai K, Yamaguchi H, Kanou K, Shirato K, Kawase M, Noda M, Kimura H, Matsuyama S, Fukuhara H, Mizuta K, Maenaka K, Ami Y, Esumi M, Kato A, Takeda M (2013) TMPRSS2 is an activating protease for respiratory parainfluenza viruses. *J Virol* 87:11930–11935
2. Afar DE, Vivanco I, Hubert RS, Kuo J, Chen E, Saffran DC, Raitano AB, Jakobovits A (2001) Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Res* 61:1686–1692
3. Allotey J, Stallings E, Bonet M, Yap M, Chatterjee S, Kew T, Debenham L, Llavall A, Dixit A, Zhou D, Balaji R, Lee S, Qiu X, Mingyang M, Coomar D, Sheikh J, Lawson H, Ansari K, van Wely M, van Leeuwen E, Kostova E, Kunst H, Khalil A, Tiberi S, Bri-zuela V, Broutet N, Kara E, Kim C, Thorson A, Oladapo O, Mofenson L, Zamora J, Thangaratinam S (2020) Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: living systematic review and meta-analysis. *BMJ* 370:
4. Andreano E, Piccini G, Licastro D, Casalino L, Johnson NV, Paciello I, Dal Monego S, Pantano E, Manganaro N, Manenti A, Manna R, Casa E, Hyseni I, Benincasa L, Montomoli E, Amaro RE, McLellan JS, Rappuoli R (2020) SARS-CoV-2 escape in vitro from a highly neutralizing COVID-19 convalescent plasma. *BioRxiv Prepr Serv Biol* 2020.12.28.424451
5. Antalis TM, Bugge TH, Wu Q (2011) Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 99:1–50
6. Arendse LB, Danser AHJ, Poglitsch M, Touyz RM, Burnett JC, Llorens-Cortes C, Ehlers MR, Sturrock ED (2019) Novel Therapeutic Approaches Targeting the Renin-Angiotensin System and Associated Peptides in Hypertension and Heart Failure. *Pharmacol Rev* 71:539–570
7. Assarsson E, Lundberg M, Holmquist G, Björkesten J, Bucht Thorsen S, Ekman D, Eriksson A, Rennel Dickens E, Ohlsson S, Edfeldt G, Andersson A-C, Lindstedt P, Stenvang J, Gullberg M, Fredriksson S (2014) Homogenous 96-Plex PEA Immunoassay Exhibiting High Sensitivity, Specificity, and Excellent Scalability. *PLoS ONE* 9:e95192
8. Ayittey FK, Ayittey MK, Chiwero NB, Kamasah JS, Dzuovor C (2020) Economic impacts of Wuhan 2019-nCoV on China and the world. *J Med Virol* 92:473–475
9. Bellino S, Punzo O, Rota MC, Del Manso M, Urdiales AM, Andrianou X, Fabiani M, Boros S, Vescio F, Riccardo F, Bella A, Filia A, Rezza G, Villani A, Pezzotti P, COVID-19 WORKING GROUP (2020) COVID-19 Disease Severity Risk Factors for Pediatric Patients in Italy. *Pediatrics* 146:e2020009399
10. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR (2012) Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4:1011–1033
11. Beniac DR, Andonov A, Grudeski E, Booth TF (2006) Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat Struct Mol Biol* 13:751–752
12. Ben-Shmuel A, Brosh-Nissimov T, Glinert I, Bar-David E, Sittner A, Poni R, Cohen R, Achdout H, Tamir H, Yahalom-Ronen Y, Politi B, Melamed S, Vitner E, Cherry L, Israeli O, Beth-Din A, Paran N, Israely T, Yitzhaki S, Levy H, Weiss S (2020) Detection and infectivity potential of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-

- CoV-2) environmental contamination in isolation units and quarantine facilities. *Clin Microbiol Infect* 26:1658–1662
13. Benvenuto D, Giovanetti M, Salemi M, Prosperi M, Flora CD, Alcantara LCJ, Angeletti S, Ciccozzi M (2020) The global spread of 2019-nCoV: a molecular evolutionary analysis. *Pathog Glob Health* 114:64–67
  14. Berlit P, Bösel J, Franke C (2021) Neurologische Manifestationen bei COVID-19 - Deutsche Gesellschaft für Neurologie e. V. *Dtsch Ges Für Neurol E V*
  15. Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Kühl A, Pöhlmann S (2010) Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Rev Med Virol* 20:298–310
  16. Brüssow H (2022) COVID-19: Omicron – the latest, the least virulent, but probably not the last variant of concern of SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol* 15:1927–1939
  17. Buitrago-Garcia D, Egli-Gany D, Counotte MJ, Hossmann S, Imeri H, Ipekci AM, Salanti G, Low N (2020) Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 17:e1003346
  18. Bundesregierung des Inneren und für Heimat (Deutschland) (2021) Beschluss der Bundeskanzlerin und der Regierungschefinnen und Regierungschefs der Länder vom 22. März 2020. URL: [http://www.bmi.bund.de/SharedDocs/downloads/DE/veroeffentlichungen/2020/corona/hinweis-einschraenkung-soziale-kontakte.pdf;jsessionid=F075A86E504111850C9C01283E8BBD2F.1\\_cid295?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](http://www.bmi.bund.de/SharedDocs/downloads/DE/veroeffentlichungen/2020/corona/hinweis-einschraenkung-soziale-kontakte.pdf;jsessionid=F075A86E504111850C9C01283E8BBD2F.1_cid295?__blob=publicationFile&v=2)
  19. Bundesregierung von Deutschland (2022) Corona: Fallzahlen in Deutschland | Bundesregierung. URL: <https://www.bundesregierung.de/breg-de/aktuelles/fallzahlen-corona-virus-1738210>
  20. Bundesregierung von Deutschland Telefonkonferenz der Bundeskanzlerin mit den Regierungschefinnen und Regierungschefs der Länder am 13. Dezember 2020. URL: <https://www.bundesregierung.de/breg-de/suche/telefonkonferenz-der-bundeskanzlerin-mit-den-regierungschefinnen-und-regierungschefs-der-laender-am-13-dezember-2020-1827392>
  21. Bunyavanich S, Do A, Vicencio A (2020) Nasal Gene Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Children and Adults. *JAMA* 323:2427–2429
  22. Buratowski S (2003) mRNA Capping. *Reactome - Curated Knowledgebase Biol Pathw* 06:
  23. Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, Tikellis C, Grant SL, Lew RA, Smith AI, Cooper ME, Johnston CI (2005) Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J* 26:369–375; discussion 322-324
  24. Callea M, Cammarata-Scalisi F, Galeotti A, Villani A, Valentini D (2020) COVID-19 and Down syndrome. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 109:1901–1902
  25. Campbell DJ, Zeitz CJ, Esler MD, Horowitz JD (2004) Evidence against a major role for angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) in angiotensin peptide metabolism in the human coronary circulation. *J Hypertens* 22:1971–1976
  26. Carfi A, Bernabei R, Landi F (2020) Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA* 324:603–605

