Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Andreas Liebold
Leiter des Forschungslabors: PD. Dr. rer. nat. Markus Hoenicka

Entwicklung eines biologischen Funktionsnachweises für Angiotensin-(1-7)-haltige Präparate

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Amelie Lena Bogenschütz
Hechingen

2026

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter/ Berichterstatterin: PD. Dr. rer. nat. Markus Hoenicka

2. Berichterstatter/ Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Eberhard Barth

Tag der Promotion: 24.09.2026

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis V

1. Einleitung 1

1.1 Pathophysiologie von SARS-CoV-2 1

1.1.1 Eintrittspforte und Wege im Körper 2

1.1.2 Klinik von SARS-CoV-2 3

1.2 Renin-Angiotensin-System (RAS) 4

1.2.1 Gegenteilige Wirkungen des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) 5

1.2.2 Ungleichgewicht im Angiotensin-konvertierenden Enzym (ACE)- und ACE2-System 7

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit 8

1.3.1 Hintergrund: *STAMINA-Cov19* Projekt 8

1.3.2 Anforderungen an das Testsystem zur Funktionsprüfung der biologischen Aktivität von Angiotensin (AT) 1-7 9

1.3.3 Funktionsprinzipien der zwei Testsysteme 10

2. Material und Methoden 12

2.1 Stammlösungen der Peptide 12

2.1.1 Materialien und Geräte 12

2.2 Enzymbasierter Assay: *Hemmung der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 durch Angiotensine* 13

2.2.1 Assay-Prinzip 13

2.2.2 Materialien und Geräte 14

2.2.3 Lösungen 15

2.2.4 Protokoll: *Hemmung der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 durch Angiotensine* 17

2.2.5 Versuchsaufbau 19

2.2.6 Statistische Methoden 22

2.3 Zellkultur 23

2.3.1 Materialien und Geräte 23

2.3.2 Medien und Lösungen 25
2.3.3 Steriles Arbeiten 26
2.3.4 Inkubation der Zellkulturen 27
2.3.5 Kultivierung von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) 28
2.3.6 Zellzahlbestimmung 29
2.3.7 Zellernte und Zellsubkultivierung 30
2.3.8 Kryokonservierung von Zellkulturen 32
2.4 Zellbasierter Assay: *Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode* 33
2.4.1 Assay-Prinzip 33
2.4.2 Materialien und Geräte 36
2.4.3 Medien und Lösungen 38
2.4.3.1 Griess-Reagenzien 38
2.4.3.2 Stimulationssubstanzen 40
2.4.3.3 Krebs-Henseleit (KH)-Arbeitslösung 40
2.4.3.4 Verwendung des Stickstoffmonoxid-Donors DEA NONOate als Positivkontrolle und Stimulationssubstanz 42
2.4.4 Generierung von Zellkulturüberständen 42
2.4.5 Protokoll: *Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode* 44
2.4.6 Statistische Methoden 46
2.5 Ethikvotum 46
3. Ergebnisse 47
3.1 Enzymbasierter Assay: *Hemmung der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 durch Angiotensine* 47
3.1.1 Modifikation der Vorschrift von R&D Systems zur Messung der Enzymaktivität 47
3.1.2 Vergleich der inhibitorischen Wirkung der Angiotensine auf die Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 48
3.1.3 Multivariable Analyse des Einflusses der Angiotensine auf die Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 50

3.1.4 Relative Enzymaktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 als Maß für die Stärke der inhibitorischen Wirkung der Angiotensine 53
3.1.5 Mittlere inhibitorische Wirkung der Angiotensine in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration 56
3.2 Zellbasierter Assay: *Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode* 59
3.2.1 Prozess der Methodenentwicklung 59
3.2.2 Evaluation der Griess-Methode mittels der Natriumnitrat-Standardreihe 59
3.2.3 Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien ohne und nach Stimulation der Zellkulturen mit Acetylcholin (ACh), Carbachol und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) 61
3.2.4 Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in gelösten Proben des Stickstoffmonoxid (NO)-Donors DEA NONOate 63
3.2.5 Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien nach der Präinkubation der Zellkulturen mit Krebs-Henseleit (KH)-Arbeitslösung 65
3.2.6 Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien nach Behandlung der Zellkulturen mit dem Stickstoffmonoxid (NO)-Donor DEA NONOate 66
4. Diskussion 70
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse 70
4.2 Enzymbasierter Assay: *Hemmung der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 durch Angiotensine* 71
4.2.1 Unterschiede in der inhibitorischen Wirkung der Angiotensine auf die Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) und ACE2 71
4.2.2 Gegenüberstellung der Angiotensin (AT) 1-7- und AT 1-6-vermittelten Effekte .72
4.2.3 Gegenüberstellung der Angiotensin (AT) 1-7- und AT 2-7-vermittelten Effekte .74
4.2.4 Enzymbasierter Assay als Testsystem für den Funktionsnachweis vernebelter Angiotensin-Lösungen 75
4.2.5 Methodenkritik 77
4.3 Zellbasierter Assay: *Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode* 79

4.3.1 Verwendung der Griess-Methode zur Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in Zellkulturüberständen 79
4.3.2 Einfluss des Zellkulturmediums auf die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration mittels Griess-Methode 82
4.3.3 Einfluss des Zellkulturmediums auf die Kultivierung von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) 84
4.3.4 Methodenkritik 86
4.4 Vergleich der beiden Testsysteme: Enzymbasiertes vs. Zellbasiertes Testsystem 88
4.5 Ausblick 90
5. Zusammenfassung 92
6. Literaturverzeichnis 94
7. Anhang 107
7.1 Paarweise vergleichende Analyse der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 von Peptid-Kombinationen in Abhängigkeit von der Substrat- und Peptid-Konzentration 107
7.2 Rohdaten der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 mit und ohne Zusatz von Angiotensinen 110
8. Danksagung 112
9. Lebenslauf 114

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym; *(engl.: angiotensin-converting enzyme)*
ACh	Acetylcholin
ARDS	akutes Atemnotsyndrom; *(engl.: Acute Respiratory Distress Syndrome)*
AT	Angiotensin
AT1R	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1
AT2R	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 2
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019; *(engl.: coronavirus disease 2019)*
CT	Computertomographie
DEA NONOate	Diethylammonium (Z)-1-(N,N-diethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium; *(engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium)*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung; *(engl.: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)*
EC	Endothelzelle; *(engl: endothelial cell)*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Einfriermedium
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; *(engl.: endothelial Nitric Oxide Synthase)*
FIA	Fließinjektionsanalyse
FKS	fetales Kälberserum
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure

HUVEC	humane Umbilikalvenen-Endothelzellen; *(engl.: human umbilical vein endothelial cells)*
IC_{50}	mittlere inhibitorische Konzentration; *(engl.: half maximal inhibitory concentration)*
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; *(engl.: inducible Nitric Oxide Synthase)*
KH	Krebs-Henseleit
MW	Mittelwert
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NED	*N*-(1-Naphthyl)ethylendiamin-dihydrochlorid
NK	Negativkontrolle
RAS	Renin-Angiotensin-System
rh	rekombinantes humanes
RKI	Robert Koch-Institut
RT	Raumtemperatur
SARS	Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom; *(engl.: Severe Acute Respiratory Syndrome)*
SARS-CoV	Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus; *(engl.: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus)*
SARS-CoV-2	Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus 2; *(engl.: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)*
SD	Standardabweichung
S-Protein	Spike-Protein
STD	Standard
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WHO	Weltgesundheitsorganisation; *(engl.: World Health Organization)*

1. Einleitung

„We have therefore made the assessment that COVID-19 can be characterized as a pandemic." [129] (COVID-19 = Coronavirus-Krankheit-2019).

Diese Worte stammten von dem Generaldirektor der Weltgesundheitsorganisation (WHO) Tedros Adhanom Ghebreyesus vom 11. März 2020 [129]. Der Ausbruch und die weltweite Ausbreitung des Schweren Akuten Respiratorischen Syndroms Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) stellte die Welt in den darauffolgenden Jahren vor enorme wirtschaftliche und soziale Herausforderungen [39, 116]. Neben den ökonomischen Auswirkungen trat auch die Forschung rund um das Virus SARS-CoV-2 mit möglichen Therapieoptionen und Präventionsmaßnahmen in den Vordergrund [7, 20, 120].

Ein möglicher neuer Therapieansatz zur Behandlung einer SARS-CoV-2 Erkrankung stützte sich auf das Peptid Angiotensin (AT) 1-7 und das Renin-Angiotensin-System (RAS), welches durch die Corona-Pandemie neue Aufmerksamkeit erlangte [112]. Diese Dissertation beschäftigte sich mit der Funktionsprüfung eines möglichen neuen Medikaments mit AT 1-7 als zugrunde liegenden Inhaltsstoff. In den nachfolgenden Kapiteln wird SARS-CoV-2 und die damit verbundene Pathophysiologie in Zusammenhang mit dem RAS näher beleuchtet, um die Rolle von AT 1-7 und die Zielsetzung dieser Arbeit besser zu verstehen.

1.1 Pathophysiologie von SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 ist ein Virus aus der Untergattung des Sarbecovirus innerhalb der Gattung der Betacoronaviren [74]. Der Ausbruch des neuartigen Coronavirus nahm seinen Beginn Ende 2019 in der Region Wuhan in China, ausgehend von dem Huanan-Fischmarkt [53, 130]. SARS-CoV-2 weist eine Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz von 79% mit dem zuvor entdeckten Schweren Akuten Respiratorischen Syndrom Coronavirus (SARS-CoV) auf [74, 100]. SARS-CoV verursachte bereits 2003 den Ausbruch des Schweren Akuten Respiratorischen Syndroms (SARS) [25]. Eine noch größere Genom-Sequenzidentität weist SARS-CoV-2 mit einem Coronavirus der Fledermaus auf (BatCoV RaTG13) [143]. Die durch Coronaviren ausgelöste Atemwegserkrankung SARS erlangte aufgrund ihrer weltweiten Ausbreitung und der hohen Anzahl an Todesfällen große Bedeutung [131].

1.1.1 Eintrittspforte und Wege im Körper

Die exakte Dimension der Ausbreitungswege von SARS-CoV-2 ist noch nicht ausreichend erforscht [84, 126]. Es stehen mehrere Übertragungswege im Fokus, wie die Übertragung durch Tröpfchen/Aerosole, Infektionsträger (z.B. Schmierinfektionen) und der direkte Weg von Mensch zu Mensch [6]. Der Übertragungsweg von SARS-CoV über die Luft konnte experimentell modelliert werden und gilt als wahrscheinlicher Ausbreitungsweg [138]. Da die Viruspartikel von SARS-CoV-2 und SARS-CoV in Aerosolen und auf bestimmten Oberflächen überlebensfähig bleiben, scheint der Übertragungsweg über Aerosole und Fomite auch für SARS-CoV-2 wahrscheinlich [24]. Das Robert Koch-Institut (RKI) gibt die respiratorische Aufnahme von SARS-CoV-2-haltigen Partikeln als den Hauptübertragungsweg von COVID-19 an [102].

Die Bindung von SARS-CoV-2 erfolgt an das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) 2, welches die Eintrittspforte des Virus in den Körper darstellt [52]. Die Bindung von SARS-CoV-2 an ACE2 erfolgt über die Untereinheit S1 im Spike-Protein (S-Protein). Für den Eintritt in die Wirtszelle ist ein Priming des S-Proteins notwendig, wofür SARS-CoV-2 eine Serinprotease (TMPRSS2) verwendet [52]. Das Bindungsmuster von SARS-CoV-2 weist Ähnlichkeiten mit seinem Vorgänger SARS-CoV auf, welcher ebenfalls über die S1-Domäne des S-Proteins an ACE2 bindet [71].

Die Verteilung der Expression von ACE2 im Körper spielt eine große Rolle, da den Coronaviren dadurch vermutlich mehrere Eintrittswege im Körper zur Verfügung stehen [47]. So ist die Expression von ACE2 in mehreren Organen vertreten, darunter auf den alveolaren Epithelzellen Typ I und II der Lunge [47]. Weitere Organe wie Leber, Niere, Knochenmark und Milz exprimieren ebenfalls ACE2 auf ihrer Oberfläche [47]. Die Expression von ACE2 konnte auch in Enterozyten des Dünndarms nachgewiesen werden, wodurch gastroenterologische Symptome nach einer SARS-CoV-2 Infektion mutmaßlich erklärt werden können [139]. Darüber hinaus konnte in einer Studie nachgewiesen werden, das die intranasale und die intragastrische Infektion mit SARS-CoV-2 zu pathologischen Veränderungen sowohl im Lungengewebe als auch im Verdauungstrakt führen [57].

1.1.2 Klinik von SARS-CoV-2

Das initiale Erscheinungsbild einer SARS-CoV-2 Infektion äußert sich in den häufigen Symptomen Fieber, Husten, Myalgie und Fatigue [17, 26, 53, 100, 127]. Des Weiteren kommt es zum Auftreten von Dyspnoe [26, 100, 127], welche sich nach einer mittleren Zeit von 5 Tagen nach Auftreten des ersten Symptoms zeigt [127]. Früh einsetzende Kurzatmigkeit kann dabei ein Hinweis auf eine Exazerbation einer COVID-19 Infektion darstellen [26]. Auch konnte gezeigt werden, dass bei schweren Verläufen einer SARS-CoV-2 Infektion Dyspnoe häufiger zu beobachten ist [17].

Huang et al. beschrieben 2020 Patienten aus Wuhan mit nachgewiesenen SARS-CoV-2 Infektionen, die allesamt eine Pneumonie mit pathologischen Computertomographie (CT)-Befunden aufzeigten [53]. Die Lungenveränderungen nach einer SARS-CoV-2 Infektion sind bildmorphologisch nachweisbar und durchlaufen eine Veränderung im Verlauf der Erkrankung [67, 87]. Im CT zeigen sich bilaterale Milchglasverschattungen bzw. Flecken in der Lunge infizierter Patienten [67, 127]. Bildmorphologische Veränderungen im Bereich der Lunge sind auch kennzeichnend für eine SARS-CoV-Infektion, da hier ebenfalls Lungeninfiltrate im Verlauf der Infektion nachgewiesen werden konnten [142]. Die Veränderungen der Lunge reichen bis zur Fibrose und enden in einigen Fällen tödlich in einem akuten Atemnotsyndrom (ARDS) [49, 142].

Im Rahmen einer SARS-CoV-2 Infektion kann es neben Veränderungen der Lunge bzw. ARDS zu zahlreichen Komplikationen kommen, darunter kardiale Komplikationen (wie erhöhte herzspezifische Biomarker (z.B. Troponin), pathologische Befunde in der Echokardiographie/Elektrokardiographie oder Arrhythmien), Sekundärinfektionen und Schock [26, 53, 127]. Bei einigen Patienten ist eine Verlegung auf die Intensivstation mit Atemunterstützung bis hin zur maschinellen Beatmung notwendig [53, 127]. Eine weitere Komplikation stellt ein anhaltender Verlauf bzw. das Neuauftreten von Symptomen drei Monate nach Beginn der Erstinfektion dar, bekannt als Post-COVID-19 Erkrankung [132]. Dabei halten einige Symptome Monate nach einer Infektion an, darunter besonders häufig sensomotorische und kognitive Einschränkungen und anhaltende Müdigkeit [125]. Dies führt zu Einschränkungen in der Aktivität des alltäglichen Lebens und machte sich auch in einer geringeren Rate an Erwerbstätigen bzw. Studierenden bemerkbar [125]. Die COVID-

19 Todesfälle („gestorben an“ und „gestorben mit“) beliefen sich in den ersten drei Pandemiejahren 2020 bis 2022 auf etwa 161.500 Menschen [103]. Als häufige Todesursachen werden respiratorisches Versagen, multiples Organversagen oder septischer Schock aufgeführt [26].

Einhergehend mit den körperlichen Schädigungen konnten auch Veränderungen im Blutbild von infizierten Patienten beobachtet werden [21, 53]. So kann eine SARS-CoV-2 Infektion zu einer Hyperinflammation mit erhöhter Zytokin-Produktion führen [21, 53]. Dabei konnte unter anderem eine Erhöhung der Zytokine Interleukin (IL)-6, IL-10 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) festgestellt werden [21]. Ein Unterschied in den Zytokin-Plasmaspiegeln zeigte sich auch bei einem Vergleich von infizierten Patienten mit und ohne Intensivbehandlung [53]. Hierbei konnten höhere Zytokin-Parameter bei Patienten beobachtet werden, welche auf der Intensivstation behandelten wurden [53]. Des Weiteren kann der Laborparameter für T-Lymphozyten bei SARS-CoV-2-infizierten Patienten erniedrigt sein [17, 21], insbesondere bei Intensivpatienten bzw. bei Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf einer COVID-19 Erkrankung [21]. Generell zeigte sich die Anzahl von Lymphozyten bei infizierten Patienten erniedrigt [100, 127]. Auch konnte bei einem Großteil von tödlich verlaufenden Fällen eine verminderte Zahl an Eosinophilen beobachtet werden [26].

1.2 Renin-Angiotensin-System (RAS)

Am Ende des 19. Jahrhundert veröffentlichten Tigerstedt und Bergman die Entdeckung des Enzyms Renin [4], welches als Teil des RAS eine Rolle in der Volumenhomöostase und Blutdruckregulation spielt [91, 110]. Die einzelnen Komponenten des RAS bilden ein komplexes Zusammenspiel, wobei am Ende dieser Kaskade AT 1-7 synthetisiert wird (s. Abbildung 1) [112]. Das Enzym ACE2 ist ein Homolog von ACE und fungiert als Carboxypeptidase [23]. Es hydrolysiert AT I zu dem Peptid AT 1-9 [23] und AT II zu dem Heptapeptid AT 1-7 [101]. Dabei spaltet ACE2 jeweils eine Aminosäure am Carboxy-terminalen Ende der Substrate ab, welche im Falle von AT I die Aminosäure Leucin und für AT II die Aminosäure Phenylalanin darstellt [124]. Über AT 1-9 entsteht in einem weiteren Abbauschritt ebenfalls AT 1-7 [23]. Dieser Schritt verläuft ACE-vermittelt, scheint aber wohl

nicht davon abhängig zu sein [23]. Die vollständige Aminosäuresequenz für AT 1-7 lautet: Asparaginsäure-Arginin-Valin-Tyrosin-Isoleucin-Histidin-Prolin [124].

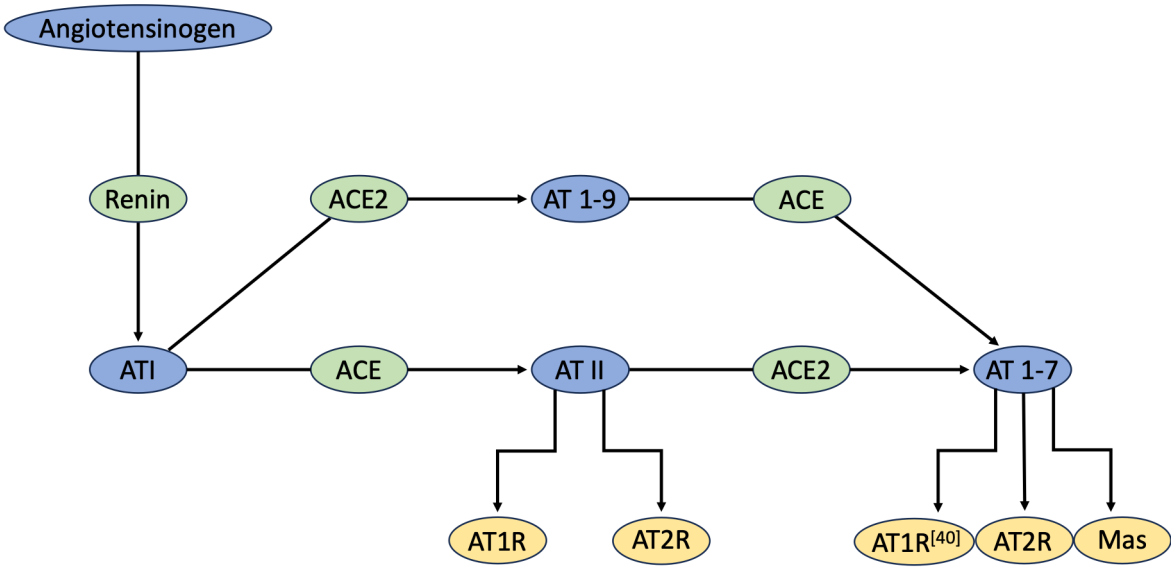


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der verschiedenen Wege des RAS basierend auf einer Übersichtsarbeit von Sriram und Insel [112].

Die beteiligten Enzyme (grün hinterlegte Felder) katalysieren die Reaktionen in Pfeilrichtung, an deren Ende die Peptide (blau hinterlegte Felder) entstehen. Die Peptide binden an spezifische Rezeptoren (gelb hinterlegte Felder). Die Abbildung wurde eigenhändig mit PowerPoint erstellt.

(ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym; AT = Angiotensin; AT1R = Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1; AT2R = Angiotensin II Rezeptor Subtyp 2; RAS = Renin-Angiotensin-System)

1.2.1 Gegenteilige Wirkungen des Renin-Angiotensin-Systems (RAS)

Mit der Aktivierung des RAS werden eine Reihe von pathophysiologischen Prozessen in Gang gesetzt, wobei AT II und AT 1-7 gegenteilige Effekte zugeschrieben werden [40, 112].

Die Effekte von Angiotensin (AT) II

AT II vermittelt seine Effekte über die beiden Rezeptoren Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1 (AT1R) und Angiotensin II Rezeptor Subtyp 2 (AT2R) [107]. Mit der Bindung von AT II an AT1R wird eine Aktivierung des Guaninnukleotid-bindenden Proteins (G-Protein) ausgelöst, welche nachfolgend eine Kaskade weiterer Signalwege in Gang setzt [118].

AT II besitzt vasokonstriktorische Eigenschaften und führt über eine Verengung der glatten Muskulatur von Gefäßen zu einer Steigerung des Blutdrucks [110]. Auch zeigt AT II proliferative Eigenschaften und stimuliert das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen [37]. Neben den Auswirkungen auf den Blutdruck konnte für AT II eine arrhythmogene Wirkung gezeigt werden [31]. Des Weiteren induziert AT II die Apoptose in Lungenalveolarzellen über Bindung an AT1R [88]. Weitere über die AT II/AT1R-Achse-induzierten Effekte sind Inflammation, profibrotische Signalübertragung und Gewebeumbau [112]. Diese pathomechanistischen Veränderungen können zu Bluthochdruck, kardiovaskulären Veränderungen und Endorganschäden führen [35]. Die Hochregulation der AT II/AT1R-Achse konnte darüber hinaus als Ursache für das induzierte schwere Lungenversagen bei einer SARS-CoV-Infektion ausgemacht werden [64].

Im Gegensatz dazu führt die Bindung von AT II an AT2R zu einer antipressorischen Wirkung, welche über einen negativ-chronotropen Mechanismus am Herzen vermittelt wird [78]. Darüber hinaus zeigten Yayama et al., dass die Bindung von AT II an AT2R zu einer Phosphorylierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und Erhöhung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) führt [137]. Konträr zu den AT1R-vermittelten Effekten zeigt die Bindung an AT2R die vasodilatatorische Wirkung von AT II auf [22].

Die Effekte von Angiotensin (AT) 1-7

Um die Relevanz von AT 1-7 bei einer COVID-19 Erkrankung zu unterstreichen, kommt der Zusammentragung der Erkenntnisse über das Peptid eine große Bedeutung zu. AT 1-7 bindet ebenfalls an AT1R, jedoch wirkt AT 1-7 in diesem Kontext als kompetitiver Antagonist und blockiert die AT II/AT1R-Achse [40]. Es konnte gezeigt werden, dass AT 1-7 seine Effekte über die Aktivierung und Rekrutierung von β-Arrestin Proteinen vermittelt und nicht über den G-Protein gekoppelten Weg [40, 118]. Ein weiterer Signalweg stellt die direkte Interaktion zwischen AT 1-7 und dem Mas-Rezeptor dar, welcher als funktioneller Rezeptor identifiziert werden konnte [106]. Die AT 1-7/Mas-Achse unterliegt dabei einer Spezifität, welche nicht durch AT1R/AT2R-Antagonisten aufgehoben werden kann [106]. Die Aktivierung der AT 1-7/Mas-Achse resultiert unter Anderem in einer Erhöhung der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese durch eNOS [105].

Die gegenteiligen Effekte von AT II und AT 1-7 lassen sich anhand der Wachstumsregulation von glatten Muskelzellen aufzeigen, wobei AT 1-7 antiproliferative Eigenschaften zugeordnet werden [37]. Der antiproliferative Effekt von AT 1-7 konnte auf ein in vivo-Modellsystem erweitert werden [113]. Des Weiteren weist AT 1-7 einen antithrombotischen Effekt auf, welcher anhand einer Reduktion des Thrombusgewichts und der verminderten Bindung von Blutplättchen an fibrilläres Kollagen ersichtlich wird [65, 66]. Eine weitere Entdeckung ist die antiarrhythmogene Wirkung von AT 1-7, welche der oben beschriebenen arrhythmogenen Wirkung von AT II gegenübersteht [31]. AT 1-7 werden zudem kardioprotektive Eigenschaften zugeschrieben, welche sich in einer Abschwächung der Herzhypertrophie mit einer Verringerung von Herzgewicht und ventrikulärer Wanddicke äußern [118].
Zusammenfassend geben die aufgeführten Arbeiten einen Einblick in die antiarrhythmogene, antiapoptotische, antithrombotische und kardioprotektive Wirkung von AT 1-7 [31, 37, 65, 66, 118].

1.2.2 Ungleichgewicht im Angiotensin-konvertierenden Enzym (ACE)- und ACE2-System

Bereits vor der COVID-19 Pandemie wurde auf eine mögliche schützende Rolle durch die Hochregulation der ACE2/AT 1-7-Achse verwiesen, welche die Endothelzelldysfunktion über eine Blockade der ACE/AT II/AT1R-Achse mindert [141]. Frühere Arbeiten zeigten zudem, dass eine Infektion mit Coronaviren zu einer verminderten Expression und Aktivität von ACE2 führt [43]. Die Bindung von SARS-CoV 2 an die Zelloberfläche initiiert die Endozytose von ACE2 mit dem nachfolgenden Abbau des Proteins [75]. Darüber hinaus kommt es auf molekularer Ebene zu einer verminderten Genexpression von ACE2 [115]. Einer Hypothese nach Sriram und Insel stellt das gestörte Gleichgewicht des ACE/ACE2-Systems die Grundlage der pathophysiologischen Veränderungen einer SARS-CoV-2 Infektion dar [112]. Demnach resultiert aus der Reduktion der Expression von ACE2 eine gesteigerte Aktivität der ACE/AT II/AT1R-Achse, welche für die schädlichen Effekte des Virus verantwortlich gemacht werden [112]. Dem gegenüber stellt die ACE2/AT 1-7/Mas-Achse den krankheitseindämmenden Weg dar. Die mögliche protektive Wirkung von AT 1-7 verdeutlicht die Relevanz der vorliegenden Dissertation im Hinblick auf die weitere Forschung von COVID-19.

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

1.3.1 Hintergrund: *STAMINA-Cov19* Projekt

Diese Dissertation entstand im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projekts *STAMINA-Cov19.* In diesem Projekt wurde die Wirksamkeit einer inhalierbaren AT 1-7-Lösung bei SARS-CoV-2-infizierten Patienten untersucht [12]. Der Vorteil einer inhalativen Therapie mit AT 1-7 sollte in der Applikation einer höheren Konzentration des Wirkstoffs am Zielorgan liegen. Das Projekt *STAMINA-Cov19* legte den Hauptfokus auf die Untersuchung der Wirksamkeit von AT 1-7 bei einer mittelschweren COVID-19 Erkrankung. Die Fragestellung des Projekts lautete, ob die inhalative Verabreichung einer AT 1-7-Lösung als Therapiemöglichkeit bei infizierten Patienten angewendet werden kann, um schwere Lungenschäden zu vermeiden.

Die Therapie der AT 1-7-Inhalation benötigte ein entsprechendes Präparat in vernebelter Form, welches in einem Teilprojekt entwickelt wurde [12]. Durch den Prozess der Vernebelung und Inhalation konnten mechanische Schäden an einem AT 1-7-Präparat nicht ausgeschlossen werden. Eine Garantie, dass AT 1-7 den Wirkort in seiner vollständigen Peptidform erreicht, war somit nicht gegeben. Aus diesem Grund kam der Entwicklung eines Testsystems für den Nachweis der biologischen Aktivität von AT 1-7 eine große Bedeutung zu. Dieses Testsystem sollte die folgenden drei Aspekte erfüllen:

1. Sicherstellung der Integrität einer AT 1-7 Formulierung vor und nach dem Prozess der Vernebelung.
2. Aufzeigen der biologischen Wirkung von AT 1-7 auch in Anwesenheit von notwendigen pharmazeutischen Hilfsstoffen in der vernebelten Formulierung.
3. Vergleich der biologischen Aktivitäten von AT 1-7 und seinen potenziellen Peptidfragmenten, welche durch den Prozess der Vernebelung entstehen könnten.

Zu Beginn dieser Dissertation war ein solches Testsystem zur biologischen Funktionsprüfung von AT 1-7 nicht beschrieben. Die vorliegende Arbeit stellt aus diesem Grund einen weiteren Schritt rund um die Forschung der Wirksamkeit von AT 1-7 bei einer COVID-19 Erkrankung dar.

1.3.2 Anforderungen an das Testsystem zur Funktionsprüfung der biologischen Aktivität von Angiotensin (AT) 1-7

Das Hauptziel der vorliegenden Dissertation stellte die Entwicklung eines geeigneten Testsystems zur biologischen Funktionsprüfung von AT 1-7 in Abgrenzung zu potenziellen Peptidfragmenten dar. In einem nachfolgenden Schritt sollte das Testsystem zur Funktionsprüfung einer vernebelten AT 1-7-Formulierung dienen. Dabei musste das Testsystem neben den oben genannten Aspekten bestimmte Anforderungen erfüllen, welche im Folgenden dargestellt sind.

Das AT 1-7-Testsystem sollte hinsichtlich seiner Durchführung einer einfachen Handhabung unterliegen, um eine universelle Anwendbarkeit in Standardlaboren zu ermöglichen. Des Weiteren mussten auch ökonomische Aspekte berücksichtigt werden, welche unter dem Gesichtspunkt eines effizienten Kosten-Nutzen-Verhältnisses stehen. Das Testsystem sollte zudem die grundlegenden Anforderungen an einen chemischen bzw. biologischen Assay erfüllen, wozu die stabile Reproduzierbarkeit und geringe Fehleranfälligkeit zählen. Das wichtigste Anforderungskriterium war eine ausreichend hohe Spezifität des Testsystems, mit welcher die biologische Aktivität von AT 1-7 von der biologischen Aktivität potenzieller Peptidfragmente differenziert werden kann.

Die Entwicklung eines AT 1-7-Testsystems unter Berücksichtigung der eben aufgeführten Anforderungen erlaubte mehrere Ansätze. Diese Dissertation beschäftigte sich mit der Entwicklung von zwei unterschiedlichen Assay-Methoden. Der erste Assay beruht auf einem enzymbasierten Funktionsprinzip, wohingegen dem zweiten Testsystem ein zellbasiertes Verfahren zugrunde liegt. Im Prozess der Methodenentwicklung wurde ursprünglich die parallele Entwicklung von drei Testsystemen angestrebt. Schlussendlich werden in der folgenden Dissertation jedoch nur die nachfolgenden zwei Methoden vorgestellt, da aufgrund des eingeschränkten zeitlichen Rahmens die Realisation eines funktionierenden Testsystems im Vordergrund stand. Die angesprochene dritte Methode stellt am Ende der Diskussion einen Ausblick dieser Arbeit dar.