27. Centers for Disease Control and Prevention (USA) (2020) Laboratory-Confirmed Influenza Hospitalizations. URL: <https://gis.cdc.gov/grasp/fluview/FluHospChars.html>
28. Chan JF-W, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, To KK-W, Yuan S, Yuen K-Y (2020) Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect* 9:221–236
29. Chen J, Wang R, Gilby NB, Wei G-W (2022) Omicron Variant (B.1.1.529): Infectivity, Vaccine Breakthrough, and Antibody Resistance. *J Chem Inf Model* 62:412–422
30. Chen Y, Guo Y, Pan Y, Zhao ZJ (2020) Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. *Biochem Biophys Res Commun* 525:135–140
31. Chen Y, Shan K, Qian W (2020) Asians Do Not Exhibit Elevated Expression or Unique Genetic Polymorphisms for ACE2, the Cell-Entry Receptor of SARS-CoV-.
32. Cheng Y, Ma N, Witt C, Rapp S, Wild PS, Andreae MO, Pöschl U, Su H (2021) Face masks effectively limit the probability of SARS-CoV-2 transmission. *Science* eabg6296
33. Clift AK, Coupland CAC, Keogh RH, Hemingway H, Hippisley-Cox J (2021) COVID-19 Mortality Risk in Down Syndrome: Results From a Cohort Study of 8 Million Adults. *Ann Intern Med* 174:572–576
34. Colaneri M, Seminari E, Novati S, Asperges E, Biscarini S, Piralla A, Percivalle E, Casaniti I, Baldanti F, Bruno R, Mondelli MU, Bruno R, Mondelli MU, Brunetti E, Matteo AD, Seminari E, Maiocchi L, Zuccaro V, Pagnucco L, Ludovisi S, Lissandrin R, Parisi A, Sacchi P, Patruno SFA, Michelone G, Gulminetti R, Zanaboni D, Novati S, Maserati R, Orsolini P, Vecchia M (2020) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 RNA contamination of inanimate surfaces and virus viability in a health care emergency unit. *Clin Microbiol Infect* 26:1094.e1-1094.e5
35. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM (2002) Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417:822–828
36. Cui J, Li F, Shi Z-L (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 17:181–192
37. Cui L, Wang H, Ji Y, Yang J, Xu S, Huang X, Wang Z, Qin L, Tien P, Zhou X, Guo D, Chen Y The Nucleocapsid Protein of Coronaviruses Acts as a Viral Suppressor of RNA Silencing in Mammalian Cells. *J Virol* 89:9029–9043
38. Cummings MJ, Baldwin MR, Abrams D, Jacobson SD, Meyer BJ, Balough EM, Aaron JG, Claassen J, Rabbani LE, Hastie J, Hochman BR, Salazar-Schicchi J, Yip NH, Brodie D, O'Donnell MR (2020) Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *Lancet Lond Engl* 395:1763–1770
39. Cunningham JW, Vaduganathan M, Claggett BL, Jering KS, Bhatt AS, Rosenthal N, Solomon SD (2021) Clinical Outcomes in Young US Adults Hospitalized With COVID-19. *JAMA Intern Med* 181:379–381
40. Daly JL, Simonetti B, Klein K, Chen K-E, Williamson MK, Antón-Plágaro C, Shoemark DK, Simón-Gracia L, Bauer M, Hollandi R, Greber UF, Horvath P, Sessions RB, Helenius A, Hiscox JA, Teesalu T, Matthews DA, Davidson AD, Collins BM, Cullen PJ, Yamauchi Y (2020) Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* 370:861–865

41. Damme WV, Dahake R, Delamou A, Ingelbeen B, Wouters E, Vanham G, Pas R van de, Dossou J-P, Ir P, Abimbola S, Borghet SV der, Narayanan D, Bloom G, Engelgem IV, Ahmed MAA, Kiendrébéogo JA, Verdonck K, Brouwere VD, Bello K, Kloos H, Aaby P, Kalk A, Al-Awlaqi S, Prashanth NS, Muyembe-Tamfum J-J, Mbala P, Ahuka-Mundeké S, Assefa Y (2020) The COVID-19 pandemic: diverse contexts; different epidemics—how and why? *BMJ Glob Health* 5:e003098
42. De Toma I, Dierssen M (2021) Network analysis of Down syndrome and SARS-CoV-2 identifies risk and protective factors for COVID-19. *Sci Rep* 11:1930
43. DeDiego ML, Álvarez E, Almazán F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh W-J, Zaki SR, Subbarao K, Enjuanes L (2007) A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks the E Gene Is Attenuated In Vitro and In Vivo. *J Virol* 81:1701–1713
44. Deutsche Gesellschaft für Allgemein und Familienmedizin e.V. (2022) SARS-CoV-2/Covid-19-Informationen & Praxishilfen für niedergelassene Hausärztinnen und Hausärzte, S2e-Leitlinie Version 22.
45. Deutscher Bundestag Gesetz zur Errichtung eines Sondervermögens „Aufbauhilfe 2021“ und zur vorübergehenden Aussetzung der Insolvenzantragspflicht wegen Starkregenfällen und Hochwassern im Juli 2021 sowie zur Änderung weiterer Gesetze (Aufbauhilfegesetz 2021 – AufbhG 2021). URL: [http://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?startbk=Bundesanzeiger\\_BGBI&jumpTo=bgbl121s4147.pdf](http://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?startbk=Bundesanzeiger_BGBI&jumpTo=bgbl121s4147.pdf)
46. Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (2022) Klinische Studien | Deutsches Zentrum für Infektionsforschung. URL: <https://clinicalsite.org/~dzif/de/cat/2099/trial/4178>
47. Dhama K, Khan S, Tiwari R, Sircar S, Bhat S, Malik YS, Singh KP, Chaicumpa W, Bonilla-Aldana DK, Rodriguez-Morales AJ (2020) Coronavirus Disease 2019–COVID-19. *Clin Microbiol Rev* 33:
48. Dhochak N, Singhal T, Kabra SK, Lodha R (2020) Pathophysiology of COVID-19: Why Children Fare Better than Adults? *Indian J Pediatr* 87:537–546
49. Dobbs LG (1989) Pulmonary surfactant. *Annu Rev Med* 40:431–446
50. Doerr HW, Gerlich W, Herausgeber (2010) Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen ; 115 Tabellen. 2. edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
51. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S (2000) A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ Res* 87:e1–e9
52. Driggin E, Madhavan MV, Bikdeli B, Chuich T, Laracy J, Biondi-Zoccai G, Brown TS, Der Nigoghossian C, Zidar DA, Haythe J, Brodie D, Beckman JA, Kirtane AJ, Stone GW, Krumholz HM, Parikh SA (2020) Cardiovascular Considerations for Patients, Health Care Workers, and Health Systems During the COVID-19 Pandemic. *J Am Coll Cardiol* 75:2352–2371
53. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H-R, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RAM, Berger A, Burguière A-M, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra J-C, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk H-D, Osterhaus ADME, Schmitz H, Doerr HW (2003) Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med* 348:1967–1976

54. Elased KM, Cunha TS, Gurley SB, Coffman TM, Morris M (2006) New Mass Spectrometric Assay for Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activity. *Hypertension* 47:1010–1017
55. Epelman S, Shrestha K, Troughton RW, Francis GS, Sen S, Klein AL, Tang WHW (2009) Soluble angiotensin-converting enzyme 2 in human heart failure: relation with myocardial function and clinical outcomes. *J Card Fail* 15:565–571
56. European Centre for Disease Prevention and Control (2020) Paediatric inflammatory multisystem syndrome and SARS-CoV-2 infection in children. 18
57. Euser S, Aronson S, Manders I, van Lelyveld S, Herpers B, Sinnige J, Kalpoe J, van Gemeren C, Snijders D, Jansen R, Schuurmans Stekhoven S, van Houten M, Lede I, Cohen Stuart J, Slijkerman Megelink F, Kapteijns E, den Boer J, Sanders E, Wagemakers A, Souverein D (2021) SARS-CoV-2 viral-load distribution reveals that viral loads increase with age: a retrospective cross-sectional cohort study. *Int J Epidemiol* dyab145
58. Eyre DW, Taylor D, Purver M, Chapman D, Fowler T, Pouwels KB, Walker AS, Peto TE (2021) The impact of SARS-CoV-2 vaccination on Alpha & Delta variant transmission. 2021.09.28.21264260
59. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido D da S, Mishra S, Crispim MAE, Sales FCS, Hawryluk I, McCrone JT, Hulsmit RJG, Franco LAM, Ramundo MS, de Jesus JG, Andrade PS, Coletti TM, Ferreira GM, Silva CAM, Manuli ER, Pereira RHM, Peixoto PS, Kraemer MUG, Gaburo N, Camilo C da C, Hoeltgebaum H, Souza WM, Rocha EC, de Souza LM, de Pinho MC, Araujo LJT, Malta FSV, de Lima AB, Silva J do P, Zauli DAG, Ferreira AC de S, Schnekenberg RP, Laydon DJ, Walker PGT, Schlüter HM, dos Santos ALP, Vidal MS, Del Caro VS, Filho RMF, dos Santos HM, Aguiar RS, Proença-Modena JL, Nelson B, Hay JA, Monod M, Miscouridou X, Coupland H, Sonabend R, Vollmer M, Gandy A, Prete CA, Nascimento VH, Suchard MA, Bowden TA, Pond SLK, Wu C-H, Ratmann O, Ferguson NM, Dye C, Loman NJ, Lemey P, Rambaut A, Fraiji NA, Carvalho M do PSS, Pybus OG, Flaxman S, Bhatt S, Sabino EC (2021) Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science* 372:815–821
60. Fehr AR, Perlman S (2015) Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses* 1282:1–23
61. Feldstein LR, Rose EB, Horwitz SM, Collins JP, Newhams MM, Son MBF, Newburger JW, Kleinman LC, Heidemann SM, Martin AA, Singh AR, Li S, Tarquinio KM, Jaggi P, Oster ME, Zackai SP, Gillen J, Ratner AJ, Walsh RF, Fitzgerald JC, Keenaghan MA, Alharash H, Doymaz S, Clouser KN, Giuliano JS, Gupta A, Parker RM, Maddux AB, Havalad V, Ramsingh S, Bukulmez H, Bradford TT, Smith LS, Tenforde MW, Carroll CL, Riggs BJ, Gertz SJ, Daube A, Lansell A, Coronado Munoz A, Hobbs CV, Marohn KL, Halasa NB, Patel MM, Randolph AG (2020) Multisystem Inflammatory Syndrome in U.S. Children and Adolescents. *N Engl J Med* 383:334–346
62. Feldt T, Karagiannidis C, Mager S, Mikolajewska A, Uhrig A, Witzke O, Wolf T, Beutel G, Lachmann G (2020) Welche Rolle spielt ein mögliches Hyperinflammationssyndrom bei einer schweren COVID-19-Infektion und können hieraus Konsequenzen für die Therapie gezogen werden? Robert Koch-Institut URL: <https://edoc.rki.de/handle/176904/6898>
63. Felsenstein S, Hedrich CM (2020) COVID-19 in children and young people. *Lancet Rheumatol* 2:e514–e516

64. Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA (2005) Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1–7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 289:H2281–H2290
65. Fisman DN, Tuite AR (2021) Evaluation of the relative virulence of novel SARS-CoV-2 variants: a retrospective cohort study in Ontario, Canada. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can* 193:E1619–E1625
66. Fourrier F, Chopin C, Wallaert B, Mazurier C, Mangalaboyi J, Durocher A (1985) Compared evolution of plasma fibronectin and angiotensin-converting enzyme levels in septic ARDS. *Chest* 87:191–195
67. Ge H, Wang X, Yuan X, Xiao G, Wang C, Deng T, Yuan Q, Xiao X (2020) The epidemiology and clinical information about COVID-19. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1–9
68. Glowacka I, Bertram S, Herzog P, Pfefferle S, Steffen I, Muench MO, Simmons G, Hofmann H, Kuri T, Weber F, Eichler J, Drosten C, Pöhlmann S (2010) Differential Down-regulation of ACE2 by the Spike Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Human Coronavirus NL63. *J Virol* 84:1198–1205
69. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, Haagmans BL, Lauber C, Leontovich AM, Neuman BW, Penzar D, Perlman S, Poon LLM, Samborskiy DV, Sidorov IA, Sola I, Ziebuhr J, Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020) The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 5:536–544
70. Götzinger F, Santiago-García B, Noguera-Julían A, Lanasma M, Lancella L, Calò Carducci FI, Gabrovská N, Velizarova S, Prunk P, Osterman V, Krivec U, Lo Vecchio A, Shingadia D, Soriano-Arandes A, Melendo S, Lanari M, Pierantoni L, Wagner N, L’Huillier AG, Heininger U, Ritz N, Bandi S, Krajcar N, Roglić S, Santos M, Christiaens C, Creuven M, Buonsenso D, Welch SB, Bogyi M, Brinkmann F, Tebruegge M, ptbnet COVID-19 Study Group (2020) COVID-19 in children and adolescents in Europe: a multinational, multicentre cohort study. *Lancet Child Adolesc Health* 4:653–661
71. Goulter AB, Goddard MJ, Allen JC, Clark KL (2004) ACE2 gene expression is up-regulated in the human failing heart. *BMC Med* 2:19
72. Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, Speth RC, Raizada MK, Katovich MJ (2007) Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H736-742
73. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, Bikdeli B, Ahluwalia N, Ausiello JC, Wan EY, Freedberg DE, Kirtane AJ, Parikh SA, Maurer MS, Nordvig AS, Accili D, Bathon JM, Mohan S, Bauer KA, Leon MB, Krumholz HM, Uriel N, Mehra MR, Elkind MSV, Stone GW, Schwartz A, Ho DD, Bilezikian JP, Landry DW (2020) Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med* 26:1017–1032
74. Haga S, Yamamoto N, Nakai-Murakami C, Osawa Y, Tokunaga K, Sata T, Yamamoto N, Sasazuki T, Ishizaka Y (2008) Modulation of TNF- $\alpha$ -converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF- $\alpha$  production and facilitates viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7809–7814
75. Hamming I, Cooper ME, Haagmans BL, Hooper NM, Korstanje R, Osterhaus ADME, Timens W, Turner AJ, Navis G, van Goor H (2007) The emerging role of ACE2 in physiology and disease. *J Pathol* 212:1–11

76. Harder T, Vygen-Bonnet S, Koch J, Bogdan C, Burchard G, Garbe E, Heininger U, Hummers E, Von Kries R, Ledig T, Littmann M, Meerpohl J, Mertens T, Meyer H, Röbl-Mathieu M, Van Der Sande M, Terhardt M, Überla K, Wichmann O, Wicker S, Wiedermann-Schmidt U, Widders G, Zepp F (2021) STIKO-Empfehlung zur Verkürzung des Impfabstands zwischen Grundimmunisierung bzw. Infektion und Auffrischimpfung auf einen Zeitraum ab 3 Monate und die dazugehörige wissenschaftliche Begründung.
77. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, Lau YC, Wong JY, Guan Y, Tan X, Mo X, Chen Y, Liao B, Chen W, Hu F, Zhang Q, Zhong M, Wu Y, Zhao L, Zhang F, Cowling BJ, Li F, Leung GM (2020) Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 26:672–675
78. Herr C, Mang S, Mozafari B, Guenther K, Speer T, Seibert M, Srikakulam SK, Beisswenger C, Ritzmann F, Keller A, Mueller R, Smola S, Eisinger D, Zemlin M, Danziger G, Volk T, Hoersch S, Krawczyk M, Lammert F, Adams T, Wagenpfeil G, Kindermann M, Marcu C, Ataya ZWD, Mittag M, Schwarzkopf K, Custodis F, Grandt D, Schaefer H, Eltges K, Lepper PM, Bals R (2021) Distinct Patterns of Blood Cytokines Beyond a Cytokine Storm Predict Mortality in COVID-19. *J Inflamm Res* 14:4651–4667
79. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu N-H, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181:271-280.e8
80. Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhout B, Pöhlmann S (2005) Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7988–7993
81. Homma Y, Katsuta T, Oka H, Inoue K, Toyoshima C, Iwaki H, Yamashita Y, Shinomiya H (2021) The incubation period of the SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant is shorter than that of other strains. *J Infect* 83:e15–e17
82. Hooper JD, Clements JA, Quigley JP, Antalis TM (2001) Type II Transmembrane Serine Proteases: Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes\*. *J Biol Chem* 276:857–860
83. Hossain MM, Tasnim S, Sultana A, Faizah F, Mazumder H, Zou L, McKyer ELJ, Ahmed HU, Ma P (2020) Epidemiology of mental health problems in COVID-19: a review. *F1000Research* 9:636
84. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* 395:497–506
85. Huang Y, Lu Y, Huang Y-M, Wang M, Ling W, Sui Y, Zhao H-L (2020) Obesity in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 113:154378
86. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, Yang P, Sarao R, Wada T, Leong-Poi H, Crackower MA, Fukamizu A, Hui C-C, Hein L, Uhlig S, Slutsky AS, Jiang C, Penninger JM (2005) Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436:112–116
87. Jacquinet E, Rao NV, Rao GV, Zhengming W, Albertine KH, Hoidal JR (2001) Cloning and characterization of the cDNA and gene for human epitheliasin. *Eur J Biochem* 268:2687–2699