1.3.3 Funktionsprinzipien der zwei Testsysteme

Enzymbasierter Assay: ***Hemmung der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 durch Angiotensine***

Das Assay-Prinzip des enzymbasierten Testsystems basiert auf den Grundlagen der Enzymkinetik. Nach diesen führen steigende Konzentrationen eines Produkts zu einer Verlangsamung seiner Umsetzung über die Hemmung des katalysierenden Enzyms. Da das Enzym ACE2 das Peptid AT II zu AT 1-7 hydrolysiert [101], führen nach den Regeln der Enzymkinetik steigende Konzentrationen von AT 1-7 zu einer Hemmung von ACE2. Das zugrunde liegende Testsystem misst diese Produkthemmung über die kompetitive Verdrängung eines fluorogenen Substrats von ACE2. Die Hypothese der vorliegenden Dissertation ist eine Verlangsamung der enzymatischen Umsetzung des fluorogenen Substrats durch ACE2 nach Zugabe von AT 1-7. Diese Verlangsamung spiegelt sich in einem Abfall der initialen Steigung des Fluoreszenzsignals wider. Des Weiteren wurde mittels des enzymbasierten Testsystems überprüft, inwieweit die Hemmung von ACE2 auch durch potenzielle Peptidfragmente von AT 1-7 erfolgt.

Zellbasierter Assay: ***Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode***

Das zweite Testsystem verwendet ein Zellkulturmodell zur biologischen Funktionsprüfung von Angiotensinen. Dabei wird sich zunutze gemacht, dass die Hochregulation der AT 1-7/Mas-Achse in humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) in einer Phosphorylierung von eNOS resultiert [141]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, das durch die AT 1-7/Mas-vermittelte eNOS-Aktivierung die NO-Produktion steigt [105]. Das Assay-Prinzip des vorliegenden zellbasierten Testsystems beruht auf der indirekten Messung von freigesetztem NO in Zellkulturüberständen von HUVEC nach einer Behandlung der Zellen mit AT 1-7. Dem Testsystem liegt die Hypothese zugrunde, dass die Behandlung von HUVEC mit AT 1-7 in einer Steigerung der NO-Produktion durch die Zellen resultiert. Ebenso wie bei dem enzymbasierten Testsystem war ein weiteres Ziel dieser Dissertation die Überprüfung der Zunahme der NO-Freisetzung durch potenzielle Peptidfragmente von AT 1-7.

Zur Stimulation von HUVEC wurden im Rahmen der Methodenentwicklung zudem die Substanzen Acetylcholin (ACh), TNF-α und Carbachol eingesetzt. ACh ist eine vasodilatatorische Substanz [38, 111], welche über die Translokation von eNOS eine erhöhte Produktion von NO anregt [33]. Carbachol induziert ebenfalls die Steigerung der NO-Produktion über die Aktivierung von eNOS [70]. Der wahrscheinliche Rezeptor-vermittelte Weg dieser beiden Substanzen schließt die Beteiligung des muskarinergen Acetylcholinrezeptors 3 ein [14, 30]. Die Behandlung von HUVEC mit TNF-α zeigte auch eine Erhöhung der NO-Produktion über die Hochregulation der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase mit nachfolgender Phosphorylierung von eNOS [28]. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass TNF-α zudem eine Steigerung der Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) anregt [72]. Da die TNF-α-vermittelte Wirkung teilweise über eine Änderung der Genexpression vollzogen wird, ergibt sich daraus eine verlängerte Inkubationszeit der Zellkulturen mit dieser Substanz [72].

2. Material und Methoden

2.1 Stammlösungen der Peptide

Das Hauptziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung eines Testsystems für den Nachweis der biologischen Aktivität von AT 1-7. Bei einer vernebelten Formulierung von AT 1-7 mit potenziell eingesetzten Hilfsstoffen konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Peptidfragmente von AT 1-7 entstehen. Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Sicherstellung der Entwicklung eines ausreichend spezifischen Testsystems zur Abgrenzung von AT 1-7 und den aufgeführten Peptidfragmenten (s. Tabelle 1). Alle Peptide wurden nach Erhalt in destilliertem Wasser zu einer 1 mM Stammlösung verdünnt. Nach der Aliquotierung in Mikroreaktionsgefäße erfolgte die Lagerung bei -20 °C im Labortiefkühlschrank.

2.1.1 Materialien und Geräte

Tabelle 1: Materialien- und Geräteübersicht der Peptid-Stammlösungen.

Materialen- und Geräteübersicht mit Angabe der Firma einschließlich Betriebsstandort und Modell.

(AT = Angiotensin)

Materialien	Firma, Betriebsstandort	Modell
Peptide		
AT 1-7	ABX advanced biochemical compounds GmbH, Radeberg, Deutschland	
AT 1-5	Core Facility Functional Peptidomics, Universität Ulm, Deutschland	
AT 1-6	Core Facility Functional Peptidomics	
AT 2-6	Core Facility Functional Peptidomics	
AT 2-7	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Hamburg, Deutschland	
AT 3-7	Elabscience, Houston (Texas), USA	
Reagenzien		
Aqua bidest		
Geräte		
Labortiefkühlschrank	Liebherr, Ulm, Deutschland	Comfort NoFrost

Tabelle 1: Materialien- und Geräteübersicht der Peptid-Stammlösungen (Fortsetzung).

Materialien	Firma, Betriebsstandort	Modell
Pipette	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland	Research
Verbrauchsmaterialien		
Mikroreaktionsgefäß; unsteril	Eppendorf SE	
Pipettenspitze	Eppendorf SE	

2.2 Enzymbasierter Assay: *Hemmung der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 durch Angiotensine*

2.2.1 Assay-Prinzip

Dem enzymbasierten Testsystem *Hemmung der ACE2-Aktivität durch Angiotensine* liegt eine Fluoreszenzmessung zugrunde. Für diesen Assay wurde ein fluorogenes Substrat (Mca-YVADAPK(Dnp)-OH Fluorogenic Peptide Substrate) eingesetzt, welches durch das Enzym ACE2 umgesetzt wird [8]. Das Substrat setzt sich aus der fluoreszierenden 7-Methoxycumarin-Gruppe (Mca) am N-terminalen Ende und der Quencher-Gruppe 2,4-Dinitrophenyl (Dnp) am C-terminalen Ende zusammen [99]. Bei vollständig erhaltenem Substrat kommt es durch Resonanzenergieübertragung auf die Quencher-Gruppe zur Fluoreszenzlöschung von Mca [99]. Das Enzym ACE2 fungiert als Zinkmetalloprotease und ist in der Lage, die Bindung am C-terminalen Ende von geeigneten Peptiden zu spalten [124]. Im Falle des verwendeten Substrats spaltet es die Bindung zwischen Prolin und Lysin am C-terminalen Ende, womit die Quencher-Gruppe vom Substrat abgetrennt wird [8, 99]. Dies führt zu einer räumlichen Trennung der Fluoreszenz- und der Quencher-Gruppe und resultiert in einem Entfallen der Fluoreszenzlöschung [99]. Das Signal der fluoreszierenden Gruppe (Mca) ist damit messbar und nimmt über die Zeit betrachtet zu, bevor die Reaktion ein Plateau erreicht.

Wie bereits aufgeführt katalysiert ACE2 die Reaktion von AT II zu AT 1-7 (s. Abbildung 1) [101]. Dabei spaltet ACE2 am C-terminalen Ende von AT II die Aminosäure Phenylalanin von Prolin ab, wobei das Peptid AT 1-7 entsteht [124]. AT 1-7 wird selbst nicht von ACE2 hydrolysiert [124]. Auf diesen Erkenntnissen basiert die Hypothese, das AT 1-7 im Sinne

einer kompetitiven Produkthemmung mit geeigneten Substraten um das aktive Zentrum von ACE2 konkurrieren kann. Das zugrunde liegende zellbasierte Testsystem untersucht die biologische Aktivität von AT 1-7 anhand seiner Hemmung auf die ACE2-Aktivität. Als Maß für die ACE2-Aktivität wurde die initiale Steigung der Fluoreszenzintensität verwendet, welche sich aus der Umsetzung des fluorogenen Substrats und ACE2 ergibt. Dabei gilt für die Enzymaktivität: Je höher die inhibitorische Wirkung von AT 1-7 auf ACE2 ist, desto weniger Substrat-Moleküle werden von ACE2 umgesetzt und für die initiale Steigung der Fluoreszenzintensität ergibt sich ein niedrigerer Wert. Da in dem hier vorgestellten geschlossenen Versuchsaufbau die Substratkonzentration kontinuierlich abnimmt, wurde die initiale Steigung der Signaländerung als Maß für die Enzymaktivität durch eine Regression über einen längeren Zeitraum und anschließender Extrapolation auf den Startzeitpunkt der Reaktion bestimmt. Als weitere Testsubstanzen wurden die fünf Peptidfragmente verwendet (s. Tabelle 1), um die biologischen Aktivitäten von potenziell entstehenden Peptidfragmenten und AT 1-7 zu vergleichen.

2.2.2 Materialien und Geräte

Tabelle 2: Materialien- und Geräteübersicht des enzymbasierten Assays *Hemmung der ACE2-Aktivität durch Angiotensine*.

Materialen- und Geräteübersicht mit Angabe der Firma einschließlich Betriebsstandort und Modell.

(ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym; rh = rekombinantes humanes; Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethane)

Materialien	Firma, Betriebsstandort	Modell
Reagenzien (Marke)		
Fluorogenic Peptide Substrate: Mca-Y-V-A-D-A-P-K(Dnp)-OH	R&D Systems, Minneapolis (Minnesota), USA	
Natriumchlorid (Sigma-Aldrich)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	
Natriumhydroxid 1N (AVS Titrinorm)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	
rhACE-2	R&D Systems	
Salzsäure (AnalaR Normapur)	VWR International GmbH	
Tris	United States Biological, Salem (Massachusetts), USA	

Tabelle 2: Materialien- und Geräteübersicht des enzymbasierten Assays *Hemmung der ACE2-Aktivität durch Angiotensine* (Fortsetzung).

Materialien	Firma, Betriebsstandort	Modell
Geräte		
Eismaschine	Manitowoc, Milwaukee (Wisconsin), USA	
Handdispenser-Pipette	Eppendorf SE	Xplorer
Labortiefkühlschrank	Liebherr	Comfort NoFrost
pH-Messsonde	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland	HI 223 Calibration Check Micropro-cessor
Pipette	Eppendorf SE	Research
Spark-Multimode-Mikroplattenleser	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz	Tecan Spark 10M
Tischzentrifuge	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	PerfectSpin 24 R Refrigerated microcentrifuge
Vortex-Schüttler	Scientific industries, Bohemia (New York), USA	Vortex Genie 2
Verbrauchsmaterialien		
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf SE	
Mikroreaktionsgefäß; lichtgeschützt	Eppendorf SE	
Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich	96-Well, Flach-boden (Kamin-form), Schwarz
Pipettenspitze	Eppendorf SE	

2.2.3 Lösungen

Assay-Puffer

Die Arbeitslösungen von Enzym, Substrat und Angiotensin wurden in einem Assay-Puffer angesetzt. Der pH-Wert des Assay-Puffers wurde mittels einer pH-Sonde und entsprechender Zugabe von Salzsäure (10 M) und Natriumhydroxid (1 M) auf 7,5 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Laborkühlschrank. Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurde die Klarheit des Assay-Puffers optisch hinsichtlich des Ausfalls von Substanzen kontrolliert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Assay-Puffers.

Zusammensetzung des Assay-Puffers einschließlich Volumen- und Konzentrationsangaben der eingesetzten Reagenzien.

(Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan)

Reagenzien	Volumen	Konzentration (M)
Natriumchlorid	5,844 g	1
Tris	0,909 g	0,075
Aqua bidest	Ad 100 ml	-

Stamm- und Arbeitslösungen von Enzym, Substrat und Angiotensin

Das rekombinante humane (rh) ACE2 (0,584 mg/ml) und das fluorogene Substrat (4 mM) wurden nach Erhalt aliquotiert und als Stammlösungen bei -20 °C im Labortiefkühlschrank gelagert. Die beiden Substanzen sind nach dem Öffnen bei einer Lagerung zwischen -20 °C bis -70 °C unter sterilen Bedingungen 3 Monate haltbar [8, 99]. Das Substrat weist aufgrund seiner fluorogenen Eigenschaft eine hohe Lichtempfindlichkeit auf [99], weshalb es in lichtgeschützten Mikroreaktionsgefäßen aliquotiert wurde. Das Ansetzen der Peptid-Stammlösungen der jeweiligen Angiotensine ist in Kapitel 2.1 beschrieben.

Die Stammlösungen der eingesetzten Substanzen wurden in Assay-Puffer zu den folgenden Arbeitslösungen verdünnt (s. Tabelle 4). Von der Angiotensin-Arbeitslösung wurden zwei Konzentrationen und von der Substrat-Arbeitslösung fünf Konzentrationen hergestellt. Die verwendeten Konzentrationen der Substrat-Arbeitslösungen wurden so gewählt, um gleiche Abstände zwischen den Messpunkten für eine doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk zu ermöglichen. Die Arbeitslösungen wurden für jede Versuchswiederholung frisch angesetzt.

Tabelle 4: Konzentrationen der Arbeitslösungen von Enzym, Substrat und Angiotensin und deren Endkonzentrationen. Konzentration der Enzym-Arbeitslösung und Konzentrationsreihe der fünf Substrat-Arbeitslösungen und der zwei Angiotensin-Arbeitslösungen einschließlich der jeweiligen Endkonzentrationen.

(AT = Angiotensin)

Arbeitslösung	Konzentration der Arbeitslösung	Endkonzentration
AT-Konzentration 1	132 µM	33 µM
AT-Konzentration 2	40 µM	10 µM
Enzym	0,2 ng/µl	0,1 ng/µl
Substrat-Konzentration 1	20 µM	5 µM
Substrat-Konzentration 2	20/3 µM	5/3 µM
Substrat-Konzentration 3	20/5 µM	5/5 µM
Substrat-Konzentration 4	20/7 µM	5/7 µM
Substrat-Konzentration 5	20/9 µM	5/9 µM

2.2.4 Protokoll: *Hemmung der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 durch Angiotensine*

Modifikation der Vorschrift von R&D Systems

Die Vorschrift von R&D Systems untersucht die Enzymaktivität von ACE2 anhand der Umsetzung des fluorogenen Substrats [8]. Um die inhibitorische Wirkung von AT 1-7 und den Peptidfragmenten auf ACE2 zu untersuchen, musste die Vorschrift von R&D Systems an die vorliegende Arbeitshypothese angepasst werden. Dabei unterlag die zugrundeliegende Methode Modifikationen, bei welchem dem Reaktionsgemisch aus ACE2 und fluorogenem Substrat zusätzlich Angiotensine zugesetzt wurden. Das Reaktionsvolumen von 100 µl wurde aus der Vorschrift übernommen, wobei 25% des Gesamtreaktionsvolumens auf die Zugabe der Angiotensin-Arbeitslösungen entfielen. Dies erforderte eine Anpassung des Volumens der Substrat-Arbeitslösung, welches sich auf 25% des Gesamtreaktionsvolumens verringerte. Somit ergab sich ein neues Volumenverhältnis von Angiotensin, Substrat und Enzym von 1:1:2. Um einen umfangreicheren Überblick über die Kinetik des Versuchs zu ermöglichen, wurde eine Konzentrationsreihe von fünf Substrat-Arbeitslösungen und zwei Angiotensin-Arbeitslösungen erstellt (s. Tabelle 4). Aufgrund der hohen Anzahl dieser

Arbeitslösungen wurden die Angiotensin- und Substrat-Arbeitslösungen der Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Enzym-Arbeitslösung wurde zum Schluss zugegeben und markiert den Start der Reaktion. Die Dauer der Messung wurde zugunsten eines umfassenden Gesamtüberblicks von 5 min auf 20 min verlängert. Im Folgenden ist das Protokoll des enzymbasierten Testsystems aufgeführt und in Abbildung 2 zur weiteren Veranschaulichung schematisch dargestellt.

Protokoll: ***Hemmung der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 durch Angiotensine*** **(s. Abbildung 2)**

1. Auftauen der Stammlösungen von rhACE2, dem fluorogenen Substrat und den Angiotensinen für 5–10 Minuten bei Raumtemperatur (RT).
2. Temperierung des Spark-Multimode-Mikroplattenlesers (Tecan Spark 10M) auf 30 °C und Einstellung des Messprotokolls (s. Tabelle 6).
3. Ansetzen der fünf Substrat-Arbeitslösungen (s. Kapitel 2.2.3).
4. Ansetzen der Enzym-Arbeitslösung (s. Kapitel 2.2.3).
5. Lagerung der Arbeitslösungen von Enzym und Substrat über die Dauer des Versuchs auf Eis.
6. Ansetzen der Angiotensin-Arbeitslösungen für die sechs Angiotensine (s. Kapitel 2.2.3).
7. Vorlegen von 25 µl der entsprechenden Substrat-Arbeitslösung zu jedem Reaktionsansatz mit der Handdispenser-Pipette (s. Tabelle 5).
8. Zugabe von 25 µl der entsprechenden Angiotensin-Arbeitslösung zu den Proben bzw. 25 µl des Assay-Puffers zu den Positivkontrollen mit der Handdispenser-Pipette (s. Tabelle 5).
9. Zugabe von 75 µl des Assay-Puffers zu den Blanks mit der Handdispenser-Pipette (s. Tabelle 5).
10. Durchführung einer Leermessung von zwei Zyklen.
11. Zugabe von 50 µl der Enzym-Arbeitslösung zu den Proben und den Positivkontrollen mit der Handdispenser-Pipette (s. Tabelle 5).
12. Aufzeichnung der Fluoreszenzdaten mit einer Messdauer von 20 min mit dem Spark-Multimode-Mikroplattenleser.

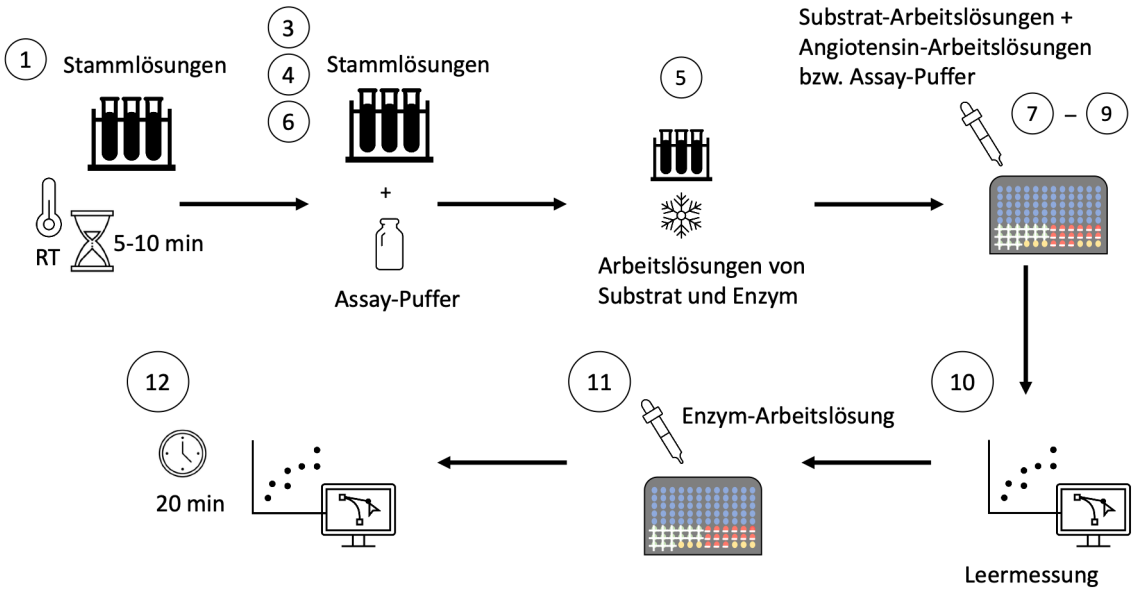


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Protokolls *Hemmung der ACE2-Aktivität durch Angiotensine*.

Die nummerierten schematischen Abbildungen entsprechen den jeweiligen Nummerierungen des obigen Protokolls *Hemmung der ACE2-Aktivität durch Angiotensine*. Die Abbildung wurde eigenhändig mit PowerPoint erstellt.

(ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym; RT = Raumtemperatur)

2.2.5 Versuchsaufbau

Für die finalen Durchführungen des enzymbasierten Assays wurden jeweils Dreifachbestimmungen (technische Replikate) der untenstehenden Reaktionsansätzen angefertigt (s. Tabelle 5). Die Positivkontrolle diente als Kontrollparameter und stellt die unbeeinflusste Reaktion zwischen ACE2 und Substrat dar. Der Blank gibt die Höhe des Ausgangssignals wieder. Der aufgeführte Versuchsaufbau wurde dreimalig ausgeführt (n = 3).

Tabelle 5: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für Blank, Proben und Positivkontrolle.

Der Versuchsaufbau setzt sich jeweils aus Dreifachbestimmungen (technische Replikate) der Reaktionsansätze für fünf Blanks, 60 Proben und fünf Positivkontrollen zusammen.

Proben	Positivkontrolle	Blank
25 µl Angiotensin	25 µl Assay-Puffer	75 µl Assay-Puffer
25 µl Substrat	25 µl Substrat	25 µl Substrat
50 µl Enzym	50 µl Enzym	-

Da mehrere Substrat- und Angiotensin-Konzentrationen getestet wurden, gibt es auch die entsprechende Anzahl an Reaktionsansätzen. Dabei wurde jede Angiotensin-Konzentration gegen jede Substrat-Konzentration getestet. Es ergeben sich somit zehn verschiedene Versuchsbedingungen pro Angiotensin-Fragment. Insgesamt wurden drei 96-Well-Mikrotiterplatten pro Versuchsaufbau benötigt, wobei das untenstehende Plattenlayout einer Mikrotiterplatte der Veranschaulichung dient (s. Abbildung 3). In Tabelle 6 ist das einheitliche Messprotokoll des Spark-Multimode-Mikroplattenlesers aufgeführt.

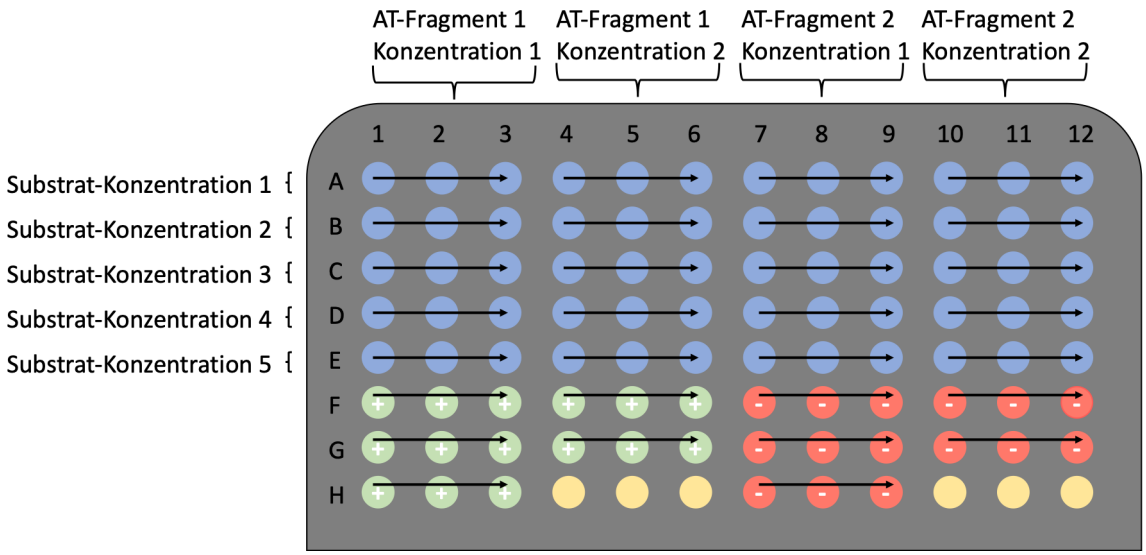


Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung des Plattenlayouts einer Mikrotiterplatte.

Blau hinterlegte Kavitäten: Reaktionsansatz *Probe* der Kombination aus fünf Substrat-Konzentrationen und zwei Angiotensin-Konzentrationen. Grün hinterlegte Kavitäten (+): Reaktionsansatz *Positivkontrolle* der jeweils fünf Substrat-Konzentrationen. Rot hinterlegte Kavitäten (-): Reaktionsansatz *Blank* der jeweils fünf Substrat-Konzentrationen. Gelb hinterlegte Kavitäten: Kein Reaktionsansatz. →: Dreifachbestimmungen (technische Replikate).

Die Abbildung wurde eigenhändig mit PowerPoint erstellt.

(AT = Angiotensin)

Tabelle 6: Messprotokoll des Spark-Multimode-Mikroplattenlesers (Tecan Spark 10M) für Fluoreszenzmessungen.

Die folgenden Einstellungen des Spark-Multimode-Mikroplattenlesers wurden einheitlich für jede Messung übernommen. Die Grundeinstellungen für die Signalverstärkung und Z-Position wurden anhand einer Testplatte festgelegt.

Messprotokoll: *Methode_ACE2_Test (Modified)*	
Messmodus	Fluoreszenz (Top Reading)
Exzitation Wellenlänge	320 nm
Exzitation Bandbreite	20 nm
Emission Wellenlänge	405 nm
Emission Bandbreite	20 nm
Messdauer	20 min
Dauer eines Messzyklus	50 s
Manuelle Signalverstärkung	95
Z-Position	16560 µm
Anzahl Blitze/Kavität	20

2.2.6 Statistische Methoden

Nach erfolgter Messung wurden die Messwerte in ein *Excel* Dokument exportiert und die weitere Verarbeitung der Daten erfolgte mit *Excel* Version 16.76. Für jeden Messzeitpunkt wurde die Fluoreszenzintensität aus den drei technischen Replikaten gemittelt. Als Maß für die ACE2-Aktivität wurde die initiale Steigung der Fluoreszenzintensität verwendet, welche als Regression über den gesamten Messzeitraum von 20 min und einer Extrapolation auf den Startzeitpunkt der Analyse berechnet wurde. Die Werte der initialen Steigung aus den drei Versuchswiederholungen wurden wiederum zu einem finalen Wert zusammengefasst. Die Statistik erfolgte mit *R* Version 3.6.3, wobei folgende *R*-Zusatzpakte zur Anwendung kamen: *ggplot2*, *forecast* und *nlme*.

Die relative Enzymaktivität von ACE2 wurde definiert als die ACE2-Aktivität nach Zusatz der jeweiligen Angiotensine in Relation zu der Positivkontrolle ohne Zusatz von Angiotensinen. Diese wurde für jedes Angiotensin in Abhängigkeit von der Substrat- und Peptid-Konzentration berechnet. Des Weiteren erfolgte die Bildung des arithmetischen Mittels der relativen Enzymaktivitäten von ACE2 aller Substrat-Konzentrationen eines jeweiligen Angiotensins. Dieser Schritt diente der weiteren Beschreibung der Angiotensin-Hemmwirkung in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration. Zur Prüfung der Signifikanz der Peptid-Konzentration auf die mittlere relative Enzymaktivität von ACE2 wurde ein t-Testverfahren eingesetzt (p-Wert < 0,05 = statistisch signifikant).

In einer weiteren statistischen Analyse erfolgte der Einfluss der festen Faktoren (engl. fixed factors) *Substrat-Konzentration*, *Art des Peptids* und *Peptid-Konzentration* auf die initiale Steigung der Fluoreszenzintensität (abhängige Variable) in Form eines gemischten Modells (engl. mixed model). Nacheinander wurde die statistische Signifikanz der beschriebenen Faktoren sowie kombinierte Interaktionen daraus auf das Modell untersucht. In dem vorliegenden Modell wurden die technischen Replikate in Form von zufälligen Faktoren (engl. random factors) berücksichtigt und stellen eine mögliche Fehlerquelle dar. Die Darstellung signifikant unterschiedlicher Peptide erfolgte als *compact letter display*. In dieser Anschauung teilen sich signifikant unterschiedliche Peptide keinen gemeinsamen Buchstaben, wohingegen ein gemeinsamer Buchstabe keinen signifikanten Unterschied anzeigt. Das festgelegte Signifikanzniveau aller Berechnungen beträgt 0,05.

2.3 Zellkultur

Für den zellbasierten Assay *Nitrat + Nitrit-Messung mittels Griess-Methode* war das Arbeiten mit Zellkulturen unter der Sterilbank erforderlich. Dabei wurde die Zellkulturlinie HUVEC verwendet und mit den Substanzen ACh, Carbachol und TNF-α zur Stimulation der NO-Freisetzung behandelt. In den nachfolgenden Kapiteln wird das allgemeine Arbeiten mit Zellkulturen beschrieben. Auf die spezifischen Besonderheiten der verwendeten HUVEC-Zellkulturlinie wird in Kapitel 2.3.5 eingegangen.

2.3.1 Materialien und Geräte

Tabelle 7: Materialien- und Geräteübersicht für die Zellkultivierung.

Materialen- und Geräteübersicht mit Angabe der Firma einschließlich Betriebsstandort und Modell.

(DMSO = Dimethylsulfoxid; DPBS = Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung; EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure; FKS = fetales Kälberserum; HUVEC = humane Umbilikalvenen-Endothelzellen)

Materialien	Firma, Betriebsstandort	Modell
Reagenzien (Marke)		
Amphotericin B (Sigma-Aldrich)	Merck KGaA	
CASYton Messlösung	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, Bremen, Deutschland	
DMSO (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	
DPBS, ohne Kalzium, ohne Magnesium (Gibco)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland	
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland	
Endothelial Cell Supplement Mix	PromoCell GmbH	
FKS (Gibco)	Thermo Fisher Scientific GmbH	
Gelatine (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	
Gentamycin (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	
Isopropanol (Fluka)	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland	
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	
Trypsin-EDTA 10x (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	

Tabelle 7: Materialien- und Geräteübersicht für die Zellkultivierung (Fortsetzung).

Materialien	Firma, Betriebsstandort	Modell
Zellkulturlinie		
HUVEC	PromoCell GmbH	
Geräte (Marke)		
Absaugpumpe	KNF DAC GmbH, Hamburg, Deutschland	Laboport N816
Autoklav	Systec GmbH & Co. KG, Linden, Deutschland	VX-95
Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific GmbH	Mr. Frosty
Handdispenser-Pipette	Eppendorf SE	Multipette plus
Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland	Heracell
Laborkühlschrank	Liebherr	
Labortiefkühlschrank	Liebherr	
Mikroskop	Nikon Europe B.V., Amstelveen, Niederlande	Diaphot 300
Pipette	Eppendorf SE	Research plus
Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland	Integra Pipetboy 2
Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH	Herasafe
Zellzähl- und Analysesystem	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG	CASY TTC
Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH	Megafuge 2.0 R; Varifuge 3.0 R
Verbrauchsmaterialien (Marke)		
CASYcup Messgefäß	OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG	
Direktverdrängerpipettenspitze; verschiedene Größen	Eppendorf SE	Combitips advanced
Filter (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	
Kunststoffpipette: 5 ml	Greiner Bio-One International GmbH	
Kunststoffpipette: 10 ml	Thermo Fisher Scientific GmbH	
Kunststoffpipette: 25 ml	CoStar Group, Arlington (Virginia), USA	
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf SE	

Tabelle 7: Materialien- und Geräteübersicht für die Zellkultivierung (Fortsetzung).

Materialien	Firma, Betriebsstandort	Modell
Mikrotiterplatte; steril	Thermo Fisher Scientific GmbH	96-Well, Flach-boden, Nunclon Delta, transparent
Pasteurpipette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	
Pipettenspitze; unsteril	Eppendorf SE	
Schraubröhre: 5 ml, 10 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	
Zellkulturflasche: T25, T75, T175	Thermo Fisher Scientific GmbH	
Zentrifugenröhre: 15 ml, 20 ml	Greiner Bio-One International GmbH	

2.3.2 Medien und Lösungen

Trypsin-Arbeitslösung

Die Herstellung der Trypsin-Arbeitslösung erfolgte durch Mischen von Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Dulbeccos phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) in einem Verhältnis von 1:10. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Endothelzellen (EC)-Kulturmedium

Als Basismedium für die Kultivierung von HUVEC wurde das Endothelial Cell Growth Medium von PromoCell verwendet, welches mit Zusätzen angereichert wurde (s. Tabelle 8). Das Endothelzellen (EC)-Kulturmedium wurde anschließend unter der Sicherheitswerkbank sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C und hatte unter diesen Bedingungen eine Haltbarkeit von 4-6 Wochen.

Tabelle 8: Zusammensetzung des EC-Kulturmediums.

Zusammensetzung des EC-Kulturmediums einschließlich der Volumenangabe und finaler Endkonzentration der eingesetzten Reagenzien pro Kulturmediumflasche.

(EC = Endothelzelle; FKS = fetales Kälberserum)

Reagenzien (µg/ml)	Volumen (ml)	Endkonzentration (µg/ml)
Basismedium		
Endothelial Cell Growth Medium	500	-
Zusätze		
Amphotericin B (250)	5	2,23
Endothelial Cell Supplement Mix	-	-
FKS	50	-
Gentamycin (50.000)	5	445,63
L-Glutamin (29.230)	1	52,10

Gelatinelösung

Für die Kultivierung von HUVEC war das Gelatinieren des Kulturflaschenbodens notwendig. Die Lagerung der 0,25%-Gelatinelösung erfolgte bei 4 °C. Die Herstellung ist im Folgenden aufgelistet:

1. Einwiegen von 2,5 g Gelatine in 1 Liter DPBS.
2. Erhitzen der Lösung auf einer Heizplatte bei 100 °C.
3. Abkühlung der Lösung.
4. Abfüllen der Lösung in je 200 ml Flaschen.
5. Autoklavierung der Flaschen.
6. Zugabe von 400 µl Gentamycin (50 mg/ml) vor Gebrauch.

2.3.3 Steriles Arbeiten

Das Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgte unter der Sicherheitswerkbank, um einer Kontaminationsgefahr vorzubeugen. Die Sicherheitswerkbank weist ein spezielles Filtrationssystem auf, um die Raumlauft von Kontaminationsstoffen zu reinigen. Die

eingesetzten Materialien und Lösungen unterlagen speziellen Sterilisationsverfahren, bevor sie zur Anwendung kamen (s. Tabelle 9). Bei allen weiteren Materialien wurden steril verpackte Varianten verwendet. Zusätzlich wurden die Materialien vor Einsatz unter der Sicherheitswerkbank äußerlich mit Isopropanol 70% desinfiziert.

Tabelle 9: Angewendete Sterilisationsverfahren für die Lösungen und Verbrauchsmaterialien der Zellkultivierung. Um die großmöglichste Reinheit für die Lösungen und Verbrauchsmaterialien der Zellkultivierung zu gewährleisten, kamen die untenstehenden Sterilisationsverfahren der Autoklavierung, Heißluftsterilisation und Sterilfiltration zum Einsatz.

Materialien	Sterilisationsverfahren
Lösungen	
Kulturmedium	Sterilfiltration
Reagenzien	Sterilfiltration
Verbrauchsmaterialien	
Becherglas	Heißluftsterilisation
Glasbehälter	Heißluftsterilisation
Messzylinder	Heißluftsterilisation
Mikroreaktionsgefäß	Autoklavierung
Pipettenspitze	Autoklavierung

2.3.4 Inkubation der Zellkulturen

Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte im Kohlenstoffdioxid (CO_2)-Inkubator, dessen Bodenwanne mit vollentsalztem Wasser befüllt war. Daraus resultierte eine Luftfeuchtigkeit von annähernd 100%, welche einer Verdunstung des Mediums durch den Filterdeckel der Zellkulturflasche entgegenwirkte. Die Einstellungen des CO_2-Inkubators sind im Folgenden aufgelistet:

- Temperatur: 37 °C
- CO_2-Gehalt: 5%

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Flaschenbodengröße von 75 cm^2 bis 175 cm^2 kultiviert. Je nach Größe der verwendeten Zellkulturflasche benötigte man für die jeweiligen Zellkulturlösungen und Zellaussaaten verschiedene Volumina, welche einheitlich für die nachfolgenden Protokolle gelten (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Zellkulturparameter in Abhängigkeit von der Größe der Zellkulturflasche.
In Abhängigkeit von der Größe der Zellkulturflasche (25 cm^2 bis 175 cm^2) wurde das Volumen der verwendeten Zellkulturlösung bzw. die Zellzahl der beimpften Zellkulturlinie angepasst, um einheitliche Versuchsbedingungen sicherzustellen.

(DPBS = Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung)

Zellkulturflasche (Fläche des Flaschen-bodens)	Minimale Zellzahl	Maximale Zellzahl	Gelatine (ml)	DPBS (ml)	Kultur-medium (ml)	Trypsin-Arbeitslösung (ml)
T25 (25 cm^2)	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	3	5	5	3
T75 (75 cm^2)	$5 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^6$	6	15	15	5
T175 (175 cm^2)	$1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	10	25	25	7
96-Well-Mikrotiter-platte (0,34 cm^2)	1200		0,05	0,2	0,15	0,05

2.3.5 Kultivierung von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC)

Die Kultivierung von HUVEC unterlag spezifischen Besonderheiten, welche im Nachfolgenden aufgeführt werden.

Protokoll: *Flaschenboden gelatinieren*

Für die Kultivierung der Zellkulturlinie HUVEC war eine Beschichtung des Flaschenbodens mit der 0,25%-Gelatinelösung notwendig (s. Kapitel 2.3.2). Dadurch wurde eine bessere Haftung der Zellen am Flaschenboden erzielt. Im Folgenden ist der Prozess des Gelatinierens geschildert.

1. Zugabe des entsprechenden Volumens der Gelatinelösung (s. Tabelle 10) in die Zellkulturflasche mittels Kunststoffpipette.
2. Vorsichtiges Schwenken der Zellkulturflasche, um den Boden der Flasche vollständig mit Gelatinelösung zu benetzen.
3. Inkubation der Zellkulturflasche im CO_2-Inkubator für mind. 30 min (s. Kapitel 2.3.4).
4. Vollständiges Absaugen der Gelatinelösung mittels Pasteurpipette.

Protokoll: *Zellen auftauen*

Die tiefgefrorenen HUVEC wurden in einem Kryoröhrchen in Passage 1 geliefert (500.000 Zellen/ml). Das nachfolgende Schema gibt das Protokoll für das Auftauen von kryokonservierten Zellen wieder:

1. Gelatinierung der Zellkulturflaschen (s. Kapitel 2.3.5 Protokoll *Flaschenboden gelatinieren*).
2. Auftauen des Kryoröhrchens mit der Zellsuspension in einem warmen Wasserbad.
3. Resuspension der Zellmischung mit einer Pipette und Aufteilung der Zellsuspension in zwei Zellkulturflaschen der Größe T25 und T75 mit 5 ml bzw. 14 ml vorgelegtem EC-Kulturmedium. Dieser Schritt diente der Auswaschung von Dimethylsulfoxid (DMSO), welches tiefgefrorenen Zellen als Frostschutzmittel zugesetzt ist.
4. Inkubation der Zellkulturflaschen für einen Tag im CO_2-Inkubator (s. Kapitel 2.3.4).
5. Erster Wechsel des Zellkulturmediums einen Tag später:
   - Waschen mit dem entsprechenden Volumen von DPBS (s. Tabelle 10).
   - Absaugen von DPBS mittels Pasteurpipette.
   - Zugabe des entsprechenden Volumens von frischem EC-Kulturmedium (s. Tabelle 10).
6. Nachfolgende Wechsel des Zellkulturmediums alle 3-4 Tage.

2.3.6 Zellzahlbestimmung

Das nachfolgende Protokoll beschreibt das Verfahren der Zellzahlbestimmung in einer vorhandenen Zellsuspension. Die Generierung der Zellsuspension ist in Protokoll *Zellernte und Zellsubkultivierung* (s. Kapitel 2.3.7) beschrieben. Die gemessene Zellzahl erlaubte

anschließend die Aussaat von Subkulturen oder Versuchsansätzen mit einer vorgegebenen Zelldichte. Für die Zellzählung wurde auf ein automatisiertes Verfahren mittels Zellzählgerät zurückgegriffen.

Protokoll: *Zellzahlbestimmung*

1. Durchführung des Verfahrens bis Punkt 11 des Protokolls *Zellernte und Zellsubkultivierung* (s. Kapitel 2.3.7) zur Generierung der Zellsuspension.
2. Vorlegen von 10 ml Messlösung (CASYton) in das entsprechende Messgefäß (CASYcup).
3. Zugabe von 10 µl der Zellsuspension in das CASYcup.
4. Homogenisierung von Zellsuspension und Messlösung durch mehrmaliges invertieren mit aufgesetztem Deckel.
5. Einstellung des Verdünnungsfaktors 1:1001 in der Software des Zellzähl- und Analysesystems (CASY TTC).
6. Messung mittels des automatischen Zellzähl- und Analysesystems (CASY TTC).

Als Messwert erhielt man die Zellzahl (Zellen/ml) sowie eine grafische Darstellung der Größenverteilung der Zellen in dem Messgefäß. Der automatisch ermittelte Aggregationsfaktor diente dabei als Überprüfung, ob das Probenmaterial eine ausreichende Homogenität aufwies. Der Wert lässt Rückschlüsse darauf zu, ob die Zellen in der Probe getrennt oder in Zellaggregaten vorliegen. Er sollte für eine optimale Zellzählung einen Wert kleiner als 1,7 annehmen. War dies nicht der Fall, wurde die ursprünglich ausgewertete Zellzahl auf einen Aggregationsfaktor von 1,5 korrigiert.

2.3.7 Zellernte und Zellsubkultivierung

Die für die Versuche verwendeten HUVEC wuchsen adhärent. Das Subkultivieren dieser Zellkulturlinie war notwendig, sobald sich die Fläche des Flaschenbodens annähernd konfluent zeigte. Dies war nach einer Zelldichte von ca. 90% der Fall, wobei die Kontrolle dabei nach Augenmaß unter dem Mikroskop erfolgte. Vorzeitig abgelöste Zellen konnten anhand ihrer geringeren Zellgröße und zunehmenden Farbintensität identifiziert werden. Außerdem schwammen diese Zellen im Überstand, welches nach seitlichem Antippen der Zellkulturflasche unter dem Mikroskop ersichtlich wurde. Die Endothelzellen zeichneten

sich mikroskopisch durch multiple Ausziehungen aus ihrem Zellkörper aus, sofern die Zellkulturen noch nicht konfluent waren. In konfluenten Zellkulturen wiesen die Endothelzellen ein kopfsteinpflasterartiges Muster auf. Um die Zellkulturen zu ernten und subkultivieren war das vorherige Ablösen der adhärenten Zellen vom Flaschenboden notwendig. Auf diese Weise wurden ebenso die Zellen für die Versuchsreihe gewonnen, wobei hier die Aussaat nach dem Ablösen in 96-Well-Mikrotiterplatten erfolgte.

Protokoll: *Zellernte und Zellsubkultivierung*

1. Waschen der Zellen durch Zugabe des entsprechenden Volumens von DPBS (s. Tabelle 10).
2. Absaugen von DPBS mittels Pasteurpipette.
3. Kontrolle des Flaschenbodens unter dem Mikroskop auf ein vorzeitiges Ablösen der Zellen.
4. Enzymatisches Ablösen der Zellen durch Zugabe des entsprechenden Volumens von Trypsin-Arbeitslösung (s. Tabelle 10).
5. Inkubation der Zellkulturflasche für etwa 2 min im CO_2-Inkubator (s. Kapitel 2.3.4).
6. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe der doppelten Menge Zellkulturmedium im Verhältnis zu der Trypsin-Arbeitslösung.
7. Aufsaugen der Zelllösung in eine Kunststoffpipette und Zugabe in eine Zentrifugenröhre.
8. Zentrifugation der Röhre bei 1200 x g für 5 min bei RT.
9. Absaugen des Mediumüberstands mittels einer Pasteurpipette mit Belassen des Zellpellets am Boden der Zentrifugenröhre.
10. Resuspension des Zellpellets mit 1 ml Zellkulturmedium mittels Pipette.
11. Zugabe von weiteren 2 ml Zellkulturmedium zu der Zellsuspension.
12. Bestimmung der entsprechenden Zellzahl zur weiteren Subkultivierung bzw. für die Versuchsansätze in Abhängigkeit von der Größe der Zellkulturflasche (s. Tabelle 10) nach Protokoll *Zellzahlbestimmung* (s. Kapitel 2.3.6).
13. Vorlegen des entsprechenden Volumens von Zellkulturmedium in eine frische Zellkulturflasche bzw. eine 96-Well-Mikrotiterplatte (s. Tabelle 10) und Überführung der Zellen in das Zellkulturmedium mittels Pipette.

2.3.8 Kryokonservierung von Zellkulturen

Die Kryokonservierung von Zellkulturen hatte gegenüber der Weiterkultivierung bis in hohe Passagen den Vorteil, dass die Zellen keinem Selektionsdruck unterlagen. Für die nachfolgenden Experimente konnte dabei auf kryokonservierte Zellen in niedrigen Zellpassagen zurückgegriffen werden. Der Prozess der Kryokonservierung kann in zwei Teile gegliedert werden: Den Schritt des kontrollierten Abkühlens der Zellen (Einfrieren) in einem Gefrierbehälter bei -80 °C und die anschließende Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Der Gefrierbehälter wurde mit Isopropanol 100% befüllt und sorgte für ein konstantes Abkühlen der Zellen von 1 °C/min.

Protokoll: *Kryokonservierung von Zellkulturen*

1. Bestimmung der Zellzahl nach Protokoll *Zellzahlbestimmung* (s. Kapitel 2.3.6). Pro Mikroreaktionsgefäß wurden zwischen 500.000 und $2 \cdot 10^6$ Zellen eingefroren.
2. Herstellung von Aliquoten à 600 µl Einfriermedium (EM) 1:
    - Vorlegen der gewünschten Anzahl von Zellen.
    - Auffüllen des restlichen Volumens mit 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES) und Zellkulturmedium in einem Verhältnis von 1:9.
3. Abfüllen der Aliquote in Mikroreaktionsgefäße.
4. Inkubation der Mikroreaktionsgefäße für 10 min auf Eis.
5. Herstellung von EM 2, welches folgende Reagenzien mit prozentualem Anteil am Gesamtvolumen enthielt:
    - 70% Zellkulturmedium
    - 20% DMSO
    - 10% HEPES
6. Zugabe von 600 µl EM 2 zu jedem Mikroreaktionsgefäß mit nachfolgendem Vermengen von EM 1 und EM 2.
7. Inkubation der Mikroreaktionsgefäße für 30 min auf Eis.
8. Lagerung der Mikroreaktionsgefäße in dem Gefrierbehälter über Nacht im Labortiefkühlschrank bei -80 °C.
9. Entnahme der Mikroreaktionsgefäße aus dem Gefrierbehälter und Lagerung im Stickstofftank bei -196 °C.

2.4 Zellbasierter Assay: *Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode*

2.4.1 Assay-Prinzip

Das Grundprinzip des zellbasierten Testsystems beruht auf der Behandlung von Zellkulturen mit AT 1-7 und anschließender Messung der produzierten Menge an NO in dem Zellkulturüberstand (entspricht konditioniertem Medium). Der zellbasierte Assay besteht somit aus zwei Teilen. Der erste Teil beinhaltet die Kultivierung von HUVEC unter stimulierten Bedingungen mit der nachfolgenden Generierung der konditionierten Medien. Der zweite Teil stellt die indirekte Messung von NO in konditionierten Medien mittels Griess-Methode dar.

Prinzip der Griess-Methode

Als indirekte Nachweismethode von NO in konditionierten Medien dient die Griess-Reaktion, welche erstmals 1879 als ein Verfahren zur Detektion von Nitrit (NO_2^-) bzw. salpetriger Säure (HNO_2) beschrieben wurde [44]. Nitrit und Nitrat (NO_3^-) fallen als stabile Abbauprodukte über Autooxidation von NO in biologischem Probenmaterial an [34, 55, 97 S. 268, 134]. Folgende Reaktionsgleichung gibt die Oxidation von NO zu Nitrit wieder: $4NO + O_2 + 2H_2O \rightarrow 4H^+ + 4NO_2^-$ [46 S. 54]. Dabei stehen die beiden Abbauprodukte nicht in einem festen Verhältnis zueinander, da die Oxidation von Nitrit zu Nitrat durch unterschiedliche äußere Bedingungen beeinflusst werden kann [46 S. 56, 55]. Hierunter fallen zelluläre Prozesse während der Inkubation und bestimmte Medienbestandteile, wie eisenhaltige Proteine im Serum. Aus diesem Grund misst die Griess-Methode die Gesamtkonzentration von Nitrit nach vorheriger Reduktion des enthaltenen Nitrats in den Proben zu Nitrit [10]. Die Gesamtkonzentration von Nitrat + Nitrit in den konditionierten Medien erlaubt Rückschlüsse auf die NO-Produktion durch die Zellen [134]. Eine Negativkontrolle (NK) kennzeichnet den Basalgehalt von Nitrit in dem konditionierten Zellkulturüberstand.

In Abbildung 4 ist das Prinzip der Griess-Methode dargestellt, welche im Folgenden aufgeführt wird [10, 44]. Nitrat wird in einem ersten Schritt mittels Nitratreduktase zu Nitrit reduziert, wobei reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) als Cofaktor dient [10].

Das überschüssige NADH wird durch Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat entfernt, damit es den Ablauf der Griess-Reaktion nicht stört [80]. Nitrit liegt unter sauren Bedingungen als HNO_2 vor. In zwei Diazotierungsschritten entsteht aus der Reaktion von HNO_2 und Sulfanilamid ein Diazoniumderivat und nachfolgend ein Azofarbstoff aus der Kopplung des Diazoniumderivats an *N*-(1-Naphthyl)ethylendiamin-dihydrochlorid (NED) [10, 44]. Der entstandene Azofarbstoff weist stark absorbierende Eigenschaften bei einer Wellenlänge von 540 nm auf [10, 45]. Die Messung der Extinktion (optische Dichte) erfolgte mit Hilfe eines Mikroplattenlesegeräts bei dem spezifischen höchsten Absorptionsmaximum von 540 nm und zusätzlich bei 405 nm (Dual Wavelength). Die Messung bei einer weiteren Wellenlänge, welche nicht in den maximalen Absorptionsbereich fällt, dient der Eliminierung des unspezifischen Hintergrunds [109]. Die Evaluierung wurde mittels einer Natriumnitrat-Standardkurve von bekannten Konzentrationen durchgeführt, basierend auf dem Regressionsmodell nach einer vier parametrischen nicht-linearen Regression der Formel: $Y = (A-D)/(1+(X/C)^B)+D$. Anhand dieses Modells konnte über die gemessenen Extinktionswerte in den Proben die unbekannte Nitrat + Nitrit-Konzentration bestimmt werden.

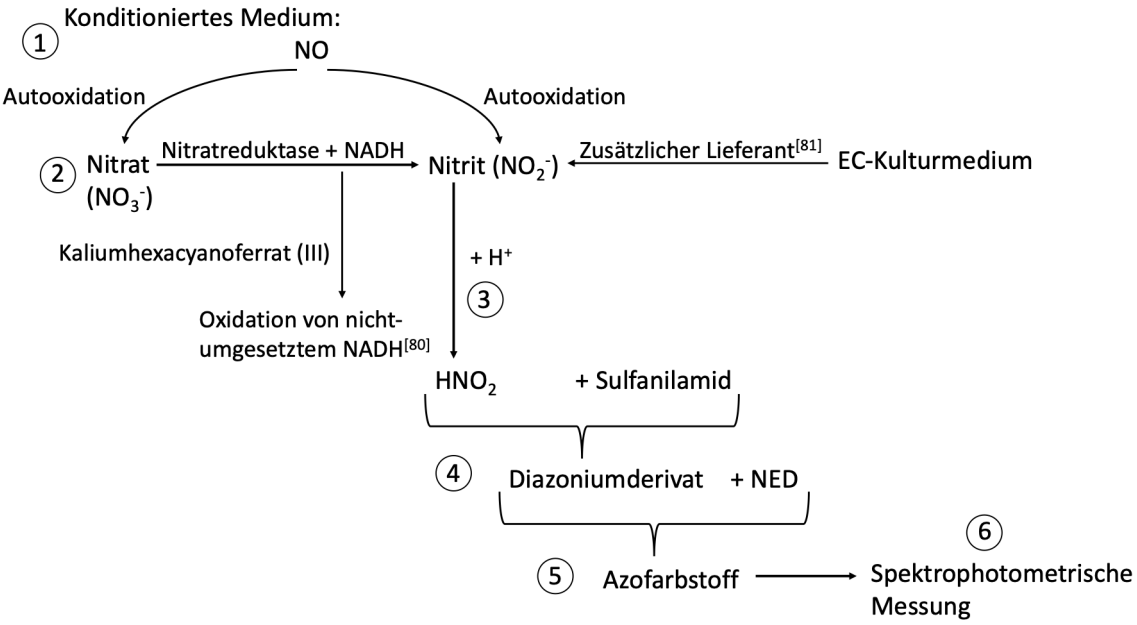


Abbildung 4: Schema der Griess-Methode [10, 44].

Schritt 1: Autooxidation von NO in konditionierten Medien zu Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) [97 S. 268].

Schritt 2: Chemische Reduktion des entstandenen Nitrats zu Nitrit mittels Nitratreduktase.

Schritt 3: Wasserstoffionen (H^+) katalysieren die Entstehung von HNO_2 aus Nitrit.

Schritt 4: Erster Diazotierungsschritt: Bildung eines Diazoniumderivats aus HNO_2 und Sulfanilamid.

Schritt 5: Zweiter Diazotierungsschritt: Bildung eines Azofarbstoffs durch Reaktion des Diazoniumderivats mit NED.

Schritt 6: Spektrophotometrische Messung der Extinktion bei den zwei Wellenlängen 540 nm und 405 nm (Dual Wavelength).

Die Abbildung wurde eigenhändig mit PowerPoint erstellt.

(EC = Endothelzelle; H^+ = Wasserstoffion; HNO_2 = Salpetrige Säure; NADH = reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid; NED = N-(1-Naphthyl)ethylendiamin-dihydrochlorid; NO = Stickstoffmonoxid)

2.4.2 Materialien und Geräte

Tabelle 11: Materialien- und Geräteübersicht des zellbasierten Assays: *Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode*.

Materialen- und Geräteübersicht mit Angabe der Firma einschließlich Betriebsstandort und Modell.

(ACh = Acetylcholin; NADH = reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid;

DEA NONOate = Diethylammonium (Z)-1-(N,N-diethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate;

DPBS = Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung; HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure;

NED = N-(1-Naphthyl)ethylendiamin-dihydrochlorid; TNF-α = Tumornekrosefaktor-alpha)

Materialien	Firma, Betriebsstandort	Modell
Reagenzien (Marke)		
ACh	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland	
β-NADH (Sigma-Aldrich)	Merck KGaA	
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	
Carbachol (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	
DEA NONOate (Cayman Chemical)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	
DPBS, ohne Kalzium, ohne Magnesium (Gibco)	Thermo Fisher Scientific GmbH	
D(+)-Glucose Monohydrat (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	
Enzymlösungsmittel: Enzyme diluent	NECi Superior Enzymes, Lake Linden (Michigan), USA	
Glycerol (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	
HEPES	Biochrom AG	
Kaliumchlorid (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Carl Roth GmbH + Co. KG	
L(+)-Arginin, 98+ %	Thermo Fisher Scientific GmbH	
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	
Natriumchlorid (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	
Natriumhydrogencarbonat (Sigma-Aldrich)	Merck KgaA	

Tabelle 11: Materialien- und Geräteübersicht des zellbasierten Assays: *Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode* (Fortsetzung).

Natriumhydroxid 1N (AVS Titrinorm)	VWR International GmbH	
Natriumnitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG	
NED	Carl Roth GmbH + Co. KG	
Nitratreduktase: AtNaR-5U	NECi Superior Enzymes	
Phosphorsäure	Merck KgaA	
Salzsäure 37%	VWR International GmbH	
Sulfanilamid	Carl Roth GmbH + Co. KG	
TNF-α	Sino Biological Europe GmbH, Eschborn, Deutschland	
Geräte		
Handdispenser-Pipette	Eppendorf SE	Xplorer
Laborkühlschrank	Liebherr	Comfort NoFrost
Labortiefkühlschrank	Liebherr	
Magnetrührer	Heidolph Scientific Products GmbH, Schwabach, Deutschland	MR 2002
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland	RET basic
Mikroplattenlesegerät	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland	El800
Pipette	Eppendorf SE	Research
Verbrauchsmaterialien		
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf SE	
Mikrotiterplatte	SARSTEDT AG & Co. KG	96-Well, Flachboden, Polystyrol, transparent
Pasteurpipette	Carl Roth GmbH + Co. KG	
Pipettenspitze	Eppendorf SE	
Zentrifugenröhre: 15 ml	VWR International GmbH	

2.4.3 Medien und Lösungen

2.4.3.1 Griess-Reagenzien

Die Griess-Reagenzien wurden zu Beginn der Versuchsreihe angesetzt und sind auf unbegrenzte Zeit haltbar. Sofern nicht anderweitig angegeben erfolgte die Lagerung bei 4 °C im Laborkühlschrank.

Sulfanilamid 1%

- 90 ml Aqua bidest
- 5,9 ml Phosphorsäure
- 1 g Sulfanilamid

Die Phosphorsäure wurde unter Rühren hinzugegeben und Sulfanilamid darin eingewogen. Anschließen wurde mit Aqua bidest auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt.

NED 0,1%

- 90 ml Aqua bidest
- 0,1 g NED

NED wurde eingewogen und mit Aqua bidest auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt durch Abdecken der Flasche mit Alufolie.

Natriumnitrat-Standard 0,1 M

- 9 ml Aqua bidest
- 84,9 mg Natriumnitrat

Natriumnitrat wurde eingewogen und mit Aqua bidest auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt.

NADH-Substratlösung

- 10 ml Aqua bidest
- 17 mg β-NADH

Die beiden Reagenzien wurden miteinander vermengt und es wurden 1 ml Aliquote hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C im Labortiefkühlschrank.

Nitratreduktase-Stammlösung

- 1 Röhrchen Nitratreduktase (AtNaR, 5 Units)
- 1 ml Enzyme Diluent (Enzymlösungsmittel)

Beide Reagenzien wurden auf RT gebracht. Um losen Inhalt zu lösen wurde das Röhrchen Nitratreduktase (AtNaR) umsichtig auf den Tisch geklopft. Anschließend erfolgte die Zugabe des gesamten Röhrchens Enzyme Diluent. Die Nitratreduktase-Stammlösung wurde unmittelbar, nach 5 min und nach 10 min durch Inversion gemischt.

Nitratreduktase-Arbeitslösung 1 U/ml in Glycerol 25%

- Nitratreduktase-Stammlösung (gesamter Inhalt)
- 3 ml DPBS
- 1 ml Glycerol

Der gesamte Inhalt der Nitratreduktase-Stammlösung wurde mit den angegebenen Volumina von DPBS und Glycerol vermengt und es erfolgte die Herstellung von 100 µl Aliquoten. Bei einer Lagerung von -20 °C betrug die Haltbarkeit der Arbeitslösung 6 Monate.

Kaliumhexacyanoferrat-Stammlösung 1 M

- 10 ml Aqua bidest
- 3,3 g Kaliumhexacyanoferrat (III)

Kaliumhexacyanoferrat (III) wurde eingewogen und mit Aqua bidest auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei RT.

Kaliumhexacyanoferrat-Arbeitslösung 10 mM

- 5 µl Kaliumhexacyanoferrat-Stammlösung 1 M
- 495 µl Aqua bidest

Die beiden Reagenzien wurden miteinander vermengt. Die Kaliumhexacyanoferrat-Arbeitslösung wurde für jeden Versuchsansatz frisch angesetzt.

2.4.3.2 Stimulationssubstanzen

Wie bereits einleitend erwähnt, kamen die Substanzen ACh, Carbachol und TNF-α zur Behandlung von HUVEC zum Einsatz. Damit sollte eine Steigerung der NO-Produktion durch die Zellen erreicht werden. Die Stimulationssubstanzen (s. Tabelle 12) wurden vorwiegend in EC-Kulturmedium (s. Kapitel 2.3.2) gelöst. Für einen Teilversuch erfolgte das Ansetzen der Stimulationssubstanzen in KH-Arbeitslösung (s. Kapitel 2.4.3.3). Das Ansetzen von den Arbeitslösungen der Stimulationssubstanzen erfolgte für jede Behandlung frisch.

Tabelle 12: Arbeitslösungen der Stimulationssubstanzen und ihre Endkonzentration.

Die Zellkulturlinie HUVEC wurde mit den aufgelisteten Stimulationssubstanzen behandelt, um eine Steigerung der NO-Freisetzung zu erzielen. Im Folgenden sind die Stimulationssubstanzen und ihre Endkonzentration aufgelistet.

(ACh = Acetylcholin; HUVEC = humane Umbilikalvenen-Endothelzellen; TNF-α = Tumornekrosefaktor-alpha)

Stimulationssubstanzen	Endkonzentration
ACh	1 µM
Carbachol	1 µM
TNF-α	10 ng/ml

2.4.3.3 Krebs-Henseleit (KH)-Arbeitslösung

Im Prozess der Methodenentwicklung wurden HUVEC für einen Teilversuch mit Krebs-Henseleit (KH)-Arbeitslösung präinkubiert und bei der weiteren Durchführung des Assay-Protokolls wurde das EC-Kulturmedium durch KH-Arbeitslösung ersetzt (s. Kapitel 3.2.5). Ziel dieses Teilversuchs war die Überprüfung, ob durch den Wechsel zu der Nitrit-freien KH-Lösung geringe Unterschiede in der Nitrat + Nitrit-Konzentration ohne und nach Zusatz der Stimulationssubstanzen durch eine Verringerung des Hintergrunds aufgedeckt werden können [63, 73]. Dieser Modifikationsschritt orientierte sich an der Methode von Joshi et al., welche die Präinkubation von HUVEC mit KH-Arbeitslösung aufführte [58]. Für die KH-Stammlösung wurden die untenstehenden Reagenzien (s. Tabelle 13) in 8 l Aqua bidest gelöst und anschließend mit Aqua bidest auf 10 l aufgefüllt. Es erfolgte das Umfüllen in 1 l Flaschen mit darauffolgender Autoklavierung. Gelagert wurde die KH-Stammlösung bei RT.

Tabelle 13: Zusammensetzung der KH-Stammlösung.

Mengenangaben zum Ansatz der KH-Stammlösung sowie die Endkonzentrationen der eingesetzten Reagenzien in der KH-Arbeitslösung.

(KH = Krebs-Henseleit)

Reagenzien	Menge (g)	Endkonzentration (mM)
Kaliumchlorid	35	4,7
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	29,6	1,2
Natriumchlorid	690	118
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	16,6	1,2

Die Herstellung der KH-Arbeitslösung erfolgte durch das Einwiegen der aufgelisteten Reagenzien (s. Tabelle 14) in 4 l Aqua bidest und nachfolgender Auffüllung mit Aqua bidest auf ein Endvolumen von 5 l. Die KH-Arbeitslösung wurde durch Schütteln homogenisiert. Die Haltbarkeit der fertigen Lösung betrug 1-2 Tage bei einer Lagerung von 4 °C.

Tabelle 14: Zusammensetzung der KH-Arbeitslösung.

Mengenangaben zum Ansatz der KH-Arbeitslösung (Endvolumen 5 l) sowie die Endkonzentrationen der eingesetzten Reagenzien in der KH-Arbeitslösung.