88. Jansen AGSC, Sanders E a. M, Hoes AW, Loon AM van, Hak E (2007) Influenza- and respiratory syncytial virus-associated mortality and hospitalisations. *Eur Respir J* 30:1158–1166
89. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center (2022) COVID-19 Map. URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
90. Jones TC, Mühlemann B, Veith T, Biele G, Zuchowski M, Hoffmann J, Stein A, Edelmann A, Corman VM, Drosten C (2020) An analysis of SARS-CoV-2 viral load by patient age. medRxiv 2020.06.08.20125484
91. Joshi S, Mahoney S, Jahan J, Pitts L, Hackney KJ, Jarajapu YP (2020) Blood flow restriction exercise stimulates mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells and increases the circulating ACE2 levels in healthy adults. *J Appl Physiol* 128:1423–1431
92. Kannan S, Shaik Syed Ali, P, Sheeza A (2021) Omicron (B.1.1.529) – variant of concern – molecular profile and epidemiology: a mini review. *Eur Rev*
93. Karonitsch T (2021) Stellenwert der JAK-Inhibitoren („small is beautiful“). *J Für Miner Muskuloskelettale Erkrank* 28:78–83
94. Kassif Lerner R, Stein Yeshurun M, Hemi R, Zada N, Asraf K, Doolman R, Benoit SW, Santos de Oliveira MH, Lippi G, Henry BM, Pessach IM, Pode Shakked N (2022) The Predictive Value of Serum ACE2 and TMPRSS2 Concentrations in Patients with COVID-19—A Prospective Pilot Study. *J Pers Med* 12:622
95. Kassif Lerner R, Stein Yeshurun M, Hemi R, Zada N, Asraf K, Doolman R, Benoit SW, Santos de Oliveira MH, Lippi G, Henry BM, Pessach IM, Pode Shakked N (2022) The Predictive Value of Serum ACE2 and TMPRSS2 Concentrations in Patients with COVID-19—A Prospective Pilot Study. *J Pers Med* 12:622
96. Katopodis P, Randeve HS, Spandidos DA, Saravi S, Kyrou I, Karteris E (2022) Host cell entry mediators implicated in the cellular tropism of SARS-CoV-2, the pathophysiology of COVID-19 and the identification of microRNAs that can modulate the expression of these mediators (Review). *Int J Mol Med* 49:1–12
97. Khan M, Adil SF, Alkathlan HZ, Tahir MN, Saif S, Khan M, Khan ST (2020) COVID-19: A Global Challenge with Old History, Epidemiology and Progress So Far. *Mol Basel Switz* 26:E39
98. Kim TS, Heinlein C, Hackman RC, Nelson PS (2006) Phenotypic Analysis of Mice Lacking the Tmprss2-Encoded Protease. *Mol Cell Biol* 26:965–975
99. Kin N, Miszczak F, Lin W, Ar Gouilh M, Vabret A (2015) Genomic Analysis of 15 Human Coronaviruses OC43 (HCoV-OC43s) Circulating in France from 2001 to 2013 Reveals a High Intra-Specific Diversity with New Recombinant Genotypes. *Viruses* 7:2358–2377
100. Kluge S, Janssens U, Welte T, Weber-Carstens S (2021) S3-Leitlinie - Empfehlungen zur stationären Therapie von Patienten mit COVID-19.
101. Kono K, Takahashi A, Sugai H, Umekawa T, Yano T, Kamiyasu K, Teramatsu M, Fujii H (2005) Oral trypsin inhibitor can improve reflux esophagitis after distal gastrectomy concomitant with decreased trypsin activity. *Am J Surg* 190:412–417
102. Kreuzberger N, Hirsch C, Chai KL, Tomlinson E, Khosravi Z, Popp M, Neidhardt M, Piechotta V, Salomon S, Valk SJ, Monsef I, Schmaderer C, Wood EM, So-Osman C,

- Roberts DJ, McQuilten Z, Estcourt LJ, Skoetz N (2021) SARS-CoV-2-neutralising monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Cochrane Database Syst Rev* 9:CD013825
103. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, Bao L, Zhang B, Liu G, Wang Z, Chappell M, Liu Y, Zheng D, Leibbrandt A, Wada T, Slutsky AS, Liu D, Qin C, Jiang C, Penninger JM (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* 11:875–879
  104. Laqqan M, Schwaighofer C, Graeber S, Raedle-Hurst T (2018) Predictive value of soluble ST2 in adolescent and adult patients with complex congenital heart disease. *PLoS ONE* 13:e0202406
  105. le Tran Y, Forster C (1997) Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:676–682
  106. Lee J-H, Lee CE, Yoo Y, Shin E, An J, Park SY, Song W-J, Kwon H-S, Cho YS, Moon H-B, Kim T-B (2022) Soluble ACE2 and TMPRSS2 Levels in the Serum of Asthmatic Patients. *J Korean Med Sci* 37:e65
  107. Lei Y, Zhang J, Schiavon CR, He M, Chen L, Shen H, Zhang Y, Yin Q, Cho Y, Andrade L, Shadel GS, Hepokoski M, Lei T, Wang H, Zhang J, Yuan JX-J, Malhotra A, Manor U, Wang S, Yuan Z-Y, Shyy JY-J (2021) SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circ Res* 128:1323–1326
  108. Lely AT, Hamming I, van Goor H, Navis GJ (2004) Renal ACE2 expression in human kidney disease. *J Pathol* 204:587–593
  109. Levy A, Yagil Y, Bursztyn M, Barkalifa R, Scharf S, Yagil C (2008) ACE2 expression and activity are enhanced during pregnancy. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 295:R1953–R1961
  110. Li B, Deng A, Li K, Hu Y, Li Z, Xiong Q, Liu Z, Guo Q, Zou L, Zhang H, Zhang M, Ouyang F, Su J, Su W, Xu J, Lin H, Sun J, Peng J, Jiang H, Zhou P, Hu T, Luo M, Zhang Y, Zheng H, Xiao J, Liu T, Che R, Zeng H, Zheng Z, Huang Y, Yu J, Yi L, Wu J, Chen J, Zhong H, Deng X, Kang M, Pybus OG, Hall M, Lythgoe KA, Li Y, Yuan J, He J, Lu J (2021) Viral infection and transmission in a large, well-traced outbreak caused by the SARS-CoV-2 Delta variant. 2021.07.07.21260122
  111. Li F (2016) Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol* 3:237–261
  112. Li G, He X, Zhang L, Ran Q, Wang J, Xiong A, Wu D, Chen F, Sun J, Chang C (2020) Assessing ACE2 expression patterns in lung tissues in the pathogenesis of COVID-19. *J Autoimmun* 112:102463
  113. Li J, Huang DQ, Zou B, Yang H, Hui WZ, Rui F, Yee NTS, Liu C, Nerurkar SN, Kai JCY, Teng MLP, Li X, Zeng H, Borghi JA, Henry L, Cheung R, Nguyen MH (2021) Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *J Med Virol* 93:1449–1458
  114. Li M-Y, Li L, Zhang Y, Wang X-S (2020) Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty* 9:45
  115. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426:450–454