(KH = Krebs-Henseleit)

Reagenzien	Menge	Endkonzentration (mM)
Aqua bidest	4 l	-
Calciumchlorid	0,882 g	1,2
D(+)-Glucose-Monohydrat	5,45 g	5,5
KH-Stammlösung	500 ml	s. Tabelle 13
Natriumhydrogencarbonat	8 g	19,1

2.4.3.4 Verwendung des Stickstoffmonoxid-Donors DEA NONOate als Positivkontrolle und Stimulationssubstanz

In zwei Teilversuchen wurde Diethylammonium (Z)-1-(N,N-diethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate (DEA NONOate) als Positivkontrolle bzw. Stimulationssubstanz zur weiteren Entwicklung der Methode eingesetzt (s. Kapitel 3.2.4 und Kapitel 3.2.6). DEA NONOate fungiert als NO-Donator und führt zu einer Freisetzung von 1,5 Mol NO pro Mol des Ausgangsstoffs DEA NONOate [15, 76]. Durch die definierte Freisetzung von NO kann überprüft werden, ob ein Nachweis von NO über die Abbauprodukte Nitrat + Nitrit mittels Griess-Methode generell möglich ist. Für die genannte Fragestellung wurde DEA NONOate jeweils frisch in eine 0,01 M Natriumhydroxid-Lösung eingewogen. Aus diesen Stammlösungen mit genau berechneten Konzentrationen entstanden durch weitere Verdünnungsschritte mit EC-Kulturmedium Arbeitslösungen der folgenden Konzentrationen: 50 µM, 25 µM, 5 µM und 2,5 µM. Die Arbeitslösungen wurden für jeden Teilversuch frisch angesetzt.

2.4.4 Generierung von Zellkulturüberständen

Das nachfolgende Protokoll beschreibt den ersten Teil der Versuchsreihe des zellbasierten Assays, bei welchem HUVEC mit und ohne Zusatz von Stimulationssubstanzen zur Steigerung der NO-Freisetzung kultiviert wurden. Dafür sind folgende Begrifflichkeiten von Relevanz: Unkonditioniertes Medium entspricht reinem Zellkulturmedium aus der Flasche, welches nicht mit Zellen in Kontakt kam. Konditioniertes Medium nach Stimulation entspricht dem Zellkulturüberstand von HUVEC nach Behandlung der Zellen mit den Stimulationssubstanzen (s. Kapitel 2.4.3.2). Konditioniertes Medium ohne Stimulation entspricht dem Zellkulturüberstand von HUVEC ohne vorherige Behandlung der Zellen mit den Stimulationssubstanzen (entspricht der NK). Die konditionierten Medien stellten das Probenmaterial für die anschließende Griess-Methode dar. Da die TNF-α vermittelte NO-Freisetzung wie eingangs erklärt auf molekularer Ebene vollzogen wird [72], war eine längere Behandlung der HUVEC mit dieser Stimulationssubstanz notwendig. Im Gegensatz dazu steht der Signalweg von ACh und Carbachol, welcher auf zellulärer Ebene über muskarinerge Rezeptoren vermittelt wird [14, 30]. Daraus resultieren die unterschiedlichen Inkubationszeiten der Stimulationssubstanzen, welche für TNF-α 20–24 h und für ACh bzw.

Carbachol 20–30 min betrugen. In einem Teilversuch wurden HUVEC mit Carbachol zusätzlich für ca. 20–24 h inkubiert, um eine längere Akkumulation von Nitrat bzw. Nitrit zu ermöglichen (s. Kapitel 3.2.5). Entsprechend den Inkubationszeiten der Stimulationssubstanzen wurden ebenfalls zwei NK generiert: Die Inkubationszeit von NK 1 betrug 20–30 min und von NK 2 20–24 h.

Da die Behandlung von HUVEC einen Teil der Methodenentwicklung darstellte, kann folgendes Protokoll nicht einheitlich auf alle Teilversuche übertragen werden. In den jeweiligen Kapiteln des Ergebnisteils sind die einzelnen Anpassungen des Protokolls gekennzeichnet und im Diskussionsteil wird darauf weiter Bezug genommen.

Protokoll: ***Generierung von Zellkulturüberständen***

1. Aussaat von 1.200–20.000 Zellen in 200 µl EC-Kulturmedium in 96-Well-Mikrotiterplatten.
2. Inkubation der Zellkulturplatten im CO_2-Inkubator (s. Kapitel 2.3.4), bis die Kulturfläche unter dem Mikroskop nach Augenmaß zu 90% mit Zellen bedeckt war. Dies umfasste eine Inkubationsdauer von rund 4–5 Tagen.
3. Absaugen des Zellkulturüberstands mittels einer Pasteurpipette.
4. Zugabe der Arbeitslösungen der Stimulationssubstanzen (s. Kapitel 2.4.3.2) bzw. von reinem EC-Kulturmedium (entspricht der NK) zu den ausgesäten Zellen in die Mikrotiterplatte.
5. Inkubation der Zellkulturplatten im CO_2-Inkubator (s. Kapitel 2.3.4). Die Dauer der Inkubation entsprach für ACh, Carbachol und NK 1 20–30 min und für TNF-α, Carbachol 2 und NK 2 20–24 h.
6. Zentrifugation der Mikrotiterplatten für 10 min bei 4500 rpm.
7. Überführung der Zellkulturüberstände nach der Zentrifugation mithilfe von Pipetten in separate Mikrotiterplatten oder Mikroreaktionsgefäße.
8. Inkubation der gesammelten Zellkulturüberstände für 24 h im Laborkühlschrank bei 4 °C. Dieser Schritt diente der Umwandlung von verbliebenem NO in Nitrat bzw. Nitrit.
9. Lagerung der gesammelten Zellkulturüberstände im Labortiefkühlschrank bei -20 °C.

Modifizierungsschritte der Methode in Kapitel 3.2.5

Im Prozess der Methodenentwicklung erfolgte bei einem Teilversuch die Präinkubation der Zellkulturplatten mit 180 µl KH-Arbeitslösung für 40–60 min im CO_2-Inkubator. Das Ansetzen von den Arbeitslösungen der Stimulationssubstanzen ACh, Carbachol und TNF-α erfolgte ebenfalls in KH-Arbeitslösung. Nach Ablauf der Präinkubationszeit erfolgte die Zugabe von den Stimulationssubstanzen zu der vorgelegten KH-Arbeitslösung. Als NK diente konditioniertes Medium ohne Stimulation, bei welchem HUVEC reine KH-Arbeitslösung zugesetzt wurde. Das weitere Vorgehen zur Generierung der Zellkulturüberstände entsprach dem ursprünglichen Protokoll *Generierung von Zellkulturüberständen* Schritt 5–9. Das Ansetzen der Natriumnitrat-Standardreihe erfolgte ebenfalls mit KH-Arbeitslösung und die weitere Messung entsprach dem Protokoll *Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode* (s. Kapitel 2.4.5).

2.4.5 Protokoll: *Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode*

In dem zweiten Teil der Versuchsreihe des zellbasierten Assays erfolgte die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in den gesammelten konditionierten Medien mittels Griess-Methode. Im Folgenden wird das Protokoll aufgeführt, welches auf der Methode von Bryan und Grisham beruht [10].

1. Herstellung der Natriumnitrat-Standardreihe:

- Ansetzen einer Natriumnitrat-Arbeitslösung der Konzentration 100 µM aus dem 0,1 M Natriumnitrat-Standard (s. Kapitel 2.4.3.1) und EC-Kulturmedium (s. Kapitel 2.3.2).
- Herstellung der Natriumnitrat-Standardreihe (s. Tabelle 15) von bekannten Konzentrationen aus der 100 µM Natriumnitrat-Arbeitslösung und EC-Kulturmedium. Der Blank und der Standard (STD) 1 setzten sich aus reinem EC-Kulturmedium ohne Zusatz von Natriumnitrat-Arbeitslösung zusammen.

Tabelle 15: Natriumnitrat-Standardreihe.

Konzentrationsreihe des Natriumnitrat-Standards, welcher aus der Natriumnitrat-Arbeitslösung (100 µM) und EC-Kulturmedium hergestellt wurde.

(EC = Endothelzelle; STD = Standard)

Standardreihe:	Blank	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6	STD 7
Konzentration:	0 µM	0 µM	2,5 µM	5 µM	10 µM	15 µM	20 µM	25 µM

2. Herstellung der Griess-Reagenzien (s. Kapitel 2.4.3.1).
3. Vorwärmen von Sulfanilamid 1% und NED 0,1% auf RT. Lagerung der Nitratreduktase-Arbeitslösung während der Durchführung der Griess-Methode auf Eis.
4. Vorlegen von 40 µl der Proben (konditionierte Medien) bzw. des Natriumnitrat-Standards (s. Tabelle 15) + 5 µl Nitratreduktase-Arbeitslösung (1 U/ml) + 5 µl NADH-Substratlösung in eine transparente 96-Well-Mikrotiterplatte mittels Handdispenser-Pipette.
5. Inkubation der Mikrotiterplatte für 20 min bei RT.
6. Zugabe von 5 µl der Kaliumhexacyanoferrat-Arbeitslösung (10 mM) zu allen Reaktionsansätzen mittels Handdispenser-Pipette.
7. Lichtgeschützte Inkubation der Mikrotiterplatte für 5 min bei RT durch das Abdecken der Platte mit Alufolie.
8. Zugabe von 50 µl Sulfanilamid 1% zu allen Reaktionsansätzen mittels Handdispenser-Pipette.
9. Lichtgeschützte Inkubation der Mikrotiterplatte für 10 min bei RT durch das Abdecken der Platte mit Alufolie.
10. Zugabe von 50 µl NED 0,1% zu allen Reaktionsansätzen mittels Handdispenser-Pipette.
11. Lichtgeschützte Inkubation der Mikrotiterplatte für 10 min bei RT durch das Abdecken der Platte mit Alufolie.
12. Messung der Extinktion bei 540 nm und 405 nm (Dual Wavelength) mit dem Mikroplattenlesegerät (BioTek El800).

2.4.6 Statistische Methoden

Datenexport und Datenverarbeitung

Die Messung der Extinktion erfolgte bei den zwei Wellenlängen 540 nm und 405 nm (Dual Wavelength). Anhand der verrechneten Extinktionswerte der beiden Wellenlängen (540 nm - 405 nm) nach Abzügen des Blanks erfolgte die Erstellung der Natriumnitrat-Standardkurve. Über diese wurden die unbekannten Konzentrationswerte der Proben durch die Software des Messgeräts ermittelt. Die Messwerte wurden in ein Textdokument exportiert und die weitere Verarbeitung der Daten erfolgte mit *Excel* Version 16.76.

Statistische Größen: Mittelwert und Standardabweichung

Für die deskriptive Statistik wurden die Kenngrößen Mittelwert und Standardabweichung aus den technischen Replikaten berechnet. Die grafische Darstellung der Natriumnitrat-Standardreihe erfolgte durch Anlegung einer polynomialen Regressionskurve 4. Grades durch die Messpunkte (s. Kapitel 3.2.2). Bei manchen Proben lagen die Konzentrationswerte außerhalb des kalibrierten Standardbereichs, welcher von 0 µM bis 25 µM reichte. Bei gemessenen Konzentrationswerten außerhalb dieses Standardbereichs wurden die Daten auf 0 µM korrigiert bzw. als >26,25 µM in den Diagrammen gekennzeichnet. Das Streumaß gibt jeweils die Standardabweichung der Replikate wieder.

Lineares Bestimmtheitsmaß R^2 als Gütekriterium

Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist eine dimensionslose Zahl und hat einen Wertebereich von 0 bis 1. R^2 ist ein Maß dafür, wie gut die erstellte polynomiale Regressionskurve 4. Grades den Zusammenhang von Extinktion und Konzentration des Natriumnitrat-Standards beschreibt. Die Messwerte eines Datensatzes mit höherem R^2 liegen näher und mit weniger Streuung an der Modellfunktion als Messwerte eines Datensatzes mit geringerem R^2. Das Bestimmtheitsmaß ist in den Diagrammen der Natriumnitrat-Standardreihen unterhalb der Modellfunktion angegeben.

2.5 Ethikvotum

Für die vorliegende Dissertation war das Einholen eines Ethikvotums nicht erforderlich, da ausschließlich kommerzielle Zellkulturlinien bzw. zellfreie Testsysteme verwendet wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Enzymbasierter Assay: *Hemmung der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 durch Angiotensine*

3.1.1 Modifikation der Vorschrift von R&D Systems zur Messung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität von ACE2 lässt sich nach der Vorschrift von R&D Systems messen. Um die inhibitorische Wirkung von AT 1-7 und seiner Peptidfragmente auf ACE2 zu untersuchen, musste die Vorschrift an die vorliegende Arbeitshypothese angepasst werden (s. Kapitel 2.2.4). Im Folgenden sind die Ergebnisse der Vorversuchsreihe beschrieben, welche zur Finalisierung des enzymbasierten Testsystems beigetragen haben.

Zusatz der Angiotensin-Arbeitslösungen

In der Vorversuchsreihe wurden ausgewählte Angiotensine (AT 1-7, AT 1-6, AT 2-6, AT 1-5) getestet. Um deren inhibitorische Wirkung zu untersuchen, wurden initial folgende Konzentrationen eingesetzt: 250 µM, 100 µM, 33 µM und 10 µM. Die Konzentrationsreihe diente der Untersuchung desjenigen Konzentrationsbereichs, welcher einen deutlichen Einfluss auf die Interaktion zwischen ACE2 und fluorogenem Substrat zeigte. Aus den Vorversuchen ließ sich entnehmen, dass bereits eine geringe Konzentration von Angiotensinen ausreichte, um deren inhibitorische Wirkung nachzuweisen. Um Angiotensin-Lösung einzusparen wurden deshalb für die finale Versuchsreihe die beiden geringeren Peptid-Konzentrationen von 33 µM und 10 µM verwendet. Für die Beurteilung der Angiotensinwirkung wurden zwei Konzentrationen pro Peptid als ausreichend bewertet.

Anpassung der Substrat-Konzentration

Die Konzentrationsangaben von Enzym (0,1 ng/µL) und Substrat (20 µM) wurden initial aus der Vorschrift für die Vorversuchsreihe übernommen. Unter diesen Bedingungen lag die gemessene Fluoreszenzintensität jedoch teilweise über der Obergrenze des Messbereichs des verwendeten Spark-Multimode-Mikroplattenlesers. Dies spricht für eine zu schnelle Reaktion zwischen Enzym und Substrat und machte eine Anpassung der Konzentrationen notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer oberen Konzentrationsgrenze von 5 µM Substrat die gemessene Fluoreszenzintensität im optimalen Messbereich lag.

Anpassungen der Einstellungen des Spark-Multimode-Mikroplattenlesers

Die Temperatur des Fluoreszenzmessgeräts stellte in den ersten Messungen eine instabile Größe dar und stieg während des Detektionszeitraums kontinuierlich an. Aus diesem Grund wurde das Fluoreszenzmessgerät vor dem Start der Messung auf 30 °C temperiert. Diese Temperatur wurde als feste Größe über die gesamte Zeitdauer eingestellt. In den Vorversuchen wurde die Signalverstärkung (engl. gain) mittels der Option *Optimal 100% RFU* anhand einer Test-Mikrotiterplatte bestimmt und nachfolgend für alle weiteren Versuche manuell auf 95 eingestellt. Ebenso wurde die Z-Position mittels der Test-Mikrotiterplatte bestimmt und für alle darauffolgenden Messungen übernommen (s. Tabelle 6).

3.1.2 Vergleich der inhibitorischen Wirkung der Angiotensine auf die Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2

Abbildung 5 zeigt die ACE2-Aktivität mit und ohne Zusatz von Angiotensinen auf. Nach der Zugabe von Angiotensinen konnte eine Abnahme der ACE2-Aktivität beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Angiotensine inhibitorisch auf ACE2 wirken. Hierbei unterschieden sich die einzelnen Angiotensine hinsichtlich des Ausmaßes ihrer inhibitorischen Hemmung auf ACE2. Dieser Sachverhalt ist anhand der unterschiedlichen Steigungen der Graphen ersichtlich. Geringere Werte für die ACE2-Aktivität entsprechen dabei einer stärkeren Hemmwirkung der Angiotensine. Die größte Hemmwirkung auf ACE2 wiesen AT 1-7 und sein Peptidfragment AT 2-7 auf, die geringste Hemmwirkung konnte für AT 1-5 beobachtet werden. Die Reihenfolge der Hemmwirkung konnte mittels visueller Abschätzung wie folgt beschrieben werden, beginnend mit dem stärksten inhibitorischen Effekt auf die ACE2-Aktivität: AT 2-7 > AT 1-7 > AT 1-6 > AT 3-7 ~ AT 2-6 > AT 1-5.

Die Daten für das Peptid AT 1-5 wiesen zudem die Besonderheit auf, dass die Graphen für die Peptid-Konzentrationen 33 µM und 10 µM nahezu deckungsgleich sind. Dies gibt den Anlass zur Vermutung, dass der inhibitorische Effekt von AT 1-5 nicht von der verwendeten Peptid-Konzentration abhängig ist. Konträr dazu weichen die Graphen der anderen Angiotensine für die beiden Peptid-Konzentrationen stärker voneinander ab. Dabei konnte eine stärkere Hemmwirkung für die höhere Angiotensin-Konzentration (33 µM) beobachtet werden.

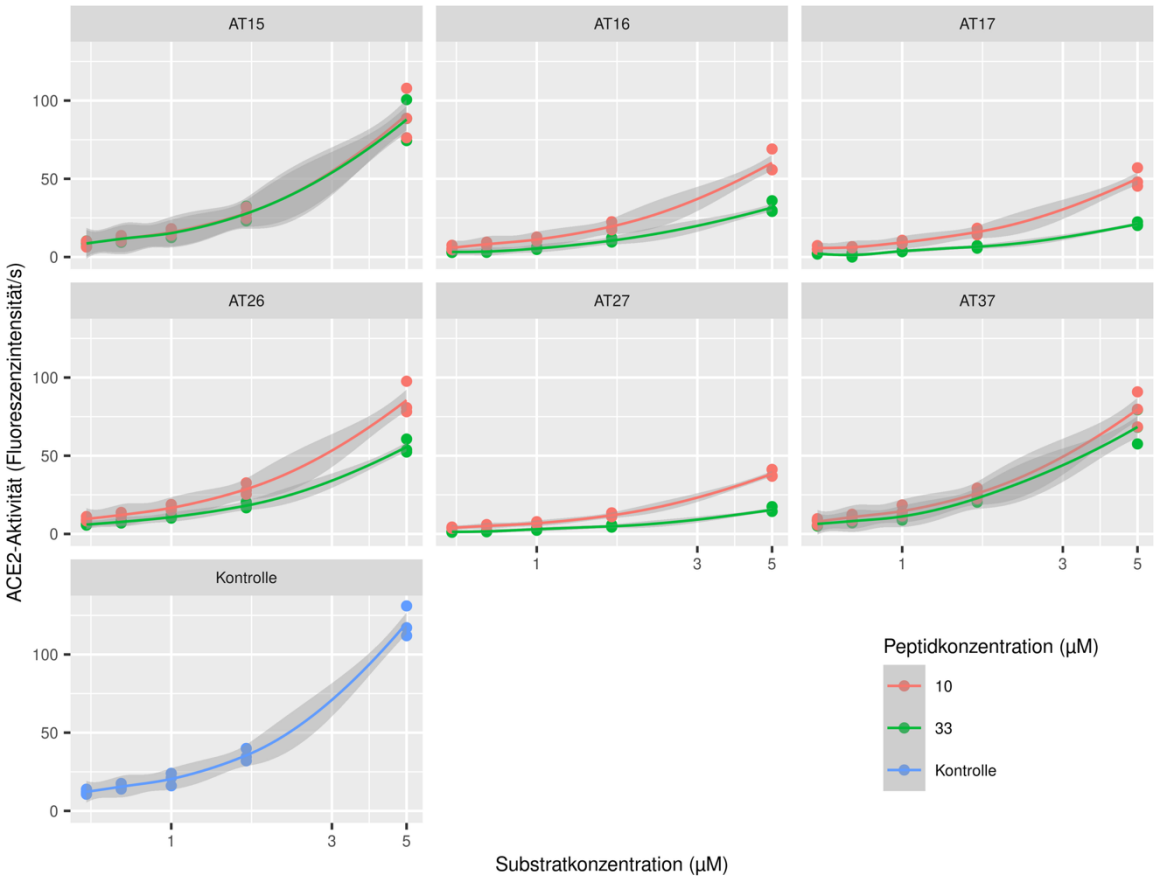


Abbildung 5: Quantitative Bestimmung der ACE2-Aktivität nach Zusatz von Angiotensinen und ohne Zusatz von Angiotensinen (entspricht der Positivkontrolle).

Auf der Abszisse ist die Substrat-Konzentration (µM) und auf der Ordinate die ACE2-Aktivität (Fluoreszenzintensität/s) aufgetragen. Die ACE2-Aktivität ergab sich aus der initialen Steigung der Fluoreszenzintensität, welche als Regression über den gesamten Messzeitraum von 20 min und einer Extrapolation auf den Startzeitpunkt der Messung ermittelt wurde. Die Graphen der jeweiligen Angiotensine und der Positivkontrolle wurden mittels eines lokalen Regressionsverfahrens aus drei Versuchswiederholungen (n = 3) berechnet (vertikale Punkte). Es konnte beobachtet werden, dass der Zusatz von Angiotensinen zu einer Abnahme der ACE2-Aktivität führte. Die Ergebnisse deuteten auf eine inhibitorische Wirkung der Angiotensine auf ACE2 hin, wobei sich die einzelnen Angiotensine in dem Ausmaß ihrer Hemmwirkung voneinander unterschieden.

(ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym; AT = Angiotensin;
Blaue Kurve: Entspricht der Reaktion von ACE2 und fluorogenem Substrat ohne Zusatz von Angiotensinen (= Positivkontrolle);
Rote Kurve: Entspricht der Reaktion von ACE2, fluorogenem Substrat und dem jeweiligen Angiotensin der Konzentration 10 µM;
Grüne Kurve: Entspricht der Reaktion von ACE2, fluorogenem Substrat und dem jeweiligen Angiotensin der Konzentration 33 µM)

3.1.3 Multivariable Analyse des Einflusses der Angiotensine auf die Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2

Mithilfe eines gemischten Modells wurde geprüft, inwieweit die festen Faktoren *Art des Peptids*, *Peptid-Konzentration* und *Substrat-Konzentration* einen Einfluss auf die ACE2-Aktivität zeigten. Dabei konnte für alle festen Faktoren ein signifikanter Einfluss (p-Wert < 0,0001) auf das Modell nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch alle zweifachen Interaktionen (p < 0,0001) und die dreifache Interaktion (p = 0,0062) der Faktoren erwiesen sich als signifikant (Daten nicht gezeigt), sodass eine weitere Analyse der Daten in Subgruppen notwendig war.

Die Zerlegung der Daten innerhalb einer Peptid-Konzentration in die einzelnen Substrat-Konzentrationen zeigte einen signifikanten Einfluss für die Art des Peptids (p-Wert < 0,001). Durch die Aufteilung in die einzelnen Substrat-Konzentrationen wurde der paarweise Vergleich der Peptide untereinander möglich gemacht. Tabelle 22 zeigt auf, welche Peptide sich signifikant voneinander unterschieden. Die signifikant unterschiedlichen Kombinationspaare sind mit einem Stern markiert, wobei die Anzahl der Sterne den Grad der Signifikanz angibt.

Paarweiser Vergleich des inhibitorischen Effekts der Angiotensine

Eine weitere Darstellung des paarweisen Vergleichs des inhibitorischen Effekts der Angiotensine ist im Folgenden als *compact letter display* aufgelistet (s. Tabelle 16). In dieser Datenaufbereitung besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Peptiden, welche den gleichen Buchstaben aufweisen. Umgekehrt unterscheiden sich diejenigen Peptide signifikant voneinander, welche sich keinen gemeinsamen Buchstaben teilen. Der paarweise Vergleich zwischen den einzelnen Peptiden und der Positivkontrolle wies für jedes Angiotensin einen signifikanten Unterschied zu der Positivkontrolle nach. Der Nachweis dieses signifikanten Unterschieds liefert einen weiteren Anhaltspunkt für die inhibitorische Wirkung der Angiotensine auf das Enzym ACE2.

Tabelle 16: Paarweiser Vergleich des inhibitorischen Effekts der Angiotensine als *compact letter display*.
Darstellung des signifikant unterschiedlichen inhibitorischen Effekts der Angiotensine in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration und der Substrat-Konzentration. Signifikant unterschiedliche Peptide teilen sich keinen gemeinsamen Buchstaben. In der rechten Spalte ist die Anzahl der Peptide aufgelistet (inkl. der Positivkontrolle), welche sich signifikant von dem Peptid AT 1-7 unterschieden. Die Positivkontrolle entspricht der Reaktion von ACE2 und fluorogenem Substrat ohne Zusatz von Angiotensinen.

(ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym; AT = Angiotensin)

Peptid-Konzentration (10 µM)								
Substrat-Konzentration (µM)	AT 1-5	AT 1-6	AT 1-7	AT 2-6	AT 2-7	AT 3-7	Positiv-kontrolle	Anzahl der signifikant unterschiedlichen Peptide von AT 1-7 (inkl. Positivkontrolle)
5	c	b	b	c	a	c	d	5
1,67	c	b	b	c	a	c	d	5
1	d	bc	ab	d	a	cd	e	4
0,71	c	b	a	c	a	c	d	5
0,56	c	b	ab	c	a	c	d	4
Peptid-Konzentration (33 µM)								
Substrat-Konzentration (µM)	AT 1-5	AT 1-6	AT 1-7	AT 2-6	AT 2-7	AT 3-7	Positiv-kontrolle	Anzahl der signifikant unterschiedlichen Peptide von AT 1-7 (inkl. Positivkontrolle)
5	e	b	ab	c	a	d	f	4
1,67	e	b	ab	c	a	d	f	4
1	c	a	a	b	a	bc	d	4
0,71	c	a	a	b	a	b	d	4
0,56	c	a	a	b	a	bc	d	4

Signifikanter Unterschied zwischen Angiotensin (AT) 1-7 und der Mehrzahl seiner Peptidfragmente auf die Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2

Da der Hauptfokus dieser Arbeit auf der biologischen Aktivität von AT 1-7 lag, gibt die rechte Spalte von Tabelle 16 die Anzahl der Peptide wieder, deren inhibitorischer Effekt sich signifikant von dem des Peptids AT 1-7 unterscheidete. Der paarweise Vergleich der Angiotensine zeigte, dass sich die inhibitorische Wirkung von AT 1-7 von der Mehrzahl seiner Peptidfragmente signifikant unterschied. Hierbei konnte ein Unterschied zwischen den zwei Peptid-Konzentrationen beobachtet werden, wobei für die Peptid-Konzentration 10 µM die Anzahl signifikant unterschiedlicher Peptide größer war. Die größte Anzahl signifikanter Unterschiede konnte in den Kombinationen *Peptid-Konzentration 10 µM* und *Substrat-Konzentration 5 µM, 1,67 µM und 0,71 µM* verzeichnet werden.

Der Vergleich der Peptide AT 1-6 und AT 1-7 zeigte nur für die Kombination aus *Peptid-Konzentration 10 µM* und *Substrat-Konzentration 0,71 µM* einen signifikanten Unterschied. In allen weiteren Peptid- und Substrat-Kombinationen konnte zwischen AT 1-6 und AT 1-7 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass zwischen AT 1-6 und AT 1-7 die größte strukturelle Ähnlichkeit besteht.

AT 2-7 stellte ein weiteres Peptid dar, bei welchem weitgehend kein signifikanter Unterschied zu AT 1-7 festgestellt werden konnte. Eine Ausnahme bildeten die Kombinationen aus *Peptid-Konzentration 10 µM* und *Substrat-Konzentration 5 µM und 1,67 µM*.

Für die Peptide AT 1-5, AT 2-6 und AT 3-7 konnte in jeder Kombination aus Peptid- und Substrat-Konzentration ein signifikanter Unterschied zu AT 1-7 nachgewiesen werden. Dies gibt den Anlass zur Vermutung, dass zwischen AT 1-7 und diesen Peptidfragmenten der größte strukturelle Unterschied besteht.

3.1.4 Relative Enzymaktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 als Maß für die Stärke der inhibitorischen Wirkung der Angiotensine

Wie der bisherigen Analyse zu entnehmen ist, konnte für die verwendeten Angiotensine eine inhibitorische Wirkung auf ACE2 beobachtet werden. Diese zeigte sich anhand einer Abnahme der ACE2-Aktivität nach Zusatz von Angiotensinen (s. Abbildung 5). Im Weiteren erfolgt eine genauere Betrachtung der Stärke dieser inhibitorischen Wirkung über die Berechnungen der relativen Enzymaktivitäten von ACE2. Die relative Enzymaktivität wurde definiert als die verbleibende ACE2-Aktivität nach Zusatz von Angiotensinen in Relation zur der Positivkontrolle (kein Zusatz von Angiotensinen) in Abhängigkeit von der Substrat- und Peptid-Konzentration (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Relative Enzymaktivität von ACE2 nach Zusatz von Angiotensinen in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration und der Substrat-Konzentration mit der dazugehörigen Standardabweichung.

Die relative Enzymaktivität entsprach der verbleibenden ACE2-Aktivität nach Zusatz von Angiotensinen in Relation zur Positivkontrolle, welche als 100% definiert wurde.

(ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym; AT = Angiotensin; SD = Standardabweichung)

Substrat-Konzentration (µM)	Art des Peptids	Peptid-Konzentration (µM)	Relative Enzymaktivität (%)	SD (%)
0,56	AT 1-7	33	18,0	3,9
0,71	AT 1-7	33	9,0	9,4
1	AT 1-7	33	19,2	6,8
1,67	AT 1-7	33	18,5	1,1
5	AT 1-7	33	17,6	0,7
0,56	AT 1-7	10	46,7	5,5
0,71	AT 1-7	10	40,8	4,0
1	AT 1-7	10	46,2	6,3
1,67	AT 1-7	10	44,9	0,9
5	AT 1-7	10	41,7	2,6
0,56	AT 1-6	33	26,9	3,5
0,71	AT 1-6	33	22,7	3,9
1	AT 1-6	33	27,0	4,1
1,67	AT 1-6	33	29,5	1,4
5	AT 1-6	33	26,3	1,1
0,56	AT 1-6	10	48,1	5,0
0,71	AT 1-6	10	52,4	1,5
1	AT 1-6	10	55,6	8,7
1,67	AT 1-6	10	55,0	4,0
5	AT 1-6	10	50,0	2,6

Tabelle 17: Relative Enzymaktivität von ACE2 nach Zusatz von Angiotensinen in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration und der Substrat-Konzentration mit der dazugehörigen Standardabweichung (Fortsetzung).

Substrat-Konzentration (µM)	Art des Peptids	Peptid-Konzentration (µM)	Relative Enzymaktivität (%)	SD (%)
0,56	AT 2-7	33	11,0	1,0
0,71	AT 2-7	33	10,6	1,1
1	AT 2-7	33	14,6	1,5
1,67	AT 2-7	33	13,8	1,0
5	AT 2-7	33	12,9	0,5
0,56	AT 2-7	10	32,2	1,9
0,71	AT 2-7	10	33,0	1,2
1	AT 2-7	10	33,9	5,2
1,67	AT 2-7	10	33,6	0,9
5	AT 2-7	10	32,1	1,0
0,56	AT 1-5	33	70,5	6,2
0,71	AT 1-5	33	74,6	6,4
1	AT 1-5	33	76,4	18,7
1,67	AT 1-5	33	78,2	10,1
5	AT 1-5	33	72,9	5,7
0,56	AT 1-5	10	71,4	12,0
0,71	AT 1-5	10	74,6	3,2
1	AT 1-5	10	79,8	16,9
1,67	AT 1-5	10	79,1	7,4
5	AT 1-5	10	75,4	7,1
0,56	AT 2-6	33	49,6	3,0
0,71	AT 2-6	33	50,0	4,3
1	AT 2-6	33	53,7	8,2
1,67	AT 2-6	33	51,1	1,1
5	AT 2-6	33	46,4	1,6
0,56	AT 2-6	10	78,9	1,4
0,71	AT 2-6	10	78,4	2,2
1	AT 2-6	10	82,8	9,7
1,67	AT 2-6	10	80,6	1,3
5	AT 2-6	10	71,1	3,0
0,56	AT 3-7	33	52,0	10,4
0,71	AT 3-7	33	53,0	2,9
1	AT 3-7	33	55,9	13,7
1,67	AT 3-7	33	64,6	6,9
5	AT 3-7	33	56,8	4,8
0,56	AT 3-7	10	64,2	8,8
0,71	AT 3-7	10	69,1	7,0
1	AT 3-7	10	72,5	16,3
1,67	AT 3-7	10	73,3	7,8
5	AT 3-7	10	66,2	4,4

Tabelle 17 zeigt, dass sich die geringsten relativen Enzymaktivitäten von ACE2 für AT 1-7 und AT 2-7 der Peptid-Konzentration 33 µM ergaben. Diese beiden Peptide wiesen somit die stärkste inhibitorische Wirkung auf ACE2 auf. Die relativen Enzymaktivitäten von ACE2 lagen hier bei < 20% und entsprachen einer Hemmung von ACE2 um mehr als 4/5 seiner Ausgangsaktivität. Den geringsten Einfluss auf die relative Enzymaktivität von ACE2 zeigten AT 2-6 der Peptid-Konzentration 10 µM und AT 1-5. Für beide Peptide konnten Werte > 70% beobachtet werden. Der Median für die Standardabweichung lag bei 3,8% (Q1 bis Q3: 1,1% bis 6,9%). Die Standardabweichungen der relativen Enzymaktivitäten zeigten zum Teil große Abweichungen. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die Qualität der Daten und ist ein Hinweis darauf, dass einzelne Messwerte stark um den Mittelwert streuen. Ein Blick in die Rohdaten zeigte, dass die Messwerte der technischen Replikate zum Teil großen Schwankungen unterlagen. Dies könnte ein Hinweis auf einzelne Ausreißer der technischen Replikate sein.

Signifikanter Einfluss der festen Faktoren *Substrat-Konzentration* und *Art des Peptids* auf die relative Enzymaktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2

Der Einfluss der festen Faktoren *Substrat-Konzentration* und *Art des Peptids* auf die relative Enzymaktivität von ACE2 konnte mittels des gemischten Modells weiter betrachtet werden. Die vorliegenden Daten zeigten, dass beide Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die relative Enzymaktivität von ACE2 aufwiesen. Dieses Ergebnis konnte für beide Peptid-Konzentrationen beobachtet werden (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Signifikanzprüfung (p-Wert) der festen Faktoren *Substrat-Konzentration* und *Art des Peptids* auf die relative Enzymaktivität von ACE2.

Die Grundlage der Berechnungen war ein gemischtes Modell mit den festen Faktoren *Substrat-Konzentration* und *Art des Peptids* (inkl. Positivkontrolle) in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration. Die relative Enzymaktivität entsprach der verbleibenden ACE2-Aktivität nach Zusatz von Angiotensinen in Relation zur Positivkontrolle, welche als 100% definiert wurde (s. Tabelle 17). Ein p-Wert < 0,05 zeigt einen signifikanten Einfluss an und konnte für beide Faktoren beobachtet werden.

(ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym)

Feste Faktoren	Peptid-Konzentration (µM)	p-Wert
Art des Peptids	33	< 0,0001
Substrat-Konzentration	33	0,0378
Art des Peptids	10	< 0,0001
Substrat-Konzentration	10	0,0190

3.1.5 Mittlere inhibitorische Wirkung der Angiotensine in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration

Um einen Vergleich der einzelnen Angiotensin-Hemmwirkung aller Substrat-Konzentrationen zu ermöglichen, wurde das arithmetische Mittel der relativen Enzymaktivitäten von ACE2 bestimmt (s. Tabelle 19). Die mittlere relative Enzymaktivität von ACE2 bildete als einheitliches Maß die Stärke der Hemmwirkung der Angiotensine in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration ab.

Tabelle 19: Mittlere relative Enzymaktivität von ACE2 für jedes Angiotensin in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration mit der dazugehörigen Standardabweichung.

Das arithmetische Mittel berechnete sich aus der Summe der relativen Enzymaktivitäten von ACE2 für jedes Angiotensin geteilt durch die Anzahl der Substrat-Konzentrationen. Die relative Enzymaktivität entsprach der verbleibenden ACE2-Aktivität nach Zusatz von Angiotensinen in Relation zur Positivkontrolle, welche als 100% definiert wurde (s. Tabelle 17).

(ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym; AT = Angiotensin; SD = Standardabweichung)

Art des Peptids	Peptid-Konzentration (µM)	Arithmetisches Mittel der relativen Enzymaktivitäten von ACE2 (%)	SD (%)
AT 1-7	33	16,5	6,1
AT 1-7	10	44,1	4,4
AT 1-6	33	26,5	3,5
AT 1-6	10	52,2	5,2
AT 2-7	33	12,6	1,8
AT 2-7	10	33,0	2,3
AT 1-5	33	74,5	9,4
AT 1-5	10	76,0	9,4
AT 2-6	33	50,1	4,5
AT 2-6	10	78,3	5,7
AT 3-7	33	56,5	8,6
AT 3-7	10	69,1	9,0

Die Analyse der mittleren inhibitorischen Wirkung der Angiotensine deckte sich mit der Analyse der einzelnen Substrat-Konzentrationen aus Tabelle 17. Auch diese Daten wiesen für AT 2-7 und AT 1-7 der Peptid-Konzentration 33 µM den stärksten inhibitorischen Effekt auf ACE2 nach. Dies zeigte sich anhand der geringsten arithmetischen Mittel. Die maximalen Werte der mittleren relativen Enzymaktivität von ACE2 erzielten AT 2-6 und AT 1-5 der Peptid-Konzentration 10 µM. Für diese beiden Angiotensine konnte damit die geringste inhibitorische Wirkung auf ACE2 bei der geringeren Peptid-Konzentration

beobachtet werden. Es konnte folgende Rangfolge der inhibitorischen Wirkung der Angiotensine über die Betrachtung der mittleren relativen Enzymaktivität von ACE2 ermittelt werden. Die Auflistung beginnt mit dem stärksten hemmenden Angiotensin bei einer Peptid-Konzentration von 33 µM:

AT 2-7 > AT 1-7 > AT 1-6 > AT 2-6 > AT 3-7 > AT 1-5.

Einfluss der Peptid-Konzentration auf die mittlere relative Enzymaktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2

Wie Tabelle 19 zu entnehmen ist, wiesen die mittleren relativen Enzymaktivitäten von ACE2 niedrigere Werte bei einer Peptid-Konzentration von 33 µM auf. Dies entspricht einer positiven Korrelation zwischen der inhibitorischen Wirkung der Angiotensine und der Peptid-Konzentration. Dieser Sachverhalt konnte ebenso für das Peptid AT 1-5 beobachtet werden, jedoch unterschieden sich hier die Werte der beiden Peptid-Konzentrationen nur geringfügig voneinander. Erkennbar zeigte sich dies bereits an der grafischen Darstellung der ACE2-Aktivität (s. Abbildung 5), in welcher die beiden Graphen annähernd deckungsgleich sind. Wurden die mittleren relativen Enzymaktivitäten von ACE2 der zwei Peptid-Konzentrationen 33 µM und 10 µM mittels eines t-Tests weiter verglichen, konnte für AT 1-5 kein signifikanter Unterschied bezüglich der Peptid-Konzentration festgestellt werden (s. Tabelle 20). Im Gegensatz dazu standen AT 1-7 und die anderen vier Peptidfragmente, bei welchen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Peptid-Konzentrationen auf die mittlere inhibitorische Wirkung der Angiotensine nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 20: Signifikanzprüfung (p-Wert) der Peptid-Konzentration auf die mittlere relative Enzymaktivität von ACE2 für jedes Angiotensin.

Die Grundlage der Berechnungen war ein t-Testverfahren zur Signifikanzprüfung des Einflusses der Peptid-Konzentration auf die mittlere relative Enzymaktivität von ACE2. Das arithmetische Mittel berechnete sich aus der Summe der relativen Enzymaktivitäten von ACE2 für jedes Angiotensin geteilt durch die Anzahl der Substrat-Konzentrationen (s. Tabelle 19). Die relative Enzymaktivität entsprach der verbleibenden ACE2-Aktivität nach Zusatz von Angiotensinen in Relation zur Positivkontrolle, welche als 100% definiert wurde (s. Tabelle 17). Ein p-Wert < 0,05 zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Peptid-Konzentrationen 33 µM und 10 µM an und konnte für alle Angiotensine mit Ausnahme von AT 1-5 beobachtet werden.

(ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym; AT = Angiotensin;
Grau hinterlegte Zeile = p-Wert ist für dieses Angiotensin nicht signifikant (p-Wert ≥ 0,05))

Art des Peptids	Differenz der arithmetischen Mittel der relativen Enzymaktivitäten von ACE2 für 33 µM und 10 µM Peptid (%)	95%-Konfidenzintervall für die Differenz der arithmetischen Mittel der relativen Enzymaktivitäten von ACE2 (%)	p-Wert
AT 1-7	27,6	23,6 bis 31,6	$1{,}198 \cdot 10^{-13}$
AT 1-6	25,8	22,4 bis 29,1	$1{,}846 \cdot 10^{-14}$
AT 2-7	20,4	18,8 bis 21,9	$< 2{,}2 \cdot 10^{-16}$
AT 1-5	1,5	-5,5 bis 8,5	0,659
AT 2-6	28,2	24,4 bis 32,0	$1{,}656 \cdot 10^{-14}$
AT 3-7	12,6	6,0 bis 19,2	$5{,}282 \cdot 10^{-4}$

3.2 Zellbasierter Assay: *Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode*

3.2.1 Prozess der Methodenentwicklung

Das übergeordnete Ziel der Versuchsreihe der Nitrat + Nitrit-Messungen war die Entwicklung eines zellbasierten Testsystems für den Nachweis der biologischen Aktivität von AT 1-7. Die zu diesem Zweck eingesetzte Methode kann in zwei Teilbereiche gegliedert werden: In den ersten Abschnitt der Generierung von konditionierten Medien ohne und nach Stimulation der NO-Freisetzung und den zweiten Abschnitt der Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in den konditionierten Medien mittels Griess-Methode. Beide Abschnitte unterlagen in einzelnen Teilversuchen Modifizierungsschritten, damit eine stabile Methode entwickelt werden konnte. Im Folgenden muss der Ergebnisteil dieser Versuchsreihe deswegen als ein Teil der Methodenentwicklung betrachtet werden, welcher parallel zu der Entwicklung des enzymbasierten Testsystems erfolgte. Dabei konnten die einzelnen Teilversuche oftmals nur einmalig durchgeführt werden, worauf in der Diskussion näher eingegangen wird. Letztlich konnte die Methode nicht vollständig entwickelt werden, sodass die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentrationen nach Behandlung von HUVEC mit Angiotensinen nicht erfolgte. In den folgenden Abschnitten werden die tragenden Schlüsselversuche beschrieben, die zur Weiterentwicklung dieser Methode beigetragen haben.

3.2.2 Evaluation der Griess-Methode mittels der Natriumnitrat-Standardreihe

Die Natriumnitrat-Standardreihe dient der Methodenvalidierung. Die folgenden Daten zeigten die Abhängigkeit der Extinktion von den steigenden Konzentrationen des Natriumnitrat-Standards auf. Anhand dieser Kontrolle konnte auf eine funktionierende Methode zur Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration mittels der Griess-Reaktion rückgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte die Reduktion von Nitrat mittels des Enzyms Nitratreduktase umgesetzt werden. Hierbei scheint die Reduktion von Nitrat zu Nitrit abhängig von der verwendeten Natriumnitrat-Konzentration zu sein. Da keine Abflachung der Graphen mit steigender Natriumnitrat-Konzentration zu erkennen ist, tritt keine Sättigung der Reaktion ein.

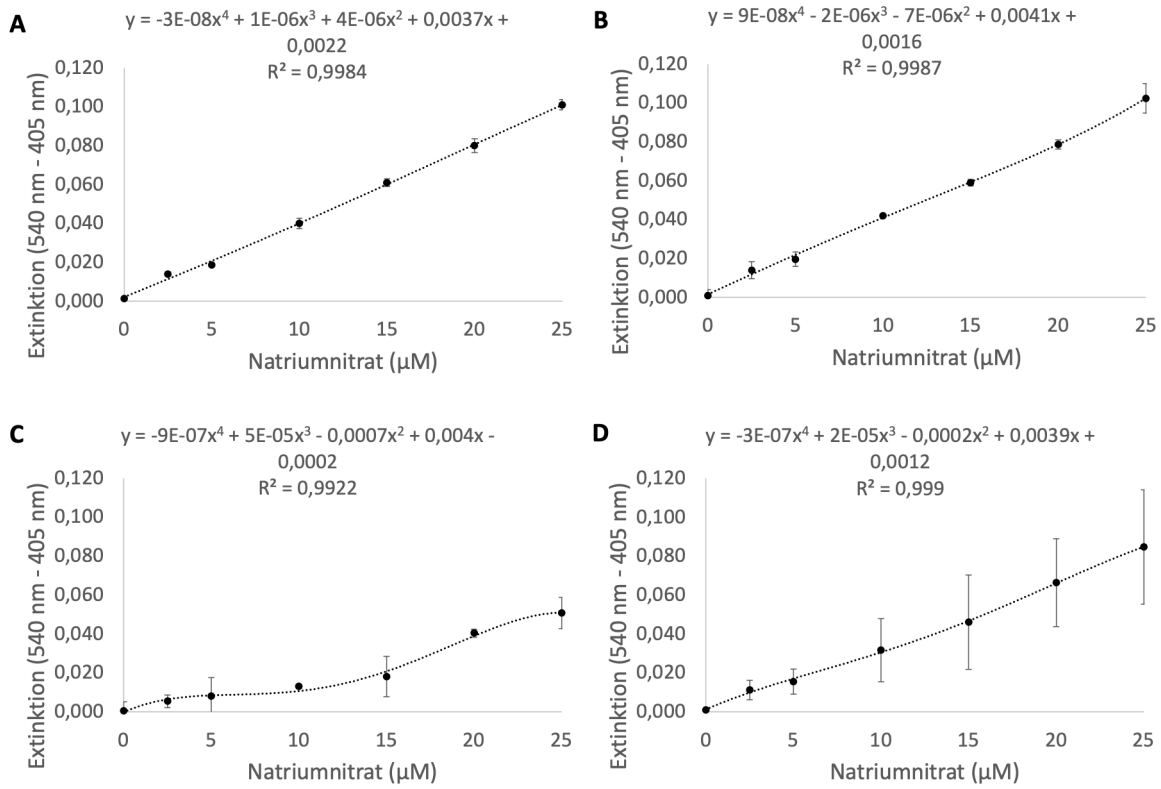


Abbildung 6: Nitrat-Standardreihen der Versuche A-C und einer daraus gemittelten Kalibrierkurve D (n = 3).
Auf der Abszisse ist die Natriumnitrat-Konzentration (µM) und auf der Ordinate die Extinktion dargestellt (540 nm - 405 nm; Dual Wavelength). Die Datenpunkte der Graphen A–C wurden aus den arithmetischen Mitteln von drei technischen Replikaten berechnet. Die Datenpunkte des Graphen D stellten die gemittelten Messwerte der drei unabhängig angesetzten Verdünnungsreihen A–C dar. Die Standardabweichung der Messwerte ist als Streumaß abgebildet. Der Verlauf durch die Messpunkte wurde durch eine polynomiale Regressionskurve 4. Grades angenähert. Zu erkennen war eine positive Korrelation der Extinktion in Abhängigkeit von der steigenden Natriumnitrat-Konzentration der Standardreihe.

(R^2 = Bestimmtheitsmaß)

3.2.3 Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien ohne und nach Stimulation der Zellkulturen mit Acetylcholin (ACh), Carbachol und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α)

In dem folgenden Kapitel wird die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Zellkulturüberständen aufgezeigt. Die konditionierten Zellkulturüberstände ohne Stimulation dienen dabei als NK und zeigten die Basalkonzentration des produzierten NOs in HUVEC auf. Die konditionierten Zellkulturüberstände nach Stimulation entsprachen konditionierten Medien nach Behandlung von HUVEC mit den Stimulationssubstanzen ACh, Carbachol und TNF-α. Bei dem Protokoll *Generierung von Zellkulturüberständen* (s. Kapitel 2.4.4) entfielen für diesen Versuchsaufbau Schritt 6 und 7.

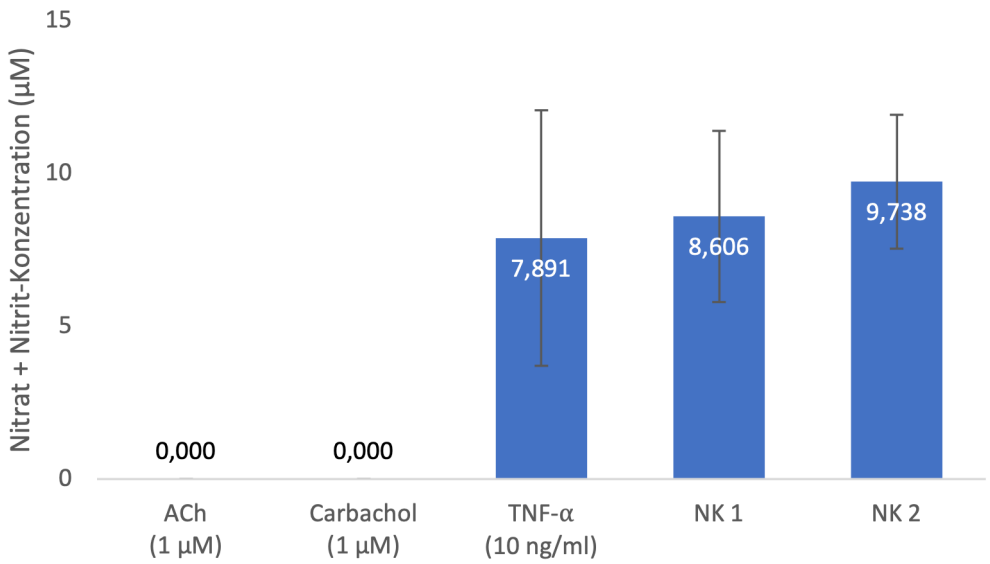


Abbildung 7: Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Zellkulturüberständen ohne Stimulation (entspricht NK) und nach Stimulation von HUVEC mit ACh, Carbachol und TNF-α.

Die Nitrat + Nitrit-Konzentration wurde jeweils aus den arithmetischen Mitteln von neun technischen Replikaten konditionierter Zellkulturüberstände ohne Stimulation (NK) und nach Stimulation mit den Substanzen ACh (1 µM), Carbachol (1 µM) und TNF-α (10 ng/ml) berechnet. Die Inkubationszeit für die Generierung der konditionierten Medien betrug für ACh und Carbachol 20–30 min und für TNF-α 20–24 h. Übereinstimmend dazu erfolgte das Ansetzen von zwei NK, wobei NK 1 für 20–30 min und NK 2 für 20–24 h mit reinem EC-Kulturmedium inkubierte. Die Standardabweichung der neun technischen Replikate ist als Streumaß in den Balkendiagrammen dargestellt.

(ACh = Acetylcholin; HUVEC = humane Umbilikalvenen-Endothelzellen; EC = Endothelzelle;
NK = Negativkontrolle, entspricht konditioniertem Zellkulturüberstand ohne Stimulation;
NK 1 = Inkubationszeit 20–30 min; NK 2 = Inkubationszeit 20–24 h; TNF-α = Tumornekrosefaktor-alpha)

Dieser Teilversuch lieferte einen Hinweis darauf, dass die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien in Teilen mittels der vorliegenden Methode möglich war (s. Abbildung 7). In konditionierten Zellkulturüberständen nach Stimulation mit ACh und Carbachol konnte kein Nitrat + Nitrit gemessen werden. Konträr dazu konnte Nitrat + Nitrit in den konditionierten Zellkulturüberständen ohne Stimulation (NK) und nach Stimulation mit TNF-α nachgewiesen werden. Die gemessenen Nitrat + Nitrit-Konzentrationen in den konditionierten Medien lagen jedoch im unteren Bereich der Natriumnitrat-Standardreihe. Zudem befanden sich die Werte nach Stimulation mit TNF-α im Bereich der NK. Ein Zusammenhang zwischen der Gesamtnitrit-Konzentration und der Kultivierung von HUVEC mit den verwendeten Stimulationssubstanzen konnte nicht beobachtet werden. Die vorliegenden Daten lassen keinen Rückschluss darauf zu, dass durch eine Stimulation mit den eingesetzten Substanzen eine erhöhte NO-Freisetzung in HUVEC-Zellkulturen erreicht werden kann.

Die Werte der neun technischen Replikate wiesen zudem eine hohe Standardabweichung auf, welche auf eine hohe Intra-Assay-Varianz der Methode schließen lässt. Aus diesem Grund kann eine Aussage über eine mögliche Abhängigkeit der gemessenen Gesamtnitrit-Konzentration von der Art der Stimulation der HUVEC nicht getroffen werden.
Zusammenfassend wies dieser Teilversuch daraufhin, dass die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration auch in konditionierten Medien mittels der Griess-Methode möglich war. Allerdings war kein eindeutiger Unterschied zwischen der gemessenen Gesamtnitrit-Konzentration in konditionierten Zellkulturüberständen ohne Stimulation (NK) und nach Stimulation der NO-Freisetzung mit den verwendeten Substanzen zu erkennen.

3.2.4 Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in gelösten Proben des Stickstoffmonoxid (NO)-Donors DEA NONOate

Die bisherigen Teilversuche zeigten die generelle Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration mittels Griess-Methode in der Standardreihe und in konditionierten Medien auf. Der weitere Fokus in der Methodenentwicklung lag in der Überprüfung, ob der NO-Nachweis über die Abbauprodukte Nitrat und Nitrit erfolgen konnte. Für diese Untersuchung erfolgte die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in gelösten Proben des NO-Donors DEA NONOate, welcher in Abwesenheit von Zellkulturen die Freisetzung von NO ermöglicht (s. Kapitel 2.4.3.4). Die Wiederfindungsrate der Nitrat + Nitrit-Konzentration in drei Proben von DEA NONOate mit definierten Ausgangskonzentrationen ließ weitere Rückschlüsse über die Zuverlässigkeit der Methode zu. Die gelösten Proben von DEA NONOate wurden als Positivkontrolle definiert.

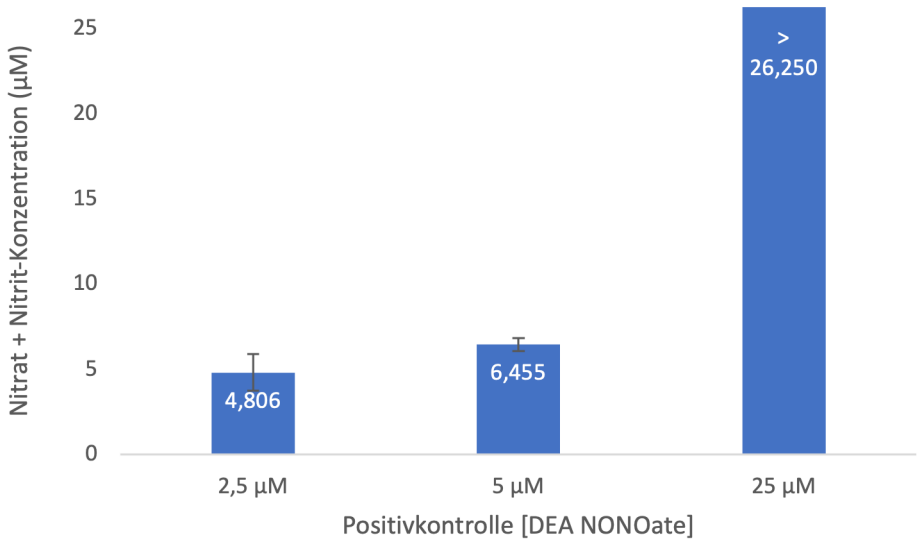


Abbildung 8: Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in drei gelösten Proben des NO-Donors DEA NONOate mit definierten Ausgangskonzentrationen (entspricht der Positivkontrolle).

Die Nitrat + Nitrit-Konzentration wurde jeweils aus den arithmetischen Mitteln von drei technischen Replikaten der Positivkontrolle [DEA NONOate] der Ausgangskonzentrationen 2,5 µM, 5 µM und 25 µM berechnet. 1 Mol DEA NONOate setzt dabei 1,5 Mol NO frei. Die Standardabweichung der drei technischen Replikate ist als Streumaß in den Balkendiagrammen dargestellt.

(DEA NONOate = Diethylammonium (Z)-1-(N,N-diethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate; NO = Stickstoffmonoxid; > 26,25 µM = Die Messwerte lagen außerhalb des kalibrierten Standardbereichs)

In diesem Teilversuch konnten folgende Wiederfindungsraten für NO nachgewiesen werden, welche aus dem prozentualen Anteil der gemessenen Nitrat + Nitrit-Konzentration aus der jeweiligen Ausgangskonzentration DEA NONOate berechnet wurden: 128,2% bei einer Ausgangskonzentration von 2,5 µM DEA NONOate und 86,1% bei einer Ausgangskonzentration von 5 µM DEA NONOate. Für die höchste Ausgangskonzentration von DEA NONOate lagen die Messwerte mit > 26,25 µM außerhalb des kalibrierten Standardbereichs. Berücksichtigt man die gemessenen Werte der beiden niedrigeren Ausgangskonzentrationen kann eine Nitrat + Nitrit-Konzentration zwischen 30 µM und 50 µM bei einer Ausgangskonzentration von 25 µM DEA NONOate erwartet werden. Dieser Teilversuch ließ Rückschlüsse darauf zu, dass freigesetztes NO über die stabilen Abbauprodukte Nitrat + Nitrit in erwartbaren Konzentrationen gemessen werden konnte. Hierbei konnte das freigesetzte NO bei einer Ausgangskonzentration von 5 µM DEA NONOate nahezu vollständig wiedergefunden werden. Bei der Ausgangskonzentration von 2,5 µM DEA NONOate konnte ein leichter positiver Überschuss erfasst werden.

3.2.5 Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien nach der Präinkubation der Zellkulturen mit Krebs-Henseleit (KH)-Arbeitslösung

In den bisherigen Teilversuchen wurden die Stimulationssubstanzen in EC-Kulturmedium angesetzt. In einem neuen Versuchsaufbau wurde untersucht, ob das EC-Kulturmedium als Störfaktor fungierte und die gemessene Nitrat + Nitrit-Konzentration in den konditionierten Zellkulturüberständen beeinflusste. In dem nachfolgenden Versuchsaufbau wurde das EC-Kulturmedium deshalb durch KH-Arbeitslösung ersetzt (s. Kapitel 2.4.3.3). Zuvor wurden die Zellkulturen mit KH-Arbeitslösung präinkubiert (s. Kapitel 2.4.4).

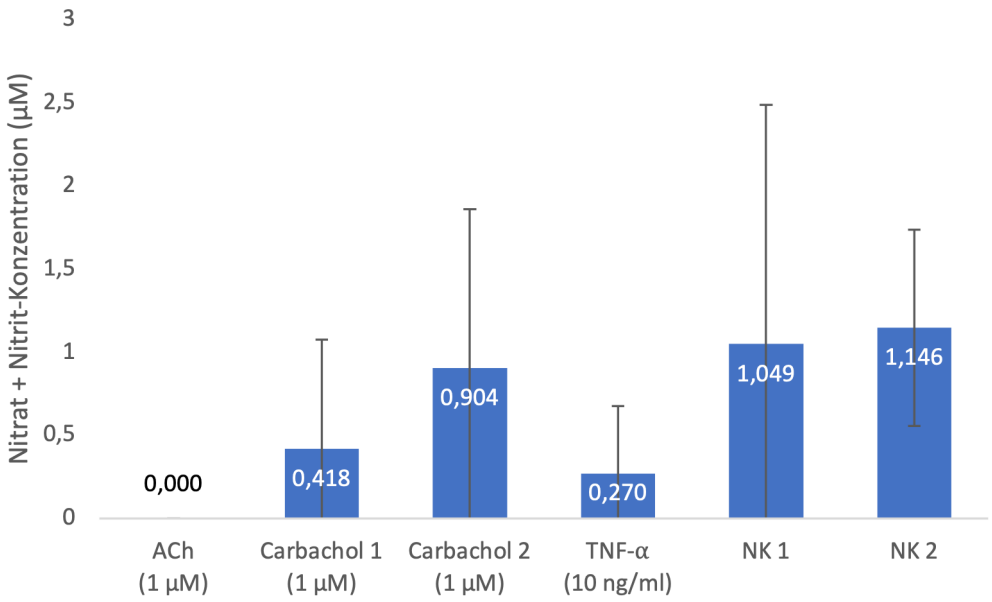


Abbildung 9: Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Zellkulturüberständen nach Präinkubation von HUVEC mit KH-Arbeitslösung.

Die Nitrat + Nitrit-Konzentration wurde jeweils aus den arithmetischen Mitteln von neun technischen Replikaten konditionierter Zellkulturüberstände ohne Stimulation (NK) und nach Stimulation mit ACh (1µM), Carbachol (1µM) und TNF-α (10 ng/ml) berechnet. Die Durchführung der Assay-Methode und die Präinkubation der Zellkulturen erfolgte anstatt in EC-Kulturmedium in KH-Arbeitslösung. Die Inkubationszeit der Stimulationssubstanzen ACh und Carbachol 1 betrug 20–30 min, die Inkubationszeit von TNF-α und Carbachol 2 betrug 20–24 h. Übereinstimmend dazu erfolgte das Ansetzen von zwei NK, wobei NK 1 für 20–30 min und NK 2 für 20–24 h mit reiner KH-Arbeitslösung inkubierte. Die Standardabweichung der neun technischen Replikate ist als Streumaß in den Balkendiagrammen dargestellt.

(ACh = Acetylcholin; Carbachol 1 = Inkubationsdauer 20–30 min; Carbachol 2 = Inkubationsdauer 20–24 h;
EC = Endothelzelle; HUVEC = humane Umbilikalvenen-Endothelzellen; KH = Krebs-Henseleit;
NK = Negativkontrolle, entspricht konditioniertem Zellkulturüberstand ohne Stimulation;
NK 1 = Inkubationszeit 20–30 min; NK 2 = Inkubationszeit 20–24 h; TNF-α = Tumornekrosefaktor-alpha)

Die gemessenen Nitrat + Nitrit-Konzentrationen der NK lagen über den gemessenen Konzentrationswerten der konditionierten Zellkulturüberstände nach Stimulation. Die höchste Nitrat + Nitrit-Konzentration der konditionierten Zellkulturüberstände nach Stimulation ergab sich für die Probe Carbachol 2 (Inkubationszeit 20–24h). Die niedrigste gemessene Nitrat + Nitrit-Konzentration lag bei 0 µM nach Stimulation von HUVEC mit ACh. Auffallend war, dass sich die Messwerte bei diesem Teilversuch in einem niedrigeren Konzentrationsbereich befanden im Vergleich zu der Messung ohne Verwendung von KH-Arbeitslösung. Die Werte deckten in dem hier dargelegten Versuchsaufbau einen Wertebereich von 0 µM bis 1,146 µM ab. Mit der Verwendung von EC-Kulturmedium zur Durchführung der Methode konnte ein Messbereich bis ca. 10 µM erzielt werden (s. Abbildung 7). Des Weiteren zeigten sich auch für die generierten Daten dieses Teilversuchs hohe Standardabweichungen. Ebenso wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, lässt sich dadurch keine Aussage über einen Zusammenhang zwischen der Stimulation von HUVEC-Zellkulturen und der NO-Freisetzung treffen. Da die Verwendung von KH-Arbeitslösung kein Indiz für eine verwertbare Steigerung der Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien lieferte, wurde dieser Versuchsaufbau nicht weiterverfolgt.