116. Li X, Xu S, Yu M, Wang K, Tao Y, Zhou Y, Shi J, Zhou M, Wu B, Yang Z, Zhang C, Yue J, Zhang Z, Renz H, Liu X, Xie J, Xie M, Zhao J (2020) Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol* 146:110–118
117. Liguoro I, Pilotto C, Bonanni M, Ferrari ME, Pusiol A, Nocerino A, Vidal E, Cogo P (2020) SARS-COV-2 infection in children and newborns: a systematic review. *Eur J Pediatr* 1–18
118. Liu L, Wang P, Nair MS, Yu J, Rapp M, Wang Q, Luo Y, Chan JF-W, Sahi V, Figueroa A, Guo XV, Cerutti G, Bimela J, Gorman J, Zhou T, Chen Z, Yuen K-Y, Kwong PD, Sodroski JG, Yin MT, Sheng Z, Huang Y, Shapiro L, Ho DD (2020) Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* 584:450–456
119. Liu Y, Gayle AA, Wilder-Smith A, Rocklöv J (2020) The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *J Travel Med* 27:taaa021
120. Lucas J, True L, Hawley S, Matsumura M, Morrissey C, Vessella R, Nelson P (2008) The androgen-regulated type II serine protease TMPRSS2 is differentially expressed and mislocalized in prostate adenocarcinoma. *J Pathol* 215:118–125
121. Lucas JM, Heinlein C, Kim T, Hernandez SA, Malik MS, True LD, Morrissey C, Corey E, Montgomery B, Mostaghel E, Clegg N, Coleman I, Brown CM, Schneider EL, Craik C, Simon J, Bedalov T, Nelson PS (2014) The Androgen-Regulated Protease TMPRSS2 Activates a Proteolytic Cascade Involving Components of the Tumor Microenvironment and Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Discov* 4:1310–1325
122. Ludvigsson JF (2020) Systematic review of COVID-19 in children shows milder cases and a better prognosis than adults. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 10.1111/apa.15270
123. Lundström A, Ziegler L, Havervall S, Rudberg A, von Meijenfeldt F, Lisman T, Mackman N, Sandén P, Thålin C (2021) Soluble angiotensin-converting enzyme 2 is transiently elevated in COVID-19 and correlates with specific inflammatory and endothelial markers. *J Med Virol* 93:5908–5916
124. Madewell ZJ, Yang Y, Longini IM Jr, Halloran ME, Dean NE (2020) Household Transmission of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* 3:e2031756
125. Mallapaty S (2020) The coronavirus is most deadly if you are older and male — new data reveal the risks. *Nature* 585:16–17
126. Mallapaty S (2020) Mystery deepens over animal source of coronavirus. *Nature* 579:18–19
127. Malle L, Gao C, Hur C, Truong HQ, Bouvier NM, Percha B, Kong X-F, Bogunovic D (2021) Individuals with Down syndrome hospitalized with COVID-19 have more severe disease. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 23:576–580
128. McAloon C, Collins Á, Hunt K, Barber A, Byrne AW, Butler F, Casey M, Griffin J, Lane E, McEvoy D, Wall P, Green M, O’Grady L, More SJ (2020) Incubation period of COVID-19: a rapid systematic review and meta-analysis of observational research. *BMJ Open* 10:e039652
129. Monteil V, Kwon H, Prado P, Hagelkrüys A, Wimmer RA, Stahl M, Leopoldi A, Garreta E, Hurtado del Pozo C, Prosper F, Romero JP, Wirnsberger G, Zhang H, Slutsky AS, Conder R, Montserrat N, Mirazimi A, Penninger JM (2020) Inhibition of SARS-CoV-2

- Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. Cell 181:905-913.e7
130. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, Droese B, Klaus JP, Makino S, Sawicki SG, Siddell SG, Stamou DG, Wilson IA, Kuhn P, Buchmeier MJ (2011) A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol* 174:11–22
  131. Nikolopoulou GB, Maltezou HC (2022) COVID-19 in Children: Where do we Stand? *Arch Med Res* 53:1–8
  132. Ohshio G, Saluja AK, Leli U, Sengupta A, Steer ML (1989) Esterase inhibitors prevent lysosomal enzyme redistribution in two noninvasive models of experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 96:853–859
  133. Orte C, Polak JM, Haworth SG, Yacoub MH, Morrell NW (2000) Expression of pulmonary vascular angiotensin-converting enzyme in primary and secondary plexiform pulmonary hypertension. *J Pathol* 192:379–384
  134. Ortolan A, Lorenzin M, Felicetti M, Doria A, Ramonda R (2020) Does gender influence clinical expression and disease outcomes in COVID-19? A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 99:496–504
  135. Osman IO, Melenotte C, Brouqui P, Million M, Lagier J-C, Parola P, Stein A, La Scola B, Meddeb L, Mege J-L, Raoult D, Devaux CA (2021) Expression of ACE2, Soluble ACE2, Angiotensin I, Angiotensin II and Angiotensin-(1-7) Is Modulated in COVID-19 Patients. *Front Immunol* 12:625732
  136. Oxfam International (2022) Pandemic of greed. URL: <https://www.oxfam.org/en/research/pandemic-greed>
  137. Paoloni-Giacobino A, Chen H, Peitsch MC, Rossier C, Antonarakis SE (1997) Cloning of the TMPRSS2 gene, which encodes a novel serine protease with transmembrane, LDLRA, and SRCR domains and maps to 21q22.3. *Genomics* 44:309–320
  138. Patel SK, Juno JA, Lee WS, Wragg KM, Hogarth PM, Kent SJ, Burrell LM (2021) Plasma ACE2 activity is persistently elevated following SARS-CoV-2 infection: implications for COVID-19 pathogenesis and consequences. *Eur Respir J* 57:
  139. Paul-Ehrlich-Institut (2022) COVID-19-Impfstoffe - Paul-Ehrlich-Institut. URL: <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoffe/covid-19/covid-19-node.html>
  140. Pavel AB, Wu J, Renert-Yuval Y, Del Duca E, Glickman JW, Miller RL, Paller AS, Krueger JG, Guttman-Yassky E (2021) SARS-CoV-2 receptor ACE2 protein expression in serum is significantly associated with age. *Allergy* 76:875–878
  141. Peacocke EF, Heupink LF, Frønsdal K, Dahl EH, Chola L (2021) Global access to COVID-19 vaccines: a scoping review of factors that may influence equitable access for low and middle-income countries. *BMJ Open* 11:e049505
  142. Pervushin K, Tan E, Parthasarathy K, Lin X, Jiang FL, Yu D, Vararattanavech A, Soong TW, Liu DX, Torres J (2009) Structure and Inhibition of the SARS Coronavirus Envelope Protein Ion Channel. *PLOS Pathog* 5:e1000511
  143. Pickering BM, Willis AE (2005) The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol* 16:39–47