3.2.6 Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien nach Behandlung der Zellkulturen mit dem Stickstoffmonoxid (NO)-Donor DEA NONOate

Die bisherigen Teilversuche lieferten keinen Anhaltspunkt für einen Zusammenhang zwischen der gemessenen Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Zellkulturüberständen ohne und nach Stimulation der NO-Freisetzung. Eine weitere Erklärung für diese Beobachtung könnte das mögliche Abfangen des produzierten NOs nach Stimulation durch die Zellen selbst sein. In diesem Fall würde die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration keine ausreichend hohen Werte liefern. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in dem folgenden Teilversuch HUVEC mit DEA NONOate behandelt. Die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration erfolgte in dem generierten konditionierten Zellkulturüberstand. Zusätzlich wurde die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in gelösten Proben des NO-Donors DEA NONOate vorgenommen, welcher als Positivkontrolle in den Versuchsaufbau integriert wurde (s. Kapitel 2.4.3.4).

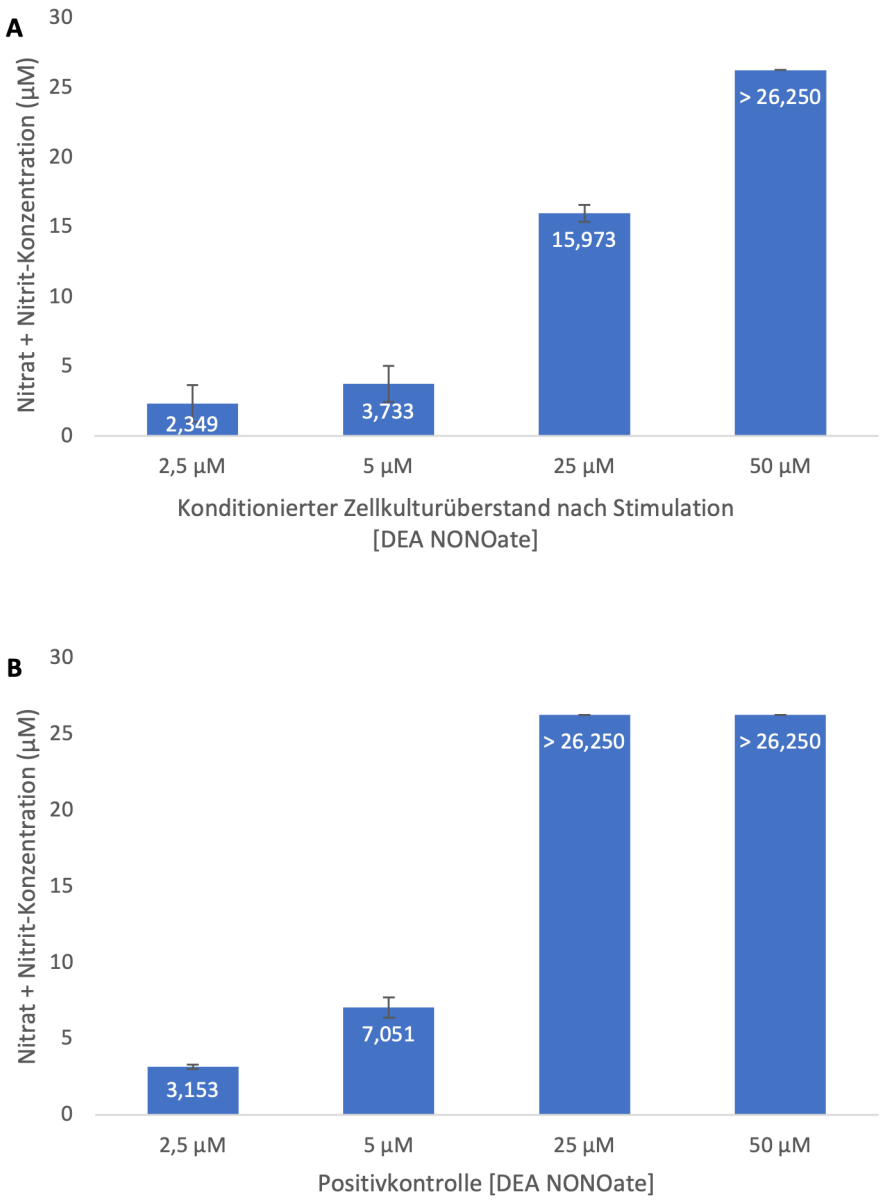


Abbildung 10: Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Zellkulturüberständen nach Behandlung von HUVEC mit DEA NONOate (A) und in gelösten Proben des NO-Donors DEA NONOate (entspricht der Positivkontrolle, B).

A: Die Nitrat + Nitrit-Konzentration wurde jeweils aus den arithmetischen Mitteln von sechs technischen Replikaten konditionierter Zellkulturüberstände nach Stimulation von HUVEC mit DEA NONOate der Ausgangskonzentrationen 2,5 µM, 5 µM, 25 µM und 50 µM berechnet. Die Standardabweichung der sechs technischen Replikate ist als Streumaß in den Balkendiagrammen dargestellt.

B: Die Nitrat + Nitrit-Konzentration wurde jeweils aus den arithmetischen Mitteln von drei technischen Replikaten der Positivkontrolle [DEA NONOate] der Ausgangskonzentrationen 2,5 µM, 5 µM, 25 µM und 50 µM berechnet.
Die Standardabweichung der drei technischen Replikate ist als Streumaß in den Balkendiagrammen dargestellt.

(DEA NONOate = Diethylammonium (Z)-1-(N,N-diethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate;
HUVEC = humane Umbilikalvenen-Endothelzellen; NO = Stickstoffmonoxid;
> 26,25 µM = Die Messwerte lagen außerhalb des kalibrierten Standardbereichs)

Sowohl in den konditionierten Zellkulturüberständen nach Behandlung von HUVEC mit DEA NONOate als auch in Proben der Positivkontrolle konnte das freigesetzte NO als Nitrat + Nitrit wiedergefunden werden (s. Abbildung 10). Hierbei lagen die Wiederfindungsraten von NO der Positivkontrolle über denen der konditionierten Zellkulturüberstände (s. Tabelle 21). Die Werte der Positivkontrolle betrugen ebenso wie in Kapitel 3.2.4 annähernd 100% und zeigten, dass das freigesetzte NO nahezu vollständig über die Abbauprodukte Nitrat + Nitrit wiedergefunden werden konnte. Die Werte der konditionierten Zellkulturüberstände lagen etwa bei 50%, hier konnte nur ungefähr die Hälfte des freigesetzten NOs als Nitrat + Nitrit gemessen werden. Für die gemessenen Nitrat + Nitrit-Konzentrationen, welche außerhalb des kalibrierten Standardbereichs lagen, konnte die exakte Wiederfindungsrate nicht berechnet werden.

Tabelle 21: Wiederfindungsrate von NO als Nitrat + Nitrit-Konzentration aus Probenmaterial des NO-Donors DEA NONOate.

Die Wiederfindungsrate von NO berechnete sich als prozentualer Anteil der jeweiligen Nitrat + Nitrit-Konzentration aus den vier Ausgangskonzentrationen des NO-Donors DEA NONOate (s. Abbildung 10). Das Probenmaterial bildeten konditionierter Zellkulturüberstand nach Behandlung von HUVEC mit DEA NONOate und gelöste Proben von DEA NONOate (entsprechen der Positivkontrolle). Die Werte für die Wiederfindungsraten von NO der Positivkontrollen lagen höher als die Werte der konditionierten Zellkulturüberstände.

(DEA NONOate = Diethylammonium (Z)-1-(N,N-diethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate;
HUVEC = humane Umbilikalvenen-Endothelzellen; NO = Stickstoffmonoxid)

Probenmaterial	Ausgangskonzentration DEA NONOate (µM)	Wiederfindungsrate von NO (%)
Konditionierter Zellkulturüberstand	2,5	62,6
Konditionierter Zellkulturüberstand	5	49,8
Konditionierter Zellkulturüberstand	25	42,6
Positivkontrolle	2,5	84,1
Positivkontrolle	5	94,0

Die Daten dieses Teilversuchs lieferten neue wichtige Erkenntnisse über den Nachweis von NO in konditionierten Medien. Im Vergleich zu den vorherigen Nitrat + Nitrit-Messungen in konditionierten Zellkulturüberständen konnte nach der Behandlung von HUVEC mit DEA NONOate erwartbare hohe Nitrat + Nitrit-Konzentrationen gemessen werden. Hierbei

konnte eine positive Korrelation zwischen dem als Nitrit gemessenen NO und der eingesetzten Ausgangskonzentration von DEA NONOate beobachtet werden. Die vorliegenden Daten lieferten einen Hinweis dafür, dass in etwa die Hälfte des freigesetzten NOs von den Zellen nach der Behandlung mit DEA NONOate gebunden wurde. Dies zeigte sich an den geringeren Wiederfindungsraten für NO, da die Werte für die gemessenen Nitrat + Nitrit-Konzentrationen unterhalb der Ausgangskonzentrationen von DEA NONOate lagen. Die Ergebnisse geben Anlass zur Überlegung, ob das freigesetzte NO in konditionierten Medien nach Stimulation mit ACh, Carbachol und TNF-α ebenfalls zum Teil abgefangen wird und damit das verbliebene NO unterhalb der Nachweisgrenze des Assays liegt.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Hauptziel der vorliegenden Dissertation stellte die Entwicklung eines Testsystems zur biologischen Funktionsprüfung von AT 1-7 dar. Darüber hinaus war ein weiteres Ziel die Differenzierung zwischen AT 1-7 und potenziellen Peptidfragmenten mithilfe des Testsystems. In diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass mittels des entwickelten enzymbasierten Testsystems ein Vergleich der biologischen Aktivitäten von Angiotensinen möglich war. Dieser Vergleich erfolgte über einen Nachweis der inhibitorischen Wirkung der Angiotensine auf ACE2 anhand einer Abnahme der initialen Steigung des Fluoreszenzsignals. Darüber hinaus konnte mit dem enzymbasierten Testsystem ein signifikanter Unterschied zwischen AT 1-7 und dem Großteil der restlichen Peptidfragmente (AT 1-5, AT 2-6, AT 3-7) hinsichtlich der Hemmwirkung auf ACE2 festgestellt werden.
Ein weiteres zellbasiertes Testsystem lieferte Hinweise darauf, dass mittels Griess-Methode die Messung der Nitrat + Nitrit-Konzentration nach vorheriger Reduktion von Nitrat durch das Enzym Nitratreduktase erfolgen konnte. Darüber hinaus enthielt das verwendete EC-Kulturmedium keinen gravierenden Störfaktoren, welcher zu einer Inhibition der Griess-Reaktion führte. Die vorliegenden Daten lieferten außerdem ein Indiz dafür, dass die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in bekannten Probenkonzentrationen des NO-Donors DEA NONOate möglich war. Aufgrund der nicht fertig entwickelten Methode konnte mit diesem Testsystem bisher keine serielle Versuchsreihe von AT 1-7 und seinen Peptidfragmenten erfolgen. Da die Entwicklung des vorliegenden zellbasierten Testsystems parallel zu weiteren Testsystemen erfolgte, wurde sich aus Gründen der Komplexität dieses Assays gegen die weitere Fortentwicklung entschieden.

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Dissertation ein funktionierendes Testsystem zur Messung der biologischen Aktivität von AT 1-7 auf. Die zu Beginn genannten Anforderungen an das Testsystem werden im Folgenden beleuchtet. In der nachstehenden Diskussion erfolgt eine separate Einordnung der beiden Testsysteme in den aktuellen Forschungsstand. Anschließend werden die zwei Testsysteme anhand folgender Testkriterien beurteilt: *Reproduzierbarkeit der Daten*, *Handhabung des Assays*, *universelle Durchführbarkeit in Standardlaboren* und *Ökonomie der Methode*.

4.2 Enzymbasierter Assay: *Hemmung der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 durch Angiotensine*

Zusätzlich zu den genannten vier Testkriterien unterlagen die beiden Testsysteme zwei weiteren Anforderungen. Durch den späteren Vernebelungsprozess war es von Bedeutung, ob die Formulierung von AT 1-7 in der gesamten Aminosäuresequenz am Zielort angelangt oder ob bei dem Prozess Peptidfragmente von AT 1-7 entstehen. Im Folgenden liegt deshalb der Fokus darauf, inwieweit sich die Effekte und Wirkungsmechanismen von AT 1-7 von denen möglicher Peptidfragmente unterscheiden. Zudem sollten die Testsysteme in einer späteren Versuchsreihe hinsichtlich des Aspekts untersucht werden, ob die biologische Wirksamkeit von AT 1-7 trotz der Anwesenheit von möglicherweise störenden Hilfsmitteln in der vernebelten Formulierung weiterhin nachgewiesen werden kann.

4.2.1 Unterschiede in der inhibitorischen Wirkung der Angiotensine auf die Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) und ACE2

Wie einleitend aufgeführt beschäftigten sich bereits Paula et al. mit der inhibitorischen Wirkung von Angiotensinen auf das Enzym ACE [92]. In dieser Studie zeigte sich folgende Reihenfolge der Hemmwirkung auf die ACE-Aktivität, beginnend mit der stärksten inhibitorischen Wirkung: AT 2-7 ≥ AT 3-7 > AT 1-7 >> AT 1-5 > AT 4-7 ≥ AT 1-6 [92]. Im direkten Vergleich mit den hier in der Dissertation erzielten Ergebnissen konnten Paula et al. für AT 3-7 eine stärkere inhibitorische Hemmwirkung auf die ACE-Aktivität als für AT 1-7 beobachten. Hinsichtlich des inhibitorischen Effekts auf die ACE2-Aktivität zeigten die vorgelegten Ergebnisse jedoch, dass die Hemmwirkung von AT 3-7 geringer war als die Hemmwirkung von AT 1-7. Im Gegensatz dazu konnte für AT 1-6 im Vergleich zu den anderen getesteten Angiotensinen die geringste inhibitorische Wirkung auf die ACE-Aktivität aufzeigt werden [92]. Die vorliegende Dissertation wies für AT 1-6 dagegen eine stärkere inhibitorische Wirkung auf die ACE2-Aktivität nach als für AT 3-7 und AT 1-5. Darüber hinaus konnte mittels des enzymbasierten Assays in den meisten Kombinationen aus Substrat- und Peptid-Konzentration kein signifikanter Unterschied zwischen AT 1-7 und AT 1-6 nachgewiesen werden. In der Studie von Paula et al. wurden AT 1-7 und die einzelnen Peptidfragmente zwar nicht hinsichtlich eines statistisch signifikanten Unterschieds analysiert. Jedoch lag der Wert für die mittlere inhibitorische

Konzentration (IC_{50}) von AT 1-6 mit > 100 µM deutlich über dem Wert von AT 1-7 mit 2,92 µM [92]. Daraus kann man schlussfolgern, dass zwischen AT 1-7 und AT 1-6 hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung auf ACE ein Unterschied zugunsten von AT 1-7 besteht. Dieser Unterschied konnte in unserer Versuchsreihe mit dem Enzym ACE2 nicht bestätigt werden.

Paula et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Carboxy-terminalen Fragmente von AT 1-7 (AT 2-7 und AT 3-7) eine deutlich stärkere Hemmaktivität auf ACE aufweisen als AT 1-7 selbst [92]. Dieses Ergebnis ist nicht auf unsere Erkenntnisse übertragbar, da sowohl ein Carboxy-terminales Fragment (AT 2-7) als auch ein Amino-terminales Fragment (AT 1-6) eine größere inhibitorische Wirkung im Vergleich zu den anderen Peptidfragmenten (AT 1-5, AT 2-6, AT 3-7) besaßen. Eine Hypothese für diesen Unterschied könnte die Verwendung zweier verschiedener Enzyme darstellen. Obwohl ACE2 homolog zu ACE ist [119], weist die katalytische Domäne von ACE2 mit den beiden katalytischen Domänen von ACE eine Identität von nur 42% auf [23]. Die unvollständige Übereinstimmung der Domänen könnte eine Begründung darstellen, weshalb sich die Angiotensine in ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Enzyme ACE und ACE2 unterscheiden. Diese Hypothese kann damit unterstrichen werden, dass auch klassische ACE-Inhibitoren wie Captopril, Lisinopril, oder Enalaprilat keine Hemmung auf die Aktivität von ACE2 zeigen [119]. Die Hemmwirkung diverser Moleküle auf ACE scheint also nicht vollständig auf das homologe Enzym ACE2 übertragbar zu sein.

4.2.2 Gegenüberstellung der Angiotensin (AT) 1-7- und AT 1-6-vermittelten Effekte

In den vorgetragenen Ergebnissen war das Peptidfragment AT 1-6 das Angiotensin, bei welchem überwiegend kein signifikanter Unterschied zu AT 1-7 nachgewiesen werden konnte. Eine Ausnahme stellte nur die Kombination aus *Peptid-Konzentration 10 µM* und *Substrat-Konzentration 0,71 µM* dar. Daher stellt sich die Frage, ob die beiden Angiotensine vergleichbare biologische Effekte aufweisen. Die nachfolgende Studie konnte analoge Wirkungen für AT 1-7 und AT 1-6 aufzeigen, welche sich in einer schwachen blutdrucksteigernden Wirkung sowie einem hemmenden Effekt auf die Reninfreisetzung äußerten [62]. Ebenso vermochten beide Angiotensine in dieser in vivo-Versuchsreihe keinen Anstieg des Plasmaspiegels von Aldosteron zu erzielen [62]. Des Weiteren konnte

beobachtet werden, das beide Angiotensine keine Stimulierung mit nachfolgender Phosphorylierung der Prokinase B initiierten [104]. Ein Erklärungsmodell für das analoge Wirkungsverhalten könnte die Strukturähnlichkeit der beiden Angiotensine darstellen, da sich AT 1-6 von AT 1-7 lediglich durch das Fehlen der Aminosäure Prolin an Position 7 unterscheidet [79, 124]. Möglicherweise spielt die Aminosäure Prolin am Ende der Peptidsequenz eine untergeordnete Rolle bei der Bindung an ACE2. Dies könnte die vergleichbare inhibitorische Wirkung von AT 1-7 und AT 1-6 auf ACE2 in der gezeigten Versuchsreihe des enzymbasierten Testsystems dieser Dissertation erklären.

Demgegenüber stehen jedoch die Ergebnisse von Paula et al., welche entgegengesetzte Wirkungen für AT 1-7 und AT 1-6 darlegen konnten [92]. In dieser Studie zeigten die beiden Angiotensine konträre Effekte auf Bradykinin und ACE. Während AT 1-7 die blutdrucksenkende Wirkung von Bradykinin verstärkte, konnte für AT 1-6 dieser Effekt nicht gezeigt werden. Ebenfalls konnte für AT 1-7 eine stärkere inhibitorische Wirkung auf ACE beobachtet werden, ersichtlich an dem bereits aufgeführtem niedrigeren IC_{50}-Wert. Paula et al. erklärten das Fehlen von Prolin am Carboxy-terminalen Ende von AT 1-7 ursächlich für die unterschiedliche Wirkung der Angiotensine auf Bradykinin [92]. Diese Schlussfolgerung steht im Gegensatz zu der oben genannten Hypothese der Strukturähnlichkeit der beiden Angiotensine. Als weiteres Erklärungsmodell für die unterschiedlichen Effekte von AT 1-7 und AT 1-6 führten Paula et al. verschiedene Rezeptorwege auf, unter Berücksichtigung eines spezifischen AT 1-7-Rezeptors [92]. Diese Annahme wird dadurch unterstrichen, das die genannten analogen Effekte der beiden Angiotensine vermutlich in beiden Fällen durch AT2R vermittelt werden [62].

Bei dem direkten Vergleich zwischen den Ergebnissen dieser Dissertation und den genannten Studien müssen jedoch die unterschiedlichen Methoden bedacht werden, da diese zum Teil auf in vivo-Modellsystemen beruhten [62, 92]. Demgegenüber resultierten die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation aus einer reinen in vitro-Methode. Auch die Studie von Rölz et al. basierte auf einer alternativen Methode, da hier die Effekte anhand von Zellkulturen mit Mesangialzellen untersucht wurden [104]. Eine Übertragung der Ergebnisse dieser Dissertation ist aus diesem Grund nur bedingt möglich. Zum anderen

scheinen die Effekte der einzelnen Angiotensine von dem Rezeptorweg abzuhängen, welcher die Bindung an AT2R oder an einen spezifischen AT 1-7-Rezeptor umfasst [62, 92].

4.2.3 Gegenüberstellung der Angiotensin (AT) 1-7- und AT 2-7-vermittelten Effekte

Von zentraler Bedeutung ist ebenso das Peptidfragment AT 2-7, da es in den erzielten Ergebnissen dieser Arbeit die stärkste Hemmwirkung auf ACE2 aufwies. Diese Daten stützen die Erkenntnisse der bereits aufgeführten Studie von Paula et al., welche sich mit der inhibitorischen Wirkung von Angiotensinen auf das Enzym ACE befasste [92]. Hier konnte für AT 2-7 im Vergleich zu AT 1-7 bzw. den anderen Peptidfragmenten ebenfalls die stärkste Hemmaktivität auf ACE nachgewiesen werden [92]. Des Weiteren konnte für AT 2-7 ebenfalls in den meisten Kombinationsmöglichkeiten kein statistisch signifikanter Unterschied zu AT 1-7 hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung auf die ACE2-Aktivität beobachtet werden.

Konträr dazu wurde in einer weiteren Studie nachgewiesen, dass die Wirkung von AT 2-7 der Wirkung von AT 1-7 unterlegen war [61]. So konnte für AT 2-7 zwar eine schwache vasopressorische Wirkung beobachtet werden, diese war jedoch geringer ausgeprägt als der AT 1-7-vermittelte Effekt auf den Blutdruck [61]. Ferner zeigte AT 2-7 einen schwächeren Effekt auf die blutdrucksenkende Wirkung von Bradykinin im Vergleich zu AT 1-7 [92]. Beide Studien begründen die verschiedenen Effekte von AT 2-7 und AT 1-7 in der unterschiedlichen Aminosäuresequenz [61, 92]. Es erscheint möglich, dass ein Fehlen der Aminosäure Asparagin zu einer verminderten Wirkung von AT 2-7 beiträgt [61].

Auch bei der Gegenüberstellung dieser beiden Angiotensine müssen die unterschiedlichen Versuchsbedingungen bedacht werden, im Expliziten das abweichende in vivo-Modellsystem der aufgeführten Studien [61, 92]. Inwieweit es nun von Bedeutung ist, ob die vernebelte Formulierung von AT 1-7 in seiner vollständigen Peptidsequenz am Zielort angelangt, lässt sich nicht abschließend beurteilen. Eine finale Gegenüberstellung der Effekte von einzelnen Angiotensinen ist aufgrund der Komplexität des RAS nicht zielführend. Die dargelegte Literaturrecherche zu den einzelnen Peptidfragmenten zeigt jedoch die bedeutende Individualität der einzelnen Angiotensine auf.

4.2.4 Enzymbasierter Assay als Testsystem für den Funktionsnachweis vernebelter Angiotensin-Lösungen

Die inhibitorische Wirkung von Angiotensinen auf die ACE2-Aktivität stellte sich als geeigneter Ansatz heraus, um die biologischen Aktivitäten von AT 1-7 und potenziellen Peptidfragmenten zu vergleichen. Wie bereits erwähnt musste das Testsystem darüber hinaus auch im Hinblick auf eine angestrebte vernebelte Formulierung von AT 1-7 bewertet werden. Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse konnten zeigen, dass die Hemmwirkung der Angiotensine von der eingesetzten Peptid-Konzentration abhängig war. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die eingesetzte Peptid-Konzentration einer vernebelten Angiotensin-Formulierung bekannt sein muss, um deren biologische Aktivität differenziert beurteilen zu können. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit der Vernebelungsprozess die Peptid-Konzentration der einzelnen Angiotensine beeinflusst.

Die Vernebelung bzw. topische Applikation von Medikamenten hat besonders in der Behandlung von Lungenerkrankungen eine große Relevanz [69]. Die Vorteile sind eine hohe Konzentration am Zielort bei geringeren systemischen Nebenwirkungen [98]. Aus diesem Grund sollte in dem Projekt *STAMINA-Cov19* eine inhalierbare Lösung von AT 1-7 als Therapie gegen eine SARS-CoV-2 Infektion untersucht werden [12]. Für die Beurteilbarkeit des enzymbasierten Testsystems ist die Konzentration der Angiotensine nach dem Vorgang der Vernebelung von Bedeutung. Die gemessenen prozentualen Ablagerungsraten von Medikamenten bzw. Partikeln in der Alveolarmembran zeigten verschiedenen Studien nach mit 40% [16] und 85% [93] große Unterschiede. Eine mögliche Begründung hierfür könnte im Vernebelungssystem und -prozess selbst liegen, da diese Applikationsform zur Produktion inkonstanter Konzentrationen von Medikamenten beiträgt [90]. Diese Hypothese würde eine präzise Messung der biologischen Aktivität von AT 1-7 bzw. seiner Peptidfragmente am Ende der Vernebelung durch das enzymbasierte Testsystem erschweren.

Weitere mögliche Methoden zur Bestimmung der Angiotensin-Konzentration nach dem Vernebelungsprozess

Das Potenzial für die Verabreichung von Arzneimitteln durch ein Vernebelungssystem konnte bereits gezeigt werden [16]. Die größte Schwierigkeit für die weitere Entwicklung

des enzymbasierten Testsystems zur Messung der inhibitorischen Wirkung vernebelter Angiotensin-Formulierungen liegt darin, die Peptid-Konzentration nach dem Prozess der Vernebelung zu kennen. Hierbei muss eine weitere Methode zum Einsatz kommen, um die tatsächliche Peptid-Konzentration nach dem Vernebelungsprozess zu bestimmen.

Eine Übersichtsarbeit von Alvarez Dorta et al. beschäftigte sich mit verschiedenen Konjugations-Methoden der Aminosäure Tyrosin zur Proteinmarkierung [3]. Die Aminosäure Tyrosin steht an vierter Position von AT 1-7 [124] und hat somit den Vorteil, dass sie in allen verwendeten Peptidfragmenten dieser Dissertation für eine Proteinmarkierung zur Verfügung steht. Die Entwicklung einer Methode zur Markierung und Messung von Tyrosin würde einen Weg darstellen, die Peptid-Konzentration nach dem Vernebelungsprozess zu bestimmen.

Eine weitere Möglichkeit für die Ermittlung der Angiotensin-Konzentration ist die Messung von aromatischen Aminosäuren, welche bereits in mehreren Studien eine etablierte Methode darstellt [1, 36]. Die Messung der aromatischen Aminosäuren erfolgte in den genannten Studien mittels Fluoreszenz-Detektor [1] bzw. UV-Detektor [36]. Da in der Aminosäuresequenz von AT 1-7 bzw. seinen Peptidfragmenten lediglich die stark aromatische Aminosäure Tyrosin enthalten ist [124], würde sich die Bestimmung der Angiotensin-Konzentration auf die optische Detektion von Tyrosin beschränken. Tyrosin hat ein Absorptionsmaximum bei 270 nm und ein Absorptionsminimum bei 255 nm [135]. Das Emissionsmaximum für Tyrosin beträgt 304 nm [136]. Die Fluoreszenz- bzw. UV-Detektion von Tyrosin könnte ebenfalls neben der aufgeführten Konjugations-Methode von Tyrosin eine Möglichkeit zur Bestimmung der Angiotensin-Konzentration nach Vernebelung darstellen. Die aufgeführten Methoden haben das Potenzial zur weiteren Entwicklung des enzymbasierten Testsystems, um auch die biologische Aktivität einer vernebelten Angiotensin-Formulierung zu prüfen.

4.2.5 Methodenkritik

Stärken der Methode

Der enzymbasierte Assay stellt sich durch seine einfache Anwendung und die nachfolgende schnelle Messung als unkompliziertes Testsystem heraus. Die Fluoreszenzmessung erweist sich als pragmatische Messmethode, um die Detektion der Enzym-Substrat-Interaktion zu ermöglichen. Dadurch qualifiziert sich der vorliegende Assay für die universelle Durchführbarkeit in Standardlaboren, da bis auf das Fluoreszenzmessgerät keine spezifischen Gerätschaften oder Anforderungen an das Labor erfüllt sein müssen. Der Umgang mit dem Enzym erfordert eine gewisse Präzision und Technik, welche jedoch schnell erlernt werden kann. Aufgrund der einfachen Handhabung ist eine Fehleranfälligkeit gering. Des Weiteren garantiert der geringe Substanzverbrauch der verwendeten Reagenzien einen ökonomischen Standard.

Schwächen der Methode

Wie bereits aufgeführt war die enzymbasierte Methode von einer bekannten Peptid-Konzentration abhängig. Die vorliegende Methode eignet sich aus diesem Grund hauptsächlich für in Lösung gebrachte Formulierungen von bekannten Angiotensin-Konzentrationen. Inwieweit die Methode präzise Unterschiede von vernebelten Angiotensin-Formulierungen sicherstellt, muss in einer weiteren Versuchsreihe untersucht werden. Darüber hinaus konnte die entwickelte Methode in der Mehrzahl der Fälle keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen gelösten Formulierungen von AT 1-7 und den Peptiden AT 1-6 und AT 2-7 detektieren. Es stellt sich somit die Frage, ob dies auch auf vernebelte Formulierungen der Angiotensine zutrifft. Ein weiterer Ansatz mit dem Ziel, die Effekte der drei Angiotensine voneinander abgrenzen zu können, besteht in der Verwendung eines analogen Testsystems basierend auf ACE. Diese Überlegung beruht auf den oben diskutierten Ergebnissen von Paula et al., welche für AT 1-7 eine stärkere Hemmwirkung auf ACE nachweisen konnte als für AT 1-6 [92]. Vernebelte Formulierungen der Angiotensine könnten mittels zwei analogen Testsystemen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf ACE und ACE2 untersucht werden, um somit Unterschiede zwischen den biologischen Aktivitäten von AT 1-7 und AT 1-6 bzw. AT 2-7 präzise nachzuweisen.

Eine weitere Optimierung des enzymbasierten Assays ist die Integration einer Positivkontrolle in den Versuchsaufbau. Diese dient einer weiteren methodischen Validierung und stellt sicher, dass eine Hemmung von ACE2 mittels der vorliegenden Methode prinzipiell nachgewiesen werden kann. Zudem lässt sich darüber einen Ausgangswert für das Maß der ACE2-Hemmung bestimmen. Hierfür könnten ACE2-Inhibitoren eingesetzt werden, welche im pikomolaren Bereich entwickelt worden sind [19]. Mittels des Inhibitors MLN-4760 konnte beispielsweise die ACE2-Struktur im inhibierten Zustand dargestellt werden [121].

Qualitätsanalyse der Daten

Die dargestellte Versuchsreihe basierte auf drei Versuchswiederholungen (n = 3), welche jeweils Proben aus drei technischen Replikaten umfassten. Da die Messungen nach demselben Protokoll und unter möglichst gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, ist eine hohe Reproduzierbarkeit der Versuchsreihe gewährleistet. Die vorliegende Versuchsanzahl ist ausreichend, um das enzymbasierte Testsystem als genügend qualifiziert für eine weitere Entwicklung zu bewerten.

4.3 Zellbasierter Assay: *Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Medien mittels Griess-Methode*

Zu Beginn war eine weitere Anforderung an die Dissertation die Entwicklung zweier unterschiedlicher Methoden. Da das enzymbasierte Testsystem auf einer reinen in vitro-Methode beruht, sollte die biologische Wirksamkeit von AT 1-7 ebenso an einem lebenden System evaluiert werden. In vivo-Studien sind aufgrund von erhöhten methodischen Anforderungen komplex zu gestalten [94], weshalb die zweite Assay-Methode auf Grundlage eines Zellkultursystems als Alternative gewählt wurde.