144. Public Health England (2021) SARS-CoV-2 variants of concern and variants under investigation, Technical Briefing 14. 66
145. Raedle-Hurst T, Wissing S, Mackenstein N, Obeid R, Geisel J, Wagenpfeil S, Abdul-Khaliq H (2020) Determinants of soluble angiotensin-converting enzyme 2 concentrations in adult patients with complex congenital heart disease. *Clin Res Cardiol* 1–9
146. Ramakrishnan S, Nicolau DV, Langford B, Mahdi M, Jeffers H, Mwasuku C, Krasowska K, Fox R, Binnian I, Glover V, Bright S, Butler C, Cane JL, Halner A, Matthews PC, Donnelly LE, Simpson JL, Baker JR, Fadai NT, Peterson S, Bengtsson T, Barnes PJ, Russell REK, Bafadhel M (2021) Inhaled budesonide in the treatment of early COVID-19 (STOIC): a phase 2, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 9:763–772
147. Ramchand J, Patel SK, Srivastava PM, Farouque O, Burrell LM (2018) Elevated plasma angiotensin converting enzyme 2 activity is an independent predictor of major adverse cardiac events in patients with obstructive coronary artery disease. *PloS One* 13:e0198144
148. Reid IA, Schwartz J, Ben L, Maselli J, Keil LC (1983) Interactions Between Vasopressin and the Renin–Angiotensin System. Elsevier URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308644143>
149. Reindl-Schwaighofer R, Hödlmoser S, Eskandary F, Poglitsch M, Bonderman D, Strassl R, Aberle JH, Oberbauer R, Zoufaly A, Hecking M (2021) ACE2 Elevation in Severe COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med* 203:1191–1196
150. Ren M, Yun Q, Jin-Shen H (2020) Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis.
151. Rice GI, Jones AL, Grant PJ, Carter AM, Turner AJ, Hooper NM (2006) Circulating Activities of Angiotensin-Converting Enzyme, Its Homolog, Angiotensin-Converting Enzyme 2, and Neprilysin in a Family Study. *Hypertension* 48:914–920
152. Rieder M, Wirth L, Pollmeier L, Jeserich M, Goller I, Baldus N, Schmid B, Busch H-J, Hofmann M, Kern W, Bode C, Duerschmied D, Lothar A (2021) Serum ACE2, Angiotensin II, and Aldosterone Levels Are Unchanged in Patients With COVID-19. *Am J Hypertens* 34:278–281
153. Robert Koch-Institut (2020) Archiv 2020 - Epidemiologisches Bulletin 7/2020. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2020/Ausgaben/07\\_20.pdf](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2020/Ausgaben/07_20.pdf)
154. Robert Koch-Institut (2021) Epidemiologischer Steckbrief zu SARS-CoV-2 und COVID-19.
155. Robert Koch-Institut (2022) COVID-19-Fälle nach Altersgruppe und Meldewoche 07.07.2022. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Daten/Altersverteilung.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Daten/Altersverteilung.html)
156. Robert Koch-Institut (2022) Coronavirus SARS-CoV-2 - Situationsbericht vom 6.1.2022. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Situationsberichte/Jan\\_2022/2022-01-06-de.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/Jan_2022/2022-01-06-de.html)
157. Robert Koch-Institut (2022) COVID-19-Fälle nach Altersgruppe und Meldewoche.
158. Robert Koch-Institut (2022) Coronavirus SARS-CoV-2 - Situationsbericht vom 9.6.2022. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Situationsberichte/Jun\\_2022/2022-06-09-de.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Situationsberichte/Jun_2022/2022-06-09-de.html)

159. Robert Koch-Institut (2022) RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - COVID-19-Fälle nach Meldewoche und Geschlecht sowie Anteile mit für COVID-19 relevanten Symptomen, Anteile Hospitalisierter/Verstorbener und Altersmittelwert/-median (13.07.2022). URL: [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Daten/Klinische\\_Aspekte.html;jsessionid=79C37075C0768AA8BC4F2630F7DF6566.internet051?nn=13490888](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Daten/Klinische_Aspekte.html;jsessionid=79C37075C0768AA8BC4F2630F7DF6566.internet051?nn=13490888)
160. Robert Koch-Institut (2022) Hinweise zur Testung von Patienten auf Infektion mit dem neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2.
161. Robert Koch-Institut (2022) Covid-19 Impfung bei Erwachsenen. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/Materialien/Faktenblaetter/COVID-19.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/Materialien/Faktenblaetter/COVID-19.pdf?__blob=publicationFile)
162. Robert Koch-Institut (2022) Wöchentlicher Lagebericht des RKI zur Coronavirus-Krankheit-2019 (Covid-19) 03.03.22. 42
163. Robert Koch-Institut Coronavirus SARS-CoV-2 - COVID-19-Fälle nach Meldewoche und Geschlecht sowie Anteile mit für COVID-19 relevanten Symptomen, Anteile Hospitalisierter/Verstorbener und Altersmittelwert/-median (19.02.22). URL: [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Daten/Klinische\\_Aspekte.html;jsessionid=79C37075C0768AA8BC4F2630F7DF6566.internet051?nn=13490888](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Daten/Klinische_Aspekte.html;jsessionid=79C37075C0768AA8BC4F2630F7DF6566.internet051?nn=13490888)
164. Rössler A, Riepler L, Bante D, Laer D von, Kimpel J (2022) SARS-CoV-2 Omicron Variant Neutralization in Serum from Vaccinated and Convalescent Persons. *N Engl J Med*
165. Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, Armanfard N, Sagan SM, Jahanshahi-Anbuhi S (2021) Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clin Microbiol Rev* 34:e00228-20
166. Sah P, Fitzpatrick MC, Zimmer CF, Abdollahi E, Juden-Kelly L, Moghadas SM, Singer BH, Galvani AP (2021) Asymptomatic SARS-CoV-2 infection: A systematic review and meta-analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:e2109229118
167. Sama IE, Ravera A, Santema BT, van Goor H, ter Maaten JM, Cleland JGF, Rienstra M, Friedrich AW, Samani NJ, Ng LL, Dickstein K, Lang CC, Filippatos G, Anker SD, Ponikowski P, Metra M, van Veldhuisen DJ, Voors AA (2020) Circulating plasma concentrations of angiotensin-converting enzyme 2 in men and women with heart failure and effects of renin-angiotensin-aldosterone inhibitors. *Eur Heart J* 41:1810–1817
168. Santarpia JL, Herrera VL, Rivera DN, Ratnesar-Shumate S, Reid SP, Ackerman DN, Denton PW, Martens JWS, Fang Y, Conoan N, Callahan MV, Lawler JV, Brett-Major DM, Lowe JJ (2021) The size and culturability of patient-generated SARS-CoV-2 aerosol. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 1–6
169. Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss H-P, Speth R, Walther T (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8258–8263
170. Sardu C, Gambardella J, Morelli MB, Wang X, Marfella R, Santulli G (2020) Hypertension, Thrombosis, Kidney Failure, and Diabetes: Is COVID-19 an Endothelial Disease? A Comprehensive Evaluation of Clinical and Basic Evidence. *J Clin Med* 9:1417