4.3.1 Verwendung der Griess-Methode zur Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in Zellkulturüberständen

Die Griess-Reaktion wurde in vielen Arbeiten als grundlegende Methode für die Nitrat + Nitrit-Messung verwendet, auch wenn das Protokoll hinsichtlich des Reduktionsmittels für Nitrat, dem Verhältnis der Griess-Reagenzien und dem eingesetzten Probenmaterial einige Unterschiede aufwies [9, 42, 56, 58]. Im Gesamten wird die Griess-Methode jedoch als einfaches, schnelles und kostengünstiges Analyseverfahren beschrieben [82]. In den generierten Ergebnissen dieser Dissertation konnte mittels Griess-Methode eine ausreichende Wiederfindungsrate von NO in gelösten Proben des NO-Donors DEA NONOate gezeigt werden. Die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Zellkulturüberständen zeigte jedoch keine höhere NO-Produktion nach Stimulation von HUVEC mit den eingesetzten Substanzen. Ein Problem stellt das fehlende Wissen über den Konzentrationsbereich dar, in welchem sich die NO-Produktion der eingesetzten HUVEC befindet. Der kalibrierte Standardbereich der angewendeten Griess-Methode reichte von 0 µM bis 25 µM. Dieser Standardbereich könnte eine zu geringe Empfindlichkeit aufweisen, um Änderungen in der NO-Produktion in konditionierten Zellkulturüberständen zu detektieren. Im folgenden Abschnitt wird hierauf Bezug genommen und darüber hinaus eine Variante der Griess-Methode diskutiert, welche eine verbesserte Empfindlichkeit aufweist.

Vergleich der Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion durch Zellkultursysteme ohne und nach Stimulation

Für das Verständnis der Messung von NO in Zellkulturüberständen ist der Konzentrationsbereich relevant, in welchem sich die Basalkonzentration von NO und die Konzentration von NO nach Stimulation befinden. Tsukahara et al. konnten eine Basalkonzentration von NO im Zellkulturüberstand von HUVEC im Bereich von 104 nM bis 408 nM feststellen [122]. Auch Joshi et al. zeigten die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration im dreistelligen unteren nanomolaren Bereich auf [58]. Mittels eines kommerziellen Griess-Assay-Kits konnten hingegen Nitrat + Nitrit-Konzentrationen in Zellkulturüberständen ohne Stimulation in einem höheren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden (bis 1,3 µM) [77]. Der Literaturvergleich verdeutlicht die inkonsistenten Ergebnisse bei der Messung von NO bzw. der Abbauprodukte Nitrat + Nitrit. Eine Ursache für die uneinheitlichen Ergebnisse könnten die unterschiedlichen angewendeten Messmethoden darstellen [58, 77, 122]. Eine weitere Begründung könnte die Unbeständigkeit von Zellkulturen selbst sein, welche als lebendes Modell eine Abhängigkeit von der jeweiligen Kultivierung und den Versuchsbedingungen aufweisen [133]. Die in der Literatur eruierten Basalkonzentrationen von NO bzw. Nitrat + Nitrit im nanomolaren Bereich hinterfragen jedoch die Empfindlichkeit der in dieser Dissertation eingesetzten Methode [58, 122]. Da die NO-Freisetzung von HUVEC möglicherweise im nanomolaren Konzentrationsbereich liegt, könnte diese mit dem zugrundeliegenden zellbasierten Testsystem nicht detektiert werden.

Die aufgeführten Studien weisen die Gemeinsamkeit auf, dass der NO- bzw. Nitrat + Nitrit-Gehalt in Zellkulturüberständen nach Stimulation höher lag als in Zellkulturüberständen ohne Stimulation [58, 77, 122]. Die Stimulation der Zellen erfolgte hierbei unter anderem mit L-Arginin [58, 122] oder Zytokinen (z.B. TNF-α) [77]. In der hier gezeigten Versuchsreihe war dieses Resultat nicht zu beobachten, da die Nitrat + Nitrit-Konzentrationen in konditionierten Zellkulturüberständen ohne Stimulation höher lagen als in konditionierten Zellkulturüberständen nach Stimulation. Eine Hypothese für die generierten Daten stellt das mögliche Abfangen von NO durch die Zellen bei der Generierung konditionierter Zellkulturüberstände dar.

In der vorliegenden Dissertation dienten die Substanzen ACh, Carbachol und TNF-α der Steigerung der NO-Freisetzung durch HUVEC. Die dargelegten Teilversuche lieferten keinen Hinweis auf eine Steigerung der NO-Produktion durch die eingesetzten Substanzen. Dahingegen konnten Dymkowska et al. in einer Studie zeigen, das die Stimulation von immortalisierten HUVEC mit steigenden Konzentrationen von TNF-α zu einer signifikanten Erhöhung von NO führte [28]. Ebenso konnte mit der in vivo-Stimulation mit ACh der Konzentrationen 10 µM und 100 µM eine Steigerung der NO-Produktion erzielt werden [33]. Für die Stimulationssubstanz ACh konnte in dieser Dissertation jedoch kein Nitrat + Nitrit in konditionierten Zellkulturüberständen nach Stimulation gemessen werden. Im direkten Vergleich muss jedoch bedacht werden, dass die gewählte ACh-Konzentration in der vorliegenden Dissertation mit 1 µM geringer war. Die Konzentration von 1 µM ACh wurde nach einer Studie von Hoenicka et al. festgelegt, welche in Organbadversuchen die stärkste relaxierende Wirkung für diese Konzentration beobachten konnten [51]. Da Carbachol ein Strukturanalogon von ACh darstellt, wurde für diese Substanz ebenso die Konzentration von 1 µM eingesetzt. Die verwendete Konzentration von 10 ng/ml TNF-α basierte auf Daten von Dymkowska et al., welche eine signifikante NO-Freisetzung bei dieser Konzentration zeigen konnten [28]. Da sich die Methode der vorliegenden Arbeit jedoch von den Methoden der aufgeführten Studien unterscheidet [28, 33, 51], ist eine Übertragung der verwendeten Konzentrationen der Stimulationssubstanzen nur eingeschränkt geboten. Eine Überlegung für zukünftige Versuchsreihen stellt somit die Konzentrationserhöhung der eingesetzten Stimulationssubstanzen dar. Dies ist vor Allem vor dem Hintergrund zu erwägen, dass die hier angewendete Griess-Methode geringe Änderungen der NO-Freisetzung möglicherwiese nicht empfindlich genug detektieren kann.

Variation der Griess-Methode mittels Fließinjektionsanalyse (FIA)

Eine weitere Variante der Griess-Methode stellt der Versuchsaufbau mittels Fließinjektionsanalyse (FIA) dar [32, 108]. Mit dieser Methode konnte eine hohe Empfindlichkeit, eine hohe Reproduzierbarkeit und eine geringe Störanfälligkeit gezeigt werden [108]. Der Vorteil dieser Methode bot eine Detektion von Nitrit im Bereich von 2 nM für wässrige Proben und 8 nM für proteinhaltige Proben [108]. Der

Konzentrationsbereich der FIA-Variante deckt somit einen empfindlicheren Bereich ab als die hier in der Dissertation verwendete Variante der Griess-Methode.

Dem gegenüber steht jedoch das Ziel der Entwicklung eines einfachen und universellen Testsystems. Die FIA-Variante der Griess-Methode ist in ihrem Versuchsaufbau aufwändiger als die Methode im Mikrotiterplatten-Format und benötigt neben dem photometrischen Messgerät noch zusätzliche Instrumente [32, 108]. Das Verfahren erfordert beispielsweise eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Pumpe, welche die Griess-Reagenzien durch ein System befördert und mit den Proben in Kontakt bringt [108]. Es stellt sich somit die Frage, ob zugunsten einer empfindlicheren Messung von Nitrat + Nitrit eine aufwändigere Methode in Kauf genommen werden sollte. Zudem müssten beide Varianten hinsichtlich ihres ökonomischen Standards weiter miteinander verglichen werden.

4.3.2 Einfluss des Zellkulturmediums auf die Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration mittels Griess-Methode

Die eben diskutierte empfindlichere Messmethode bietet jedoch keinen Vorteil, wenn vom Kulturmedium selbst schon ein zu hoher Nitrat- bzw. Nitrit-Hintergrund ausgeht. Geringe Unterschiede der Nitrat + Nitrit-Konzentration in konditionierten Zellkulturüberständen ohne und nach Stimulation könnten aufgrund eines zu hohen Hintergrunds schlechter zu detektieren sein. Die genaue Zusammensetzung des in dieser Dissertation verwendeten Basismediums (Endothelial Cell Growth Medium von PromoCell, s. Kapitel 2.3.2) ist nicht bekannt, da es proprietären Herstellerbedingungen unterliegt [96]. Deswegen wird exemplarisch für die Untersuchung des Nitrat- bzw. Nitrit-Gehalts von Zellkulturmedium Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) als Standard-Kulturmedium herangezogen, welches ebenfalls zur Kultivierung von HUVEC eingesetzt wird [18, 28, 140]. DMEM entspricht einer modifizierten Version des ursprünglichen Eagle-Mediums mit einer vierfach höheren Konzentration an Vitaminen und Aminosäuren [27]. Laut Herstellerangaben enthält DMEM 0,0001 g/l Eisen(III)-Nitrat-Nonahydrat (entspricht umgerechnet 247,6 nM) [81]. Diese Zusammensetzung dient im Folgenden auch als Anhaltspunkt für den Nitrat-Gehalt in dem hier verwendeten EC-Kulturmedium. Wie die Zusammensetzung von DMEM zeigt, kann das Zellkulturmedium als ein weiterer Nitrat- bzw. Nitrit-Lieferant fungieren und somit zu einer Erhöhung des Hintergrunds beitragen.

Um diesen Hintergrund zu minimieren wurde in einem hier dargelegten Teilversuch das EC-Kulturmedium mit KH-Arbeitslösung ersetzt (s. Kapitel 3.2.5). Dieser Versuchsaufbau basierte auf der Methode von Joshi et al., bei welcher HUVEC mit KH-Lösung präinkubiert wurden [58]. KH-Lösung war ursprünglich als eine physiologische Salzlösung beschrieben worden, welche mit einem Gemisch aus Sauerstoff und anteilig 5% Kohlensäure begast wurde [63]. Krebs und Henseleit entwickelten diese Lösung, um die Harnstoffbildung in Gewebeschnitten zu untersuchen [63]. In späteren Arbeiten war KH-Lösung als Standard-Perfusionslösung für das Arbeiten mit Organbäder aufgeführt [5]. Bei der Suche nach einem Nitrat- bzw. Nitrit-freien Medium wurde KH-Lösung in der Literatur häufig angegeben [31, 73]. Die gemessenen Nitrat + Nitrit-Konzentrationen lagen bei diesem Teilversuch in einem niedrigeren Konzentrationsbereich als die Messungen, welche mit EC-Kulturmedium durchgeführt wurden (s. Kapitel 3.2.3). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die gemessene höhere Nitrat + Nitrit-Konzentration aus dem EC-Kulturmedium selbst stammt. Eine niedrigere NO-Produktion durch die Zellkulturen nach Präinkubation mit KH-Arbeitslösung ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Miranda et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass sich die Nitrat-Kalibrierkurven hergestellt in reinem Wasser, DMEM ohne fetales Kälberserum (FKS) und DMEM mit FKS nur unwesentlich voneinander unterschieden [82]. Das für die vorliegende Versuchsreihe verwendete EC-Kulturmedium enthielt ebenfalls 10% FKS als Zusatz, welches zur Anreicherung von Zellkulturmedien in der HUVEC-Kultivierung eingesetzt wird [18, 140]. Die hier generierten Daten und die Ergebnisse von Miranda et al. lieferten einen Hinweis darauf, dass die aufgeführten Zellkulturmedien und einzelne Bestandteile darin zu keiner Unterbindung der Griess-Reaktion führten [82]. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass sich die exakten Ausführungen der Griess-Methode unterscheiden. Im Allgemeinen wird die Verwendung eines einheitlichen Mediums zum Ansetzen der Standardreihe und zur Kultivierung der Zellkulturlinie empfohlen [82]. Diese Empfehlung wurde in der Versuchsreihe des zellbasierten Assays berücksichtigt, da sowohl das Ansetzen der Standardreihe als auch die Generierung der Proben jeweils mit demselben Medium durchgeführt wurden.

4.3.3 Einfluss des Zellkulturmediums auf die Kultivierung von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC)

Bereits diskutiert wurde der Einfluss des Zellkulturmediums auf das zugrunde liegende Analyseverfahren mittels Griess-Methode. Darüber hinaus ist auch eine Beeinflussung auf die Kultivierung von HUVEC und die damit verbundene NO-Produktion der Zellen vorstellbar. Das verwendete EC-Kulturmedium ist zwar laut Herstellerseite für die Kultivierung von HUVEC geeignet [2, 95, 96]. Eine Beeinträchtigung auf die NO-Produktion der HUVEC durch das Zellkulturmedium kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Hierzu gibt es eine Studie, welche die Auswirkungen verschiedener Zellkulturmedien auf den Phänotyp und das Verhalten von Endothelzellen beschreibt [13]. Im Folgenden wird der Einfluss verschiedener Bestandteile im Medium auf die NO-Produktion von Zellkulturen diskutiert.

Kawakami et al. konnten in einer Arbeit belegen, dass der Natriumbikarbonat-Gehalt des Zellkulturmediums die NO-Produktionsrate von aktivierten Makrophagen beeinflusste [60]. Ein höherer Natriumbikarbonat-Gehalt im Medium führt dabei zu einer gesteigerten Expression von iNOS und einer höheren NO-Produktionsrate. Palmer et al. konnten darüber hinaus zeigen, das kultivierte Endothelzellen die Aminosäure L-Arginin als Substrat für die Synthese von NO nutzten [86]. L-Arginin scheint in Kulturmedien die essentielle Aminosäure zu sein, damit Zellkulturen vermehrt Nitrat und Nitrit produzieren [56]. Dieses Ergebnis ließ sich auch nach einer Stimulation von HUVEC mit L-Arginin generieren, welche in einer erhöhten NO-Produktion der Zellen resultierte [122]. Des Weiteren konnten Joshi et al. nachweisen, dass Arginin unabhängig von der Funktion als Substrat die NO-Produktion in HUVEC anregte [58]. Die Erhöhung der NO-Freisetzung wird dabei durch Membranrezeptoren nach Bindung von Arginin vermittelt, welche in einer Aktivierung von eNOS mit nachfolgender NO-Produktion resultiert [58]. Die genannten Studien konnten belegen, dass die Steigerung der NO-Basalkonzentration mit der Erhöhung der L-Arginin-Konzentration positiv korrelierte [58, 122]. Wie bereits erläutert wird in dem verwendeten Basismedium der vorliegenden Arbeit die genaue Zusammensetzung und somit auch der Natriumbikarbonat- bzw. L-Arginin-Gehalt durch den Hersteller nicht angegeben [96]. Standard-Kulturmedium wie DMEM enthält 44 mM Natriumbikarbonat und 0,48 mM L-Arginin [81]. Zusammengefasst deuten die vorgetragenen Erkenntnisse daraufhin, dass

die NO-Produktion durch Zellkulturlinien von der Kultivierung und dem damit verwendeten Zellkulturmedium abhängt [56, 58, 60, 122]. Dieser Aspekt könnte im Rahmen einer weiteren Versuchsreihe genauer beleuchtet werden. Durch eine zusätzliche Anreicherung des EC-Kulturmediums mit L-Arginin oder Natriumbikarbonat könnte untersucht werden, ob sich die NO-Produktion durch HUVEC anregen lässt.

Eine wichtige Überlegung in diesem Kontext stellt die Signalsubstanz cGMP dar, welche durch die NO-induzierte Guanylatzyklase generiert wird [85]. Einige Studien konnten belegen, das cGMP eine regulatorische Wirkung auf den Zellzyklus hat und darüber hinaus hemmend auf das Zellwachstum wirkt [29, 54, 114]. Eine verminderte NO-Bildung durch Zellkulturen könnte durch die nachfolgende verminderte Bildung von cGMP somit eine höhere Wachstumsrate der Zellen ermöglichen. Vor diesem Hintergrund muss in Erwägung gezogen werden, dass die Zusammensetzung eines Zellkulturmediums eventuell auch darauf ausgerichtet ist, eine geringe NO-Produktion in Zellkulturen anzustreben.

4.3.4 Methodenkritik

Stärken der Methode

Die Stärken des zellbasierten Assays liegen in der Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration mittels Griess-Methode und somit in dem zweiten Abschnitt der Methode. Die Griess-Methode stellt sich als Messverfahren mit einer einfachen Handhabung und einer universellen Einsetzbarkeit in Standardlaboren heraus. Die Durchführung des Protokolls und die Bedienung der Messgeräte ist auch für weniger erfahrenes Laborpersonal praktikabel. Durch die kurzen Inkubationszeiten des Griess-Protokolls von insgesamt 45 min und die nachfolgende Messung mittels des Mikroplattenlesegeräts ist eine schnelle Implementierung des Assays möglich. Da die Durchführung des Assays im Mikrotiterplatten-Format erfolgt, kann die gleichzeitige Messung von 40 Proben in Doppelbestimmungen vorgenommen werden. Die genannten Vorteile ermöglichen deshalb die effiziente und unkomplizierte Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentration in mehreren Proben. Des Weiteren qualifiziert sich die Messmethode auch unter ökonomischen Gesichtspunkten. Da die Herstellung der benötigten Griess-Reagenzien eigens durchgeführt werden kann, ist dieses Messverfahren unabhängig von industriell erwerblichen Kit-Systemen. Dies bietet den Vorteil, dass die Reagenzien in größeren Mengen lieferbar sind und nach Ablauf der Haltbarkeit immer wieder neu angesetzt werden können.

Schwächen der Methode

Die Schwächen des zellbasierten Assays liegen in dem ersten Abschnitt der Methode, welcher die Stimulation von HUVEC und die Generierung von Zellkulturüberständen beinhaltet. Das Arbeiten mit Zellkulturen stellt eine Herausforderung dar, weshalb eine universelle Anwendung des zellbasierten Testsystems problematisch ist. Zum einen muss das Labor über umfangreiche Materialien verfügen, wie die Zellkulturbank und ein Inkubator. Zum anderen erfordert der Umgang mit Zellkulturen viel Erfahrung und bedeutet somit eine längere Einarbeitungszeit. Darüber hinaus unterliegt das Arbeiten mit Zellkulturen bestimmten Anforderungen und Sicherheitsstufen, welche das Labor erfüllen muss [11].

Eine weitere Schwäche der Methode stellt das Zellkultursystem selbst als lebendes Modell dar, da das Wachstum von Zellkulturlinien verschiedenen äußerlichen Bedingungen

unterliegt [89]. Aufgrund dessen ist die Reproduzierbarkeit der generierten Zellkulturüberstände unter gleichen Bedingungen zu diskutieren [133]. Da sich die Zellkulturen der vorliegenden Versuchsreihe bei der Generierung der Zellkulturüberstände zudem in unterschiedlichen Passagen befanden, ist eine einheitliche NO-Produktion durch die Zellen unter diesen Bedingungen infrage zu stellen. Um eine Vergleichbarkeit des Probenmaterials zu gewährleisten, müsste der finale Assay hinsichtlich den Kulturbedingungen detaillierten Qualitätsstandards unterliegen [133]. So sollte der generierte Zellkulturüberstand unter optimalen Voraussetzungen von HUVEC derselben Passage stammen und nach der derselben Anzahl an Wachstumstagen generiert werden [133]. Im gegebenen Rahmen der Methodenentwicklung des zellbasierten Testsystems war die Realisierung standardisierter Zellkulturüberstände nicht möglich. Eine Interpretation der Ergebnisse ist aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit des Probenmaterials deshalb mit Sorgfalt zu treffen.

Qualitätsanalyse der Daten

Die Qualität der vorliegenden Daten des zellbasierten Assays muss unter dem Aspekt betrachtet werden, dass sich das Testsystem über die gesamte Zeit hinweg im Prozess der Methodenentwicklung befand. Mit dem enzymbasierten Testsystem konnten schneller aussagekräftigere Ergebnisse erzielt werden. Aus diesem Grund wurde sich gegen eine serielle Versuchsreihe der Angiotensine mittels des zellbasierten Testsystems entschieden. Die vorliegende Versuchsreihe konnte außerdem nicht in ausreichender Fallzahl wiederholt werden. Die Messungen der Proben unterlagen zwar jeweils Mehrfachbestimmungen (technische Replikate), die jeweiligen Teilversuche wurden jedoch nur einmalig ausgeführt ($n = 1$). Für eine eindeutige Beurteilbarkeit des zellbasierten Testsystems hätte das Ausführen der Versuchsreihe in einer ausreichend hohen Zahl an Versuchswiederholungen erfolgen müssen ($n = 3$), so wie es bei dem enzymbasierten Testsystem der Fall war. Aus diesem Grund sind die hier vorgetragenen Ergebnisse lediglich als Tendenz zu bewerten. Des Weiteren ist eine Reproduzierbarkeit der Teilversuche unter gleichen Bedingungen nicht immer gegeben, da im Prozess der Methodenentwicklung Änderungen des Assay-Protokolls vorgenommen wurden. Im Ergebnisteil wurden die einzelnen Änderungen des Protokolls an gegebener Stelle erläutert. Dieser Punkt macht einen Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Teilversuche untereinander nur eingeschränkt möglich.

4.4 Vergleich der beiden Testsysteme: Enzymbasiertes vs. Zellbasiertes Testsystem

Eingangs wurden bereits die Testkriterien beschrieben, anhand derer im Folgenden eine vergleichende Analyse der beiden Testsysteme vorgenommen wird. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Entwicklung der beiden Testsysteme parallel und unter dem zeitlichen Druck der Etablierung einer funktionierenden Assay-Methode für ein BMBF-gefördertes Projekt erfolgte [12]. Aus diesem Grund richtete sich der Fokus während der Methodenentwicklung auf den Ausbau des enzymbasierten Testsystems, bei welchem sich schnell zielführende Ergebnisse zeigten. Das nicht ausreichend entwickelte zellbasierte Testsystem muss deshalb unter diesem Aspekt entsprechend eingeordnet werden.

Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Daten weist das enzymbasierte Testsystem mehrere Vorteile auf. Die enzymatische Umsetzung des fluorogenen Substrats und die Messung der biologischen Aktivität der Angiotensine anhand der ACE2-Aktivität stellten sich als wenig störanfällig heraus. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchswiederholungen konnten deshalb reproduziert werden. Da ein vollständiges Methodenprotokoll entwickelt werden konnte, wurde darüber hinaus bereits eine serielle Versuchsreihe mit den Angiotensinen durchgeführt. Konträr dazu steht die unvollständig entwickelte Methode des zellbasierten Testsystems, mittels welcher kein standardisiertes Probenmaterial generiert werden konnte. Die Kultivierung von Zellen unterliegt zudem äußerlichen Bedingungen, welche Einfluss auf die Verwendung von Zellkulturen als Testsystem nehmen [59, 89, 117, 123]. Dieser Sachverhalt hinterfragt im Generellen die Reproduzierbarkeit der Methode und des Probenmaterials. Das zellbasierte Testsystem zur Messung von Nitrat + Nitrit-Konzentrationen in konditionierten Zellkulturüberständen konnte bis zum Schluss nicht ausreichend entwickelt werden. Die Messmethode mittels Griess-Reaktion bietet jedoch das Potenzial zur Reproduzierbarkeit von seriellen Messungen.

Die Handhabung der beiden Analyseverfahren ist einfach und schnell, da die Messungen jeweils im Mikrotiterplatten-Format erfolgen. Da für den zellbasierten Assay jedoch konditionierter Zellkulturüberstand als Probenmaterial generiert werden muss, stellt die Gesamtdurchführung des zellbasierten Testsystems die zeitaufwändigere und arbeitsintensivere Methode dar. Darüber hinaus ist das Arbeiten mit Zellkulturen

schwieriger zu erlernen. Im Gesamtkontext wird die Durchführung der zellbasierten Methode deshalb als komplexer bewertet.

Hinsichtlich der universellen Durchführbarkeit in Standardlaboren weist das enzymbasierte Testsystem den Vorteil auf, das für seine Anwendung geringere Anforderungen an das Labor erfüllt sein müssen. So wird für die Durchführung hauptsächlich ein Fluoreszenzmessgerät benötigt. Die Griess-Methode als Messverfahren eignet sich ebenfalls für die Anwendung in Standardlaboren. Jedoch ist für das zellbasierte Testsystem zusätzlich das Arbeiten mit Zellkulturen unter entsprechenden Sicherheitsstufen notwendig [11]. Deswegen eignet sich der zellbasierte Assay hauptsächlich für Labore, die auf das Arbeiten mit Zellkulturen ausgelegt sind.

Unter ökonomischen Aspekten erfordern beide Methoden die Anschaffungskosten der benötigten Materialien. Beide Methoden haben den Vorteil, dass für die eingesetzten Reagenzien der Substanzverbrauch gering ist. Das zellbasierte Testsystem bietet zudem den Mehrwert, dass die Griess-Reagenzien im Labor selbst hergestellt werden können.

Die aufgeführten Herausforderungen des zellbasierten Testsystems waren bereits zu Beginn dieser Arbeit ersichtlich und führten deswegen zu einer zeitaufwändigeren Methodenentwicklung. Die zellbasierte Methode weist vor Allem hinsichtlich der Testkriterien *Reproduzierbarkeit der Daten* und *Handhabung des Assays* seine Grenzen auf. Hierbei ist die Generierung von konditionierten Zellkulturüberständen die zentrale Schwierigkeit, wohingegen die Griess-Methode als Analyseverfahren zur Detektion von Nitrat + Nitrit-Konzentration geeignet ist. Da das Ziel der vorliegenden Dissertation die Entwicklung eines einfachen und universellen Testsystems für den biologischen Aktivitätsnachweis von AT 1-7 darstellte, wurde die zellbasierte Methode zugunsten der enzymbasierten Methode eingestellt. Zusammenfassend weist das enzymbasierte Testsystem das größere Potenzial für eine serielle Versuchsreihe mit vernebelten Angiotensin-Formulierungen auf und ist bezogen auf die dargestellten Testkriterien dem zellbasierten Testsystem überlegen.

4.5 Ausblick

Die dargelegten Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein weiterer Forschungsbedarf in der Entwicklung eines zellbasierten Testsystems für den Nachweis der biologischen Aktivität von AT 1-7 besteht. Das vorgestellte zellbasierte Testsystem beschäftigt sich mit der Messung von NO bzw. Nitrat + Nitrit in konditioniertem Zellkulturüberstand von HUVEC mittels Griess Methode. Zukünftige Studien könnten untersuchen, welche alternative Methoden zur Messung der NO-Produktion durch Zellkulturen zur Verfügung stehen. Beispielsweise präsentierten He und Frost ein geschlossenes Testsystem, in welchem das produzierte gasförmige NO durch Zellen mittels Chemielumineszenz gemessen werden konnte [48]. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der Schritt in der Generierung von Zellkulturüberständen entfällt und ein mögliches Abfangen von NO damit verhindert werden kann. Analyseverfahren mittels Chemielumineszenz stellen im Generellen eine Alternative zur Griess Methode dar und werden in weiteren Studien zur Detektion von NO aufgeführt [68, 128].

Ein weiterer Ansatz zur Modifikation der zellbasierten Methode stellt die Auswahl der Zellkulturlinie dar. Geiger et al. konnten einen möglichen Unterschied in dem Ausmaß der NO-Produktion durch Endothelzellen in Abhängigkeit des Entnahmeortes feststellen [41]. In dieser Studie wurde die höchste NO-Produktion bei der Verwendung von makrovaskulären Ratten-Endothelzellen der Aorta beobachtet. Darüber hinaus gibt es in der Literatur neben Endothelzellen weitere Zellkulturlinien, welche bei der NO-Forschung verwendet werden [50, 56]. Angelehnt an diese Studien könnte zukünftig untersucht werden, ob durch die Verwendung einer weiteren Zellkulturlinie eine stärkere Produktion von NO gelingt.

β-Arrestin Assay als neuer Ansatz eines zellbasierten Testsystems zur Bestimmung der biologischen Aktivität von Angiotensinen

Abschließend stellt ein neuer Ansatz zur Bestimmung der biologischen Aktivität von Angiotensinen einen Ausblick in der weiteren Forschung rund um AT 1-7 dar [83]. Diese zellbasierte Methode nutzt die Bindungsfähigkeit von AT 1-7 an AT1R, welche nachfolgend eine β-Arrestin Rekrutierung nach sich zieht [40, 118]. Über das Ausmaß der β-Arrestin

Rekrutierung kann die biologische Aktivität von AT 1-7 ermittelt werden. Für diesen Ansatz existiert bereits ein Testkit von dem Hersteller Montana Molecular, welches im Folgenden vorgestellt wird [83]. In einem ersten Schritt dieses Assay-Protokolls unterliegen Zellkulturen einer eintägigen Transduktion. Dafür wird genetisches Material mittels eines Virusvektors (Baculovirus) in die zu transduzierten Zellen eingeschleust. Der Virusvektor enthält genetisches Material, welches für einen fluoreszierenden Biosensor und AT1R codiert. Der Biosensor ist aufgebaut aus β-Arrestin-3 (β-Arrestin-2) und einem grünen fluoreszierenden Protein, welche gekoppelt sind. Bindet in einem zweiten Schritt des Assays ein passender Agonist an AT1R der transduzierten Zellen, führt dies zur Rekrutierung von β-Arrestin an AT1R. Mit der Rekrutierung wird eine Konformationsänderung des fluoreszierenden Biosensors ausgelöst und es kommt zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals. Diese Signaländerung kann mittels eines Fluoreszenzmessgeräts detektiert werden, indem die Fluoreszenz vor und nach Zugabe des Agonisten gemessen wird. Als Agonist wird die Verwendung von AT II empfohlen [83], da für AT II ebenfalls die Bindung an AT1R mit nachfolgender Rekrutierung von β-Arrestin nachgewiesen werden konnte [40, 118]. Ein weiteres zellbasiertes Testsystem, basierend auf dem vorgestellten Testkit von Montana Molecular, könnte die biologische Aktivität von Angiotensinen anhand der β-Arrestin Rekrutierung an AT1R untersuchen. Die Quantifizierung der β-Arrestin Rekrutierung kann über den Abfall der initialen Steigung des Fluoreszenzsignals erfolgen. AT 1-7 und seine Peptidfragmente bilden dabei die Testsubstanzen, wohingegen AT II als Positivkontrolle eingesetzt werden kann. Zukünftige Studien könnten sich dem Ausbau dieses zweiten zellbasierten Testsystems zur weiteren Funktionsprüfung von AT 1-7 widmen.

5. Zusammenfassung

Das Schwere Akute Respiratorische Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ruft die Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19) hervor und lenkt seit seiner Ausbreitung den Blick der Forschung auf mögliche Therapieoptionen. In den Fokus ist dabei das Peptid Angiotensin (AT) 1-7 gerückt, welches als Teil eines antiinflammatorischen Weges aufgeführt wird. Das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte Projekt *STAMINA-Cov19* beschäftigte sich mit der Entwicklung einer medikamentösen Therapie gegen den Verlauf einer mittelschweren COVID-19 Lungenerkrankung. Der Therapieansatz beruhte auf der inhalativen Verabreichung einer vernebelten AT 1-7-Formulierung. Für die weitere Entwicklung dieser Therapieoption war ein Testsystem nötig, welches die biologische Aktivität einer vernebelten AT 1-7-Formulierung in Anwesenheit von möglichen notwendigen Hilfsstoffen untersuchte. Das Testsystem sollte zudem die Anforderung erfüllen, die biologische Aktivität von AT 1-7 von derer möglicher Peptidfragmente zu differenzieren, welche bei dem Prozess der Vernebelung entstehen könnten. Die vorliegende Dissertation hatte die Entwicklung eines geeigneten Testsystems für die Funktionsprüfung der biologischen Aktivität gelöster Angiotensin-Formulierungen zum Ziel. Es erfolgte die parallele Entwicklung von zwei Testsystemen, basierend auf einer enzymbasierten und einer zellbasierten Methode.