171. Schaible J, Meiler S, Poschenrieder F, Pregler B, Scharf G, Hamer OW (2020) CT-Morphologie der COVID-19-Pneumonie. *Radiol Up2date* 20:111–115
172. Schilling J, Tolksdorf K, Marquis A, Faber M, Pfoch T, Buda S, Haas W, Schuler E, Altmann D, Grote U, Diercke M, RKI COVID-19 Study Group (2021) Die verschiedenen Phasen der COVID-19-Pandemie in Deutschland: Eine deskriptive Analyse von Januar 2020 bis Februar 2021. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 64:1093–1106
173. Schilling J, Buda S, Tolksdorf K (2022) Zweite Aktualisierung der „Retrospektiven Phaseneinteilung der COVID-19- Pandemie in Deutschland“. *Epid Bull* 2022
174. Schmidt F, Muecksch F, Weisblum Y, Silva JD, Bednarski E, Cho A, Wang Z, Gaebler C, Caskey M, Nussenzweig MC, Hatzioannou T, Bieniasz PD (2021) Plasma neutralization properties of the SARS-CoV-2 Omicron variant. *MedRxiv Prepr Serv Health Sci* 2021.12.12.21267646
175. Schouten LR, van Kaam AH, Kohse F, Veltkamp F, Bos LD, de Beer FM, van Hooijdonk RT, Horn J, Straat M, Witteveen E, Glas GJ, Wieske L, van Vught LA, Wievel MA, Ingelse SA, Cortjens B, van Woensel JB, Bos AP, Walther T, Schultz MJ, Wösten-van Asperen RM (2019) Age-dependent differences in pulmonary host responses in ARDS: a prospective observational cohort study. *Ann Intensive Care* 9:55
176. Sheikh A, Al-Taher A, Al-Nazawi M, Al-Mubarak AI, Kandeel M (2020) Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *J Virol Methods* 277:113806
177. Shi H, Han X, Jiang N, Cao Y, Alwalid O, Gu J, Fan Y, Zheng C (2020) Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 20:425–434
178. Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, Ishiguro N, Takeuchi H, Nakatsu Y, Tahara M, Kikuta H, Yanagi Y (2008) Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol* 82:8942–8946
179. Siddiqi HK, Mehra MR (2020) COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. *J Heart Lung Transplant* 39:405–407
180. Soriano JB, Allan M, Alsokhn C (2021) A clinical case definition of post COVID-19 condition by a Delphi consensus, 6 October 2021.
181. Startin CM, D’Souza H, Ball G, Hamburg S, Hithersay R, Hughes KMO, Massand E, Karmiloff-Smith A, Thomas MSC, Strydom A (2020) Health comorbidities and cognitive abilities across the lifespan in Down syndrome. *J Neurodev Disord* 12:4
182. Stawicki SP, Jeanmonod R, Miller AC, Paladino L, Gaieski DF, Yaffee AQ, De Wulf A, Grover J, Papadimos TJ, Bloem C, Galwankar SC, Chauhan V, Firstenberg MS, Di Somma S, Jeanmonod D, Garg SM, Tucci V, Anderson HL, Fatimah L, Worlton TJ, Dubhashi SP, Glaze KS, Sinha S, Opara IN, Yellapu V, Kelkar D, El-Menyar A, Krishnan V, Venkataramanaiah S, Leyfman Y, Saoud Al Thani HA, Wb Nanayakkara P, Nanda S, Cioè-Peña E, Sardesai I, Chandra S, Munasinghe A, Dutta V, Dal Ponte ST, Izurieta R, Asensio JA, Garg M (2020) The 2019-2020 Novel Coronavirus (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) Pandemic: A Joint American College of Academic International Medicine-World Academic Council of Emergency Medicine Multidisciplinary COVID-19 Working Group Consensus Paper. *J Glob Infect Dis* 12:47–93

183. Sure F, Bertog M, Afonso S, Diakov A, Rinke R, Madej MG, Wittmann S, Gramberg T, Korbmayer C, Ilyaskin AV (2022) Transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) proteolytically activates the epithelial sodium channel (ENaC) by cleaving the channel's  $\gamma$ -subunit. *J Biol Chem* 298:102004
184. Swärd P, Edsfeldt A, Reepalu A, Jehpsson L, Rosengren BE, Karlsson MK (2020) Age and sex differences in soluble ACE2 may give insights for COVID-19. *Crit Care* 24:221
185. Sydbom A, Ware J, Mogard MH (1989) Stimulation of histamine release by the peptide kintensin. *Agents Actions* 27:68–71
186. Talic S, Shah S, Wild H, Gasevic D, Maharaj A, Ademi Z, Li X, Xu W, Mesa-Eguiagaray I, Rostron J, Theodoratou E, Zhang X, Motee A, Liew D, Ilic D (2021) Effectiveness of public health measures in reducing the incidence of covid-19, SARS-CoV-2 transmission, and covid-19 mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 375:e068302
187. Tamanna S, Clifton VL, Rae K, van Helden DF, Lumbers ER, Pringle KG (2020) Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) in Pregnancy: Preeclampsia and Small for Gestational Age. *Front Physiol* 11:590787
188. Tamura Y, Hirado M, Okamura K, Minato Y, Fujii S (1977) Synthetic inhibitors of trypsin, plasmin, kallikrein, thrombin, C1r-, and C1 esterase. *Biochim Biophys Acta* 484:417–422
189. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, Doolabh D, Pillay S, San EJ, Msomi N, Mlisana K, von Gottberg A, Walaza S, Allam M, Ismail A, Mohale T, Glass AJ, Engelbrecht S, Van Zyl G, Preiser W, Petruccione F, Sigal A, Hardie D, Marais G, Hsiao N-Y, Korsman S, Davies M-A, Tyers L, Mudau I, York D, Maslo C, Goedhals D, Abrahams S, Laguda-Akingba O, Alisoltani-Dehkordi A, Godzik A, Wibmer CK, Sewell BT, Lourenço J, Alcantara LCJ, Kosakovsky Pond SL, Weaver S, Martin D, Lessells RJ, Bhiman JN, Williamson C, de Oliveira T (2021) Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature* 592:438–443
190. Thompson HA, Mousa A, Dighe A, Fu H, Arnedo-Pena A, Barrett P, Bellido-Blasco J, Bi Q, Caputi A, Chaw L, De Maria L, Hoffmann M, Mahapure K, Ng K, Raghuram J, Singh G, Soman B, Soriano V, Valent F, Vimercati L, Wee LE, Wong J, Ghani AC, Ferguson NM (2021) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Setting-specific Transmission Rates: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 73:e754–e764
191. Tian Y, Rong L, Nian W, He Y (2020) Review article: gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. *Aliment Pharmacol Ther* 51:843–851
192. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ (2000) A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme: CLONING AND FUNCTIONAL EXPRESSION AS A CAPTOPRIL-INSENSITIVE CARBOXYPEPTIDASE \*. *J Biol Chem* 275:33238–33243
193. Tomita H, Ina Y, Sugiura Y, Sato S, Kawaguchi H, Morishita M, Yamamoto M, Ueda R (1997) Polymorphism in the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 156:255–259
194. Treskova-Schwarzbach M, Haas L, Reda S, Pilic A, Borodova A, Karimi K, Koch J, Nygren T, Scholz S, Schönfeld V, Vygen-Bonnet S, Wichmann O, Harder T (2021) Pre-existing health conditions and severe COVID-19 outcomes: an umbrella review approach and meta-analysis of global evidence. *BMC Med* 19:212

195. Ueffing M, Bayyoud T, Schindler M, Ziemssen F (2020) Grundlagen der Replikation und der Immunologie von SARS-CoV-2. *Ophthalmol* 1–6
196. Valdés G, Neves L a. A, Anton L, Corthorn J, Chacón C, Germain AM, Merrill DC, Ferrario CM, Sarao R, Penninger J, Brosnihan KB (2006) Distribution of angiotensin-(1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. *Placenta* 27:200–207
197. van Kampen JJA, van de Vijver DAMC, Fraaij PLA, Haagmans BL, Lamers MM, Okba N, van den Akker JPC, Endeman H, Gommers DAMPJ, Cornelissen JJ, Hoek RAS, van der Eerden MM, Hesselink DA, Metselaar HJ, Verbon A, de Steenwinkel JEM, Aron GI, van Gorp ECM, van Boheemen S, Voermans JC, Boucher CAB, Molenkamp R, Koopmans MPG, Geurtsvankessel C, van der Eijk AA (2021) Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat Commun* 12:267
198. Vardavas CI, Nikitara K (2020) COVID-19 and smoking: A systematic review of the evidence. *Tob Induc Dis* 18:20
199. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P (2002) Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-converting Enzyme-related Carboxypeptidase \*. *J Biol Chem* 277:14838–14843
200. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, Benachi A, De Luca D (2020) Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* 11:3572
201. Waize M, Scholz S, Wichmann O, Harder T, Treskova-Schwarzbach M, Falman A, Weidemann F, Karch A, Lange B, Kuhlmann A, Jäger V, Wieler LH (2021) Die Impfung gegen COVID-19 in Deutschland zeigt eine hohe Wirksamkeit gegen SARS-CoV-2-Infektionen, Krankheitslast und Sterbefälle.
202. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D (2020) Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181:281-292.e6
203. Wang W, Li C, Summer S, Falk S, Schrier RW (2010) Interaction between vasopressin and angiotensin II in vivo and in vitro: effect on aquaporins and urine concentration. *Am J Physiol - Ren Physiol* 299:F577–F584
204. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W (2020) Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* 323:1843–1844
205. Wang X, Zhou Y, Liu L, Ma J, Wu H, Zhao L, Chen W, Li SC, Ran Q, Li Z (2020) Coronavirus disease 2019 (COVID-19): diagnosis and prognosis. *Blood Genomics* 4:96–107
206. Weiss SR, Leibowitz JL (2011) Coronavirus Pathogenesis. *Adv Virus Res* 81:85–164
207. Wettstein L, Kirchhoff F, Münch J (2022) The Transmembrane Protease TMPRSS2 as a Therapeutic Target for COVID-19 Treatment. *Int J Mol Sci* 23:1351
208. Wilson S, Greer B, Hoopoe J, Zijlstra A, Walker B, Quigley J, Hawthorne S (2005) The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells. *Biochem J* 388:967–972

209. Wirtschaftswoche (2022) Corona-Lockdown: So ist der zweite Lockdown in Deutschland verlaufen. URL: <https://www.wiwo.de/politik/deutschland/corona-lockdown-so-ist-der-zweite-lockdown-in-deutschland-verlaufen/27076474.html>
210. Wissing SI, Obeid R, Rädle-Hurst T, Rohrer T, Herr C, Schöpe J, Geisel J, Bals R, Abdul-Khaliq H (2022) Concentrations of Soluble Angiotensin Converting Enzyme 2 (sACE2) in Children and Adults with and without COVID-19. *J Clin Med* 11:6799
211. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, Niemeyer D, Jones TC, Vollmar P, Rothe C, Hoelscher M, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Ehmann R, Zwirgmaier K, Drosten C, Wendtner C (2020) Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 581:465–469
212. World Health Organisation (2021) Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. URL: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)
213. World Health Organisation (2021) Listings of WHO’s response to COVID-19. URL: <https://www.who.int/news/item/29-06-2020-covidtimeline>
214. World Health Organisation Tracking SARS-CoV-2 variants. URL: <https://www.who.int/emergencies/emergency-health-kits/trauma-emergency-surgery-kit-who-tesk-2019/tracking-SARS-CoV-2-variants>
215. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, Wu Y, Zhang L, Yu Z, Fang M, Yu T, Wang Y, Pan S, Zou X, Yuan S, Shang Y (2020) Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med* 8:475–481
216. Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Battle D (2006) Glomerular localization and expression of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol JASN* 17:3067–3075
217. Yeung ML, Teng JLL, Jia L, Zhang C, Huang C, Cai J-P, Zhou R, Chan K-H, Zhao H, Zhu L, Siu K-L, Fung S-Y, Yung S, Chan TM, To KK-W, Chan JF-W, Cai Z, Lau SKP, Chen Z, Jin D-Y, Woo PCY, Yuen K-Y (2021) Soluble ACE2-mediated cell entry of SARS-CoV-2 via interaction with proteins related to the renin-angiotensin system. *Cell* 184:2212-2228.e12
218. Zahradník J, Marciano S, Shemesh M, Zoler E, Harari D, Chiaravalli J, Meyer B, Rudich Y, Li C, Marton I, Dym O, Elad N, Lewis MG, Andersen H, Gagne M, Seder RA, Douek DC, Schreiber G (2021) SARS-CoV-2 variant prediction and antiviral drug design are enabled by RBD in vitro evolution. *Nat Microbiol* 6:1188–1198
219. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM (2012) Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 367:1814–1820
220. Zhang Q, Cong M, Wang N, Li X, Zhang H, Zhang K, Jin M, Wu N, Qiu C, Li J (2018) Association of angiotensin-converting enzyme 2 gene polymorphism and enzymatic activity with essential hypertension in different gender: A case–control study. *Medicine (Baltimore)* 97:e12917
221. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, Guan L, Wei Y, Li H, Wu X, Xu J, Tu S, Zhang Y, Chen H, Cao B (2020) Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet Lond Engl* 395:1054–1062

222. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si H-R, Zhu Y, Li B, Huang C-L, Chen H-D, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang R-D, Liu M-Q, Chen Y, Shen X-R, Wang X, Zheng X-S, Zhao K, Chen Q-J, Deng F, Liu L-L, Yan B, Zhan F-X, Wang Y-Y, Xiao G-F, Shi Z-L (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579:270–273
223. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382:727–733
224. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, Cao Y, Yousif AS, Bals J, Hauser BM, Feldman J, Muus C, Wadsworth MH, Kazer SW, Hughes TK, Doran B, Gatter GJ, Vukovic M, Taliaferro F, Mead BE, Guo Z, Wang JP, Gras D, Plaisant M, Ansari M, Angelidis I, Adler H, Sucre JMS, Taylor CJ, Lin B, Waghay A, Mitsialis V, Dwyer DF, Buchheit KM, Boyce JA, Barrett NA, Laidlaw TM, Carroll SL, Colonna L, Tkachev V, Peterson CW, Yu A, Zheng HB, Gideon HP, Winchell CG, Lin PL, Bingle CD, Snapper SB, Kropski JA, Theis FJ, Schiller HB, Zaragosi L-E, Barbry P, Leslie A, Kiem H-P, Flynn JL, Fortune SM, Berger B, Finberg RW, Kean LS, Garber M, Schmidt AG, Lingwood D, Shalek AK, Ordovas-Montanes J (2020) SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell* 181:1016-1035.e19
225. Zisman LS, Keller RS, Weaver B, Lin Q, Speth R, Bristow MR, Canver CC (2003) Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation* 108:1707–1712
226. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z (2020) Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med* 14:185–192
227. Zoufaly A, Poglitsch M, Aberle JH, Hoepfer W, Seitz T, Traugott M, Grieb A, Pawelka E, Laferl H, Wenisch C, Neuhold S, Haider D, Stiasny K, Bergthaler A, Puchhammer-Stoeckl E, Mirazimi A, Montserrat N, Zhang H, Slutsky AS, Penninger JM (2020) Human recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19. *Lancet Respir Med* 8:1154–1158

## 9 Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Publikationen:

Concentrations of Soluble Angiotensin Converting Enzyme 2 (sACE2) in Children and Adults with and without COVID-19

**Wissing SI**, Obeid R, Rädle-Hurst T, Rohrer T, Herr C, Schöpe J, Geisel J, Bals R, Abdul-Khaliq H (2022) Journal of Clinical Medicine 11, no. 22: 6799. <https://doi.org/10.3390/jcm11226799>

Determinants of soluble angiotensin-converting enzyme 2 concentrations in adult patients with complex congenital heart disease

Raedle-Hurst T, **Wissing SI**, Mackenstein N, Obeid R, Geisel J, Wagenpfeil S, Abdul-Khaliq H (2020). Clinical Research in Cardiology 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00392-020-01782-y>

## **10 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Hashim Abdul-Khaliq für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Prof. Rima Obeid und allen beteiligten Mitarbeiter\*innen des Zentrallabors möchte ich danken, dass sie mir bei der Sammlung der Proben und der Umsetzung der Experimente hilfreich zur Seite standen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Tanja Rädle-Hurst, Herrn Prof. Tilman Rohrer, Herrn Dr. Christian Herr und Herrn Prof. Robert Bals für das Bereitstellen von Proben bedanken.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Jakob Schöpe für die statistische Beratung.

Besonders danken möchte ich meinen Freund\*innen und meiner Familie für die ständige emotionale Unterstützung, Motivation und Ermutigung während des Verfassens der Doktorarbeit und darüber hinaus.

## **11 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.