Der enzymbasierte Assay beruht auf der Spaltung eines fluorogenen Substrats durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) 2, wobei das entstehende Fluoreszenzsignal mittels eines Mikroplattenlesers detektiert wurde. AT 1-7 agierte als Inhibitor von ACE2 und unterband die enzymatische in vitro-Umsetzung des fluorogenen Substrats. Dies äußerte sich in einer Abnahme der initialen Steigung des Fluoreszenzsignals, welche als ACE2-Aktivität definiert wurde. Das enzymbasierte Testsystem erlaubte einen Vergleich der biologischen Aktivität von Angiotensinen anhand einer Abnahme der ACE2-Aktivität nach deren Zugabe. Getestet wurden AT 1-7 und die folgenden Peptidfragmente, welche fünf bzw. sechs Aminosäuren der Peptidsequenz von AT 1-7 aufweisen: AT 1-5, AT 1-6, AT 2-6, AT 2-7 und AT 3-7. Für drei der fünf Peptidfragmente konnte dabei ein signifikanter Unterschied zu AT 1-7 bei allen Kombinationen aus Substrat- und Peptid-Konzentration nachgewiesen werden. Für die Peptidfragmente AT 1-6 und AT 2-7 zeigte sich in den meisten Fällen jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zu AT 1-7. Darüber hinaus ließ sich

für die Angiotensine ein Unterschied in der Stärke ihrer Hemmwirkung auf ACE2 beobachten. Beginnend mit der stärksten Hemmwirkung ergab sich folgende Reihenfolge für die Angiotensine der Peptid-Konzentration 33 µM:
AT 2-7 > AT 1-7 > AT 1-6 > AT 2-6 > AT 3-7 > AT 1-5.

Das zellbasierte Testsystem stützt sich auf die AT 1-7-vermittelte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Endothelzellen. Hierbei erfolgte die indirekte Messung von NO im Zellkulturüberstand von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) über die Erfassung der Gesamtkonzentration der stabilen Abbauprodukte Nitrat + Nitrit mittels Griess-Methode. Im Rahmen der Methodenentwicklung des zellbasierten Testsystems bewegte sich die erfasste Nitrat + Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand im Bereich der Mediumkontrollen. Eine Steigerung der NO-Freisetzung konnte auch durch weitere Maßnahmen, wie den Wechsel des Inkubationsmediums und der Stimulation von HUVEC mit Acetylcholin (ACh), dessen stabilem Analogon Carbachol oder Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α), nicht erreicht werden. Das Testsystem zeigte jedoch, dass NO mittels Griess-Methode in gelösten Proben des NO-Donors Diethylammonium (Z)-1-(N,N-diethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate (DEA NONOate) mit einer ausreichenden Wiederfindungsrate gemessen werden konnte. Ursprünglich war für dieses Testsystem eine Quantifizierung der NO-Freisetzung nach Behandlung von HUVEC mit AT 1-7 und seinen Peptidfragmenten vorgesehen. Die Entwicklung des zellbasierten Testsystems mit der Messung von signifikanten NO-Mengen in Zellkulturüberständen von HUVEC konnte jedoch aufgrund des engen zeitlichen Rahmens des Projekts *STAMINA-Cov19* nicht in ausreichender Tiefe abgeschlossen werden. Infolgedessen wurde eine Behandlung von HUVEC mit Angiotensinen und speziell AT 1-7 nicht praktisch umgesetzt.

Eine direkte Gegenüberstellung der beiden Testsysteme erfolgte hinsichtlich folgender Testkriterien: *Reproduzierbarkeit der Daten*, *Handhabung des Assays*, *universelle Durchführbarkeit in Standardlaboren* und *Ökonomie der Methode*. Gemessen anhand dieser Testkriterien stellte der enzymbasierte Assay die überlegenere Methode dar. Die vorliegende Dissertation zeigte, dass in dem enzymbasierten Testsystem *Hemmung der ACE2-Aktivität durch Angiotensine* das größere Potenzial für die weitere Bestimmung der biologischen Aktivität einer vernebelten AT 1-7-Formulierung steckte.

6. Literaturverzeichnis

1. Allen, K.R., Degg, T.J., Rushworth, P.A., Smith, M., Henderson, M.J.: Measurement of phenylalanine and tyrosine in plasma by high-performance liquid chromatography using the inherent fluorescence of aromatic amino acids. *Ann Clin Biochem* 36, 207–211 (1999)

2. Al-Radi, O., Ingelshed, K., Eichhorn, L., Josefsson, H., Krkoska, M., Bräutigam, L., Lindström, S., Végvári, Á., Kheder, S., Cerrato, C.P., Fermé, S., Bosdotter, C., Allalou, A., Levander, F., Vojtesek, B., Lane, D.P., Kannan, P.: Pharmacological activation of p53 induces dose-dependent changes in endothelial cell fate during angiogenic sprouting. *Cell Death Dis* 16, 883 (2025)

3. Alvarez Dorta, D., Deniaud, D., Mével, M., Gouin, S.G.: Tyrosine Conjugation Methods for Protein Labelling. *Chemistry* 26, 14257–14269 (2020)

4. Aurell, M.: The renin-angiotensin system: the centenary jubilee. *Blood Press* 7, 71–75 (1998)

5. Bailey, L.E., Ong, S.D.: Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. *Journal of Pharmacological Methods* 1, 171–175 (1978)

6. Bale, R., Iida, A., Yamakawa, M., Li, C., Tsubokura, M.: Quantifying the COVID19 infection risk due to droplet/aerosol inhalation. *Sci Rep* 12, 11186 (2022)

7. Baumkötter, R., Yilmaz, S., Zahn, D., Fenzl, K., Prochaska, J.H., Rossmann, H., Schmidtmann, I., Schuster, A.K., Beutel, M.E., Lackner, K.J., Münzel, T., Wild, P.S.: Protective behavior and SARS-CoV-2 infection risk in the population – Results from the Gutenberg COVID-19 study. *BMC Public Health* 22, 1993 (2022)

8. Bio-Techne R&D Systems: Recombinant Human ACE-2. https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/933-zn.pdf, Abrufdatum: 02.01.2026

9. Borcherding, H., Leikefeld, S., Frey, C., Diekmann, S., Steinrücke, P.: Enzymatic microtiter plate-based nitrate detection in environmental and medical analysis. *Anal Biochem* 282, 1–9 (2000)

10. Bryan, N.S., Grisham, M.B.: Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* 43, 645–657 (2007)

11. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz: Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit Biologischen Arbeitsstoffen. https://www.gesetze-im-internet.de/biostoffv_2013/index.html, Abrufdatum: 05.02.2026

12. Bundesministerium für Forschung, Technologie und Raumfahrt: Studien zur inhalativen Anwendung von MAS-Rezeptor-Agonisten bei akuter Lungenschädigung durch COVID-19 (STAMINA-Cov19) - Gesundheitsforschung BMFTR.

https://www.gesundheitsforschung-bmftr.de/de/studien-zur-inhalativen-anwendung-von-mas-rezeptor-agonisten-bei-akuter-lungenschadigung-13463.php, Abrufdatum: 30.01.2026

13. Busch, C., Rehak, M., Hollborn, M., Wiedemann, P., Lang, G.K., Lang, G.E., Wolf, A., Deissler, H.L.: Type of culture medium determines properties of cultivated retinal endothelial cells: induction of substantial phenotypic conversion by standard DMEM. *Heliyon* 7, e06037 (2021)

14. Cabadak, H., Küçükibrahimoğlu, E., Aydin, B., Kan, B., Zafer Gören, M.: Muscarinic receptor-mediated nitric oxide release in a K562 erythroleukaemia cell line. *Auton Autacoid Pharmacol* 29, 109–115 (2009)

15. Cayman Chemical Company: Product Information DEA NONOate. https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/82100.pdf, Abrufdatum: 02.01.2026

16. Ceschan, N.E., Scioli-Montoto, S., Sbaraglini, M.L., Ruiz, M.E., Smyth, H.D.C., Bucalá, V., Ramírez-Rigo, M.V.: Nebulization of a polyelectrolyte-drug system for systemic hypertension treatment. *Eur J Pharm Sci* 170, 106108 (2022)

17. Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., Ning, Q.: Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* 130, 2620–2629 (2020)

18. Chen, H.-H., Zhou, H.-J., Fang, X.: Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives in vitro. *Pharmacol Res* 48, 231–236 (2003)

19. Dales, N.A., Gould, A.E., Brown, J.A., Calderwood, E.F., Guan, B., Minor, C.A., Gavin, J.M., Hales, P., Kaushik, V.K., Stewart, M., Tummino, P.J., Vickers, C.S., Ocain, T.D., Patane, M.A.: Substrate-based design of the first class of angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) inhibitors. *J Am Chem Soc* 124, 11852–11853 (2002)

20. Dehghanbanadaki, H., Seif, F., Vahidi, Y., Razi, F., Hashemi, E., Khoshmirsafa, M., Aazami, H.: Bibliometric analysis of global scientific research on Coronavirus (COVID-19). *Med J Islam Repub Iran* 34, 51 (2020)

21. Diao, B., Wang, C., Tan, Y., Chen, X., Liu, Y., Ning, L., Chen, L., Li, M., Liu, Y., Wang, G., Yuan, Z., Feng, Z., Zhang, Y., Wu, Y., Chen, Y.: Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol* 11, 827 (2020)

22. Dimitropoulou, C., White, R.E., Fuchs, L., Zhang, H., Catravas, J.D., Carrier, G.O.: Angiotensin II relaxes microvessels via the AT(2) receptor and Ca(2+)-activated K(+) (BK(Ca)) channels. *Hypertension* 37, 301–307 (2001)

23. Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E., Acton, S.: A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87, e1-9 (2000)

24. van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D.H., Holbrook, M.G., Gamble, A., Williamson, B.N., Tamin, A., Harcourt, J.L., Thornburg, N.J., Gerber, S.I., Lloyd-Smith, J.O., de Wit, E., Munster, V.J.: Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* 382, 1564–1567 (2020)

25. Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.-R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A.M., 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, A.D.M.E., Schmitz, H., Doerr, H.W.: Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348, 1967–1976 (2003)

26. Du, Y., Tu, L., Zhu, P., Mu, M., Wang, R., Yang, P., Wang, X., Hu, C., Ping, R., Hu, P., Li, T., Cao, F., Chang, C., Hu, Q., Jin, Y., Xu, G.: Clinical Features of 85 Fatal Cases of COVID-19 from Wuhan. A Retrospective Observational Study. *Am J Respir Crit Care Med* 201, 1372–1379 (2020)

27. Dulbecco, R., Freeman, G.: Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8, 396–397 (1959)

28. Dymkowska, D., Drabarek, B., Michalik, A., Nowak, N., Zabłocki, K.: TNFα stimulates NO release in EA.hy926 cells by activating the CaMKKβ-AMPK-eNOS pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 106, 57–67 (2019)

29. Fallahian, F., Karami-Tehrani, F., Salami, S., Aghaei, M.: Cyclic GMP induced apoptosis via protein kinase G in oestrogen receptor-positive and -negative breast cancer cell lines. *FEBS J* 278, 3360–3369 (2011)

30. Fassini, A., Antero, L.S., Corrêa, F.M.A., Joca, S.R., Resstel, L.B.M.: The prelimbic cortex muscarinic M_3 receptor-nitric oxide-guanylyl cyclase pathway modulates cardiovascular responses in rats. *J Neurosci Res* 93, 830–838 (2015)

31. Ferreira, A.J., Santos, R.A., Almeida, A.P.: Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension* 38, 665–668 (2001)

32. Ferreira, I.M.P.L.V.O., Lima, J.L.F.C., Montenegro, M.C.B.S.M., Olmos, R.P., Rios, A.: Simultaneous assay of nitrite, nitrate and chloride in meat products by flow injection. *Analyst* 121, 1393–1396 (1996)

33. Figueroa, X.F., González, D.R., Martínez, A.D., Durán, W.N., Boric, M.P.: ACh-induced endothelial NO synthase translocation, NO release and vasodilatation in the hamster microcirculation in vivo. *J Physiol* 544, 883–896 (2002)

34. Ford, P.C., Wink, D.A., Stanbury, D.M.: Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett* 326, 1–3 (1993)

35. Forrester, S.J., Booz, G.W., Sigmund, C.D., Coffman, T.M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., Eguchi, S.: Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 98, 1627–1738 (2018)

36. Forteschi, M., Sotgia, S., Assaretti, S., Arru, D., Cambedda, D., Sotgiu, E., Zinellu, A., Carru, C.: Simultaneous determination of aromatic amino acids in human blood plasma by capillary electrophoresis with UV-absorption detection. *J Sep Sci* 38, 1794–1799 (2015)

37. Freeman, E.J., Chisolm, G.M., Ferrario, C.M., Tallant, E.A.: Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 28, 104–108 (1996)

38. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376 (1980)

39. Gagnon, J.E., Kamin, S.B., Kearns, J.: The impact of the COVID-19 pandemic on global GDP growth. *J Jpn Int Econ* 68, 101258 (2023)

40. Galandrin, S., Denis, C., Boularan, C., Marie, J., M'Kadmi, C., Pilette, C., Dubroca, C., Nicaise, Y., Seguelas, M.-H., N'Guyen, D., Banères, J.-L., Pathak, A., Sénard, J.-M., Galés, C.: Cardioprotective Angiotensin-(1-7) Peptide Acts as a Natural-Biased Ligand at the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Hypertension* 68, 1365–1374 (2016)

41. Geiger, M., Stone, A., Mason, S.N., Oldham, K.T., Guice, K.S.: Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol* 273, L275-281 (1997)

42. Ghosh, P., Mukherjee, S., Ghosh, S., Gangopadhyay, A., Keswani, T., Sengupta, A., Sarkar, S., Bhattacharyya, A.: Estimating nitric oxide (NO) from MDSCs by Griess method. *Methods Cell Biol* 184, 149–158 (2024)

43. Glowacka, I., Bertram, S., Herzog, P., Pfefferle, S., Steffen, I., Muench, M.O., Simmons, G., Hofmann, H., Kuri, T., Weber, F., Eichler, J., Drosten, C., Pöhlmann, S.: Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63. *J Virol* 84, 1198–1205 (2010)

44. Griess, P.: Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen". *Ber Dtsch Chem Ges* 12, 426–428 (1879)

45. Grisham, M.B., Johnson, G.G., Lancaster, J.R.: Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol* 268, 237–246 (1996)

46. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: *Free radicals in biology and medicine*, 4th ed. Oxford University Press, Oxford, UK (2007)

47. Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M.L.C., Lely, A.T., Navis, G.J., van Goor, H.: Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 203, 631–637 (2004)

48. He, W., Frost, M.C.: CellNO trap: Novel device for quantitative, real-time, direct measurement of nitric oxide from cultured RAW 267.4 macrophages. *Redox Biol* 8, 383–397 (2016)

49. Herrmann, J., Adam, E.H., Notz, Q., Helmer, P., Sonntagbauer, M., Ungemach-Papenberg, P., Sanns, A., Zausig, Y., Steinfeldt, T., Torje, I., Schmid, B., Schlesinger, T., Rolfes, C., Reyher, C., Kredel, M., Stumpner, J., Brack, A., Wurmb, T., Gill-Schuster, D., Kranke, P., Weismann, D., Klinker, H., Heuschmann, P., Rücker, V., Frantz, S., Ertl, G., Muellenbach, R.M., Mutlak, H., Meybohm, P., Zacharowski, K., Lotz, C.: COVID-19 Induced Acute Respiratory Distress Syndrome-A Multicenter Observational Study. *Front Med (Lausanne)* 7, 599533 (2020)

50. Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z.: Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235, 473–476 (1987)

51. Hoenicka, M., Sabau, M., Liebold, A., Hofmann, H.-S., Ried, M.: Preservation of Adrenoceptor and Endothelin Receptor Mediated Vasoconstriction and of Endothelium-Dependent Relaxation after Cold Storage of Explanted Blood Vessels for ex vivo Analyses. *J Vasc Res* 59, 303–313 (2022)

52. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M.A., Drosten, C., Pöhlmann, S.: SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181, 271-280.e8 (2020)

53. 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.: Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506 (2020)

54. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wei, L.H., Bauer, P.M., Wu, G., del Soldato, P.: Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4202–4208 (2001)

55. Ignarro, L.J., Fukuto, J.M., Griscavage, J.M., Rogers, N.E., Byrns, R.E.: Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8103–8107 (1993)

56. Iyengar, R., Stuehr, D.J., Marletta, M.A.: Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6369–6373 (1987)

57. Jiao, L., Li, H., Xu, J., Yang, M., Ma, C., Li, J., Zhao, S., Wang, H., Yang, Y., Yu, W., Wang, J., Yang, J., Long, H., Gao, J., Ding, K., Wu, D., Kuang, D., Zhao, Y., Liu, J., Lu, S., Liu, H., Peng, X.: The Gastrointestinal Tract Is an Alternative Route for SARS-CoV-2 Infection in a Nonhuman Primate Model. *Gastroenterology* 160, 1647–1661 (2021)

58. Joshi, M.S., Ferguson, T.B., Johnson, F.K., Johnson, R.A., Parthasarathy, S., Lancaster, J.R.: Receptor-mediated activation of nitric oxide synthesis by arginine in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9982–9987 (2007)

59. Kardani, A., Hemmer, J., Diesel, B., Mashayekhi, V., Schomisch, A., Koch, M., Fecher-Trost, C., Meyer, M.R., Ludwig, N., Rishik, S., Keller, A., Hoppstädter, J., Fuhrmann, G., Kiemer, A.K.: Laminar Flow Alters EV Composition in HUVECs: A Study of Culture Medium Optimization and Molecular Profiling of Vesicle Cargo. *Small Methods* 9, e2401841 (2025)

60. Kawakami, T., Koike, A., Amano, F.: Sodium bicarbonate regulates nitric oxide production in mouse macrophage cell lines stimulated with lipopolysaccharide and interferon γ. *Nitric Oxide* 79, 45–50 (2018)

61. Kono, T., Taniguchi, A., Imura, H., Oseko, F., Khosla, M.C.: Pressor activity of angiotensin II-(2-7)-hexapeptide in man. *Endocrinol Jpn* 32, 767–769 (1985)

62. Kono, T., Taniguchi, A., Imura, H., Oseko, F., Khosla, M.C.: Biological activities of angiotensin II-(1-6)-hexapeptide and angiotensin II-(1-7)-heptapeptide in man. *Life Sci* 38, 1515–1519 (1986)

63. Krebs, H.A., Henseleit, K.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Klin Wochenschr* 11, 757–759 (1932)

64. 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, A.S., Liu, D., Qin, C., Jiang, C., Penninger, J.M.: A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* 11, 875–879 (2005)

65. Kucharewicz, I., Chabielska, E., Pawlak, D., Matys, T., Rólkowski, R., Buczko, W.: The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) closely resembles that of losartan. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1, 268–272 (2000)

66. Kucharewicz, I., Pawlak, R., Matys, T., Pawlak, D., Buczko, W.: Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 40, 774–779 (2002)

67. Kwee, T.C., Kwee, R.M.: Chest CT in COVID-19: What the Radiologist Needs to Know. *Radiographics* 40, 1848–1865 (2020)

68. Laver, J.R., Stevanin, T.M., Read, R.C.: Chemiluminescence quantification of NO and its derivatives in liquid samples. *Methods Enzymol* 436, 113–127 (2008)

69. Leaker, B.R., Singh, D., Nicholson, G.C., Hezelova, B., Goodin, T., Ozol-Godfrey, A., Galluppi, G., Barnes, P.J.: Evaluation of systemic absorption and bronchodilator effect of glycopyrronium bromide delivered by nebulizer or a dry powder inhaler in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 20, 132 (2019)

70. Levay, M.K., Throm, L., Bahrami, N., Wieland, T.: The Muscarinic Acetylcholine M2 Receptor-Induced Nitration of p190A by eNOS Increases RhoA Activity in Cardiac Myocytes. *Cells* 12, 2432 (2023)

71. Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., Choe, H., Farzan, M.: Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450–454 (2003)

72. Liu, C., Lei, S., Cai, T., Cheng, Y., Bai, J., Fu, W., Huang, M.: Inducible nitric oxide synthase activity mediates TNF-α-induced endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 325, C780–C795 (2023)

73. Loot, A.E., van Buiten, A., Roks, A.J.M., Henning, R.H.: The suitability of iodinated Angiotensin-(1-7) peptides as pharmacological tools. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51, 51–55 (2005)

74. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., Tan, W.: Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395, 565–574 (2020)

75. Lu, Y., Zhu, Q., Fox, D.M., Gao, C., Stanley, S.A., Luo, K.: SARS-CoV-2 down-regulates ACE2 through lysosomal degradation. *Mol Biol Cell* 33, ar147 (2022)

76. Maragos, C.M., Morley, D., Wink, D.A., Dunams, T.M., Saavedra, J.E., Hoffman, A., Bove, A.A., Isaac, L., Hrabie, J.A., Keefer, L.K.: Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J Med Chem* 34, 3242–3247 (1991)

77. Marzinzig, M., Nussler, A.K., Stadler, J., Marzinzig, E., Barthlen, W., Nussler, N.C., Beger, H.G., Morris, S.M., Brückner, U.B.: Improved Methods to Measure End Products of Nitric Oxide in Biological Fluids: Nitrite, Nitrate, andS-Nitrosothiols. *Nitric Oxide* 1, 177–189 (1997)

78. Masaki, H., Kurihara, T., Yamaki, A., Inomata, N., Nozawa, Y., Mori, Y., Murasawa, S., Kizima, K., Maruyama, K., Horiuchi, M., Dzau, V.J., Takahashi, H., Iwasaka, T., Inada, M., Matsubara, H.: Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *The Journal of clinical investigation* 101, 527–535 (1998)

79. MedChemExpress: Angiotensin I/II (1-6) (TFA). https://www.medchemexpress.com/angiotensin-i-ii-1-6-tfa.html, Abrufdatum: 04.02.2026

80. Medina, A., Nicholas, D.J.: Interference by reduced pyridine nucleotides in the diazotization of nitrite. *Biochim Biophys Acta* 23, 440–442 (1957)

81. Merck: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Formulation. https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/dulbecco-modified-eagle-medium-formulation, Abrufdatum: 05.01.2026

82. Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A.: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62–71 (2001)

83. Montana Molecular: Green Fluorescent Borealis Arrestin Assay Kits. https://montanamolecular.com/wp-content/uploads/2024/12/Arrestin-Protocol_Green_PRINT.pdf, Abrufdatum: 26.02.2026

84. Morawska, L., Cao, J.: Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. *Environ Int* 139, 105730 (2020)

85. Mullershausen, F., Russwurm, M., Koesling, D., Friebe, A.: In Vivo Reconstitution of the Negative Feedback in Nitric Oxide/cGMP Signaling: Role of Phosphodiesterase Type 5 Phosphorylation. *Mol Biol Cell* 15, 4023–4030 (2004)

86. Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664–666 (1988)

87. Pan, F., Ye, T., Sun, P., Gui, S., Liang, B., Li, L., Zheng, D., Wang, J., Hesketh, R.L., Yang, L., Zheng, C.: Time Course of Lung Changes at Chest CT during Recovery from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Radiology* 295, 715–721 (2020)

88. Papp, M., Li, X., Zhuang, J., Wang, R., Uhal, B.D.: Angiotensin receptor subtype AT(1) mediates alveolar epithelial cell apoptosis in response to ANG II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L713-718 (2002)

89. Park, G., Park, S., Oh, S., Choi, N., Choi, J.: Effects of culture temperature (37°C, 39°C) and oxygen concentration (20%, 2%) on proliferation and differentiation of C2C12 cells. *J Anim Sci Technol* 67, 224–235 (2025)

90. Park, H.M., Chang, K.H., Moon, S.-H., Park, B.J., Yoo, S.K., Nam, K.C.: In vitro delivery efficiencies of nebulizers for different breathing patterns. *Biomed Eng Online* 20, 59 (2021)

91. Paul, M.: Das Renin-Angiotensin-System als Grundlage für Hypertonie und koronare Herzkrankheit – Rolle genetischer Faktoren. *Z Kardiol* 89, 264–268 (2000)

92. Paula, R.D., Lima, C.V., Britto, R.R., Campagnole-Santos, M.J., Khosla, M.C., Santos, R.A.: Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by angiotensin-(1-7)-related peptides. *Peptides* 20, 493–500 (1999)

93. Pavia, D., Thomson, M.L., Clarke, S.W., Shannon, H.S.: Effect of lung function and mode of inhalation on penetration of aerosol into the human lung. *Thorax* 32, 194–197 (1977)

94. Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W.J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S.T., Howells, D.W., Karp, N.A., Lazic, S.E., Lidster, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Pearl, E.J., Petersen, O.H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E.S., Silberberg, S.D., Steckler, T., Würbel, H.: The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *J Cereb Blood Flow Metab* 40, 1769–1777 (2020)

95. Piazzoni, M., Borghi, I., Cadamuro, F., Dalfino, S., Campanile, R., Nizzolo, S., Cassina, V., Tallia, F., Jones, J.R., Mantegazza, F., Bertini, S., Moroni, L., Nicotra, F., Russo, L.: Endothelial Cells Angiogenesis in Sulfated Glycosaminoglycan (GAG) Hydrogels Enhanced by Bioactive Glass-Released Ions. *Adv Funct Materials* e19933 (2025)

96. PromoCell: Endothelial Cell Growth Medium. https://promocell.com/us_en/endothelial-cell-growth-medium.html, Abrufdatum: 04.01.2026

97. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J.: *Rang & Dale's Pharmacology*, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia (PA), USA (2007)

98. Rau, J.L.: The Inhalation of Drugs: Advantages and Problems. *Respiratory Care* 50, 367–382 (2005)

99. R&D Systems: Mca-Y-V-A-D-A-P-K(Dnp)-OH Fluorogenic Peptide Substrate VI. https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/es007.pdf, Abrufdatum: 02.01.2026

100. Ren, L.-L., Wang, Y.-M., Wu, Z.-Q., Xiang, Z.-C., Guo, L., Xu, T., Jiang, Y.-Z., Xiong, Y., Li, Y.-J., Li, X.-W., Li, H., Fan, G.-H., Gu, X.-Y., Xiao, Y., Gao, H., Xu, J.-Y., Yang, F., Wang, X.-M., Wu, C., Chen, L., Liu, Y.-W., Liu, B., Yang, J., Wang, X.-R., Dong, J., Li, L., Huang, C.-L., Zhao, J.-P., Hu, Y., Cheng, Z.-S., Liu, L.-L., Qian, Z.-H., Qin, C., Jin, Q., Cao, B., Wang, J.-W.: Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin Med J (Engl)* 133, 1015–1024 (2020)

101. Rice, G.I., Thomas, D.A., Grant, P.J., Turner, A.J., Hooper, N.M.: Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J* 383, 45–51 (2004)

102. Robert Koch-Institut: COVID-19. https://www.rki.de/DE/Aktuelles/Publikationen/RKI-Ratgeber/Ratgeber/Ratgeber_COVID-19.html, Abrufdatum: 05.02.2026

103. Robert Koch-Institut: Antworten auf häufig gestellte Fragen zur COVID-19-Pandemie. https://www.rki.de/SharedDocs/FAQs/DE/COVID-19-Pandemie/FAQ-Liste-COVID-19-Pandemie.html, Abrufdatum: 05.02.2026

104. Rölz, W., Xin, C., Ren, S., Pfeilschifter, J., Huwiler, A.: Interleukin-1 inhibits angiotensin II-stimulated protein kinase B pathway in renal mesangial cells via the inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 442, 195–203 (2002)

105. Sampaio, W.O., Souza dos Santos, R.A., Faria-Silva, R., da Mata Machado, L.T., Schiffrin, E.L., Touyz, R.M.: Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* 49, 185–192 (2007)

106. Santos, R.A.S., Simoes e Silva, A.C., Maric, C., Silva, D.M.R., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V.B., Lopes, M.T., Bader, M., Mendes, E.P., Lemos, V.S., Campagnole-Santos, M.J., Schultheiss, H.-P., Speth, R., Walther, T.: Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8258–8263 (2003)

107. Savoia, C., Burger, D., Nishigaki, N., Montezano, A., Touyz, R.M.: Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Rev Mol Med* 13, e11 (2011)

108. Schulz, K., Kerber, S., Kelm, M.: Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO2- in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide* 3, 225–234 (1999)

109. Shibata, S.: Dual-Wavelength Spectrophotometry. *Angew Chem Int Ed Engl* 15, 673–679 (1976)

110. Skeggs, L.T., Dorer, F.E., Kahn, J.R., Lentz, K.E., Levine, M.: The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension. *Am J Med* 60, 737–748 (1976)

111. Spokas, E.G., Folco, G.C.: Intima-related vasodilatation of the perfused rat caudal artery. *Eur J Pharmacol* 100, 211–217 (1984)

112. Sriram, K., Insel, P.A.: A hypothesis for pathobiology and treatment of COVID-19: The centrality of ACE1/ACE2 imbalance. *Br J Pharmacol* 177, 4825–4844 (2020)

113. Strawn, W.B., Ferrario, C.M., Tallant, E.A.: Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. *Hypertension* 33, 207–211 (1999)

114. Suhasini, M., Li, H., Lohmann, S.M., Boss, G.R., Pilz, R.B.: Cyclic-GMP-Dependent Protein Kinase Inhibits the Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Mol Cell Biol* 18, 6983–6994 (1998)

115. Sui, Y., Li, J., Venzon, D.J., Berzofsky, J.A.: SARS-CoV-2 Spike Protein Suppresses ACE2 and Type I Interferon Expression in Primary Cells From Macaque Lung Bronchoalveolar Lavage. *Frontiers in immunology* 12, 658428 (2021)

116. Sun, M., Yan, S., Cao, T., Zhang, J.: The impact of COVID-19 pandemic on the world's major economies: based on a multi-country and multi-sector CGE model. *Front Public Health* 12, 1338677 (2024)

117. Tan, J., Virtue, S., Norris, D.M., Conway, O.J., Yang, M., Bidault, G., Gribben, C., Lugtu, F., Kamzolas, I., Krycer, J.R., Mills, R.J., Liang, L., Pereira, C., Dale, M., Shun-Shion, A.S., Baird, H.J., Horscroft, J.A., Sowton, A.P., Ma, M., Carobbio, S., Petsalaki, E., Murray, A.J., Gershlick, D.C., Nathan, J.A., Hudson, J.E., Vallier, L., Fisher-Wellman, K.H., Frezza, C., Vidal-Puig, A., Fazakerley, D.J.: Limited oxygen in standard cell culture alters metabolism and function of differentiated cells. *EMBO J* 43, 2127–2165 (2024)

118. Teixeira, L.B., Parreiras-e-Silva, L.T., Bruder-Nascimento, T., Duarte, D.A., Simões, S.C., Costa, R.M., Rodríguez, D.Y., Ferreira, P.A.B., Silva, C.A.A., Abrao, E.P., Oliveira, E.B., Bouvier, M., Tostes, R.C., Costa-Neto, C.M.: Ang-(1-7) is an endogenous β-arrestin-biased agonist of the AT1 receptor with protective action in cardiac hypertrophy. *Sci Rep* 7, 11903 (2017)

119. Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., Turner, A.J.: A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275, 33238–33243 (2000)

120. Tobaiqy, M., Qashqary, M., Al-Dahery, S., Mujallad, A., Hershan, A.A., Kamal, M.A., Helmi, N.: Therapeutic management of patients with COVID-19: a systematic review. *Infect Prev Pract* 2, 100061 (2020)

121. Towler, P., Staker, B., Prasad, S.G., Menon, S., Tang, J., Parsons, T., Ryan, D., Fisher, M., Williams, D., Dales, N.A., Patane, M.A., Pantoliano, M.W.: ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J Biol Chem* 279, 17996–18007 (2004)

122. Tsukahara, H., Gordienko, D.V., Goligorsky, M.S.: Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 722–729 (1993)

123. Vande Voorde, J., Ackermann, T., Pfetzer, N., Sumpton, D., Mackay, G., Kalna, G., Nixon, C., Blyth, K., Gottlieb, E., Tardito, S.: Improving the metabolic fidelity of cancer models with a physiological cell culture medium. *Sci Adv* 5, eaau7314 (2019)

124. 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.: Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 277, 14838–14843 (2002)

125. Wahlgren, C., Forsberg, G., Divanoglou, A., Östholm Balkhed, Å., Niward, K., Berg, S., Levi, R.: Two-year follow-up of patients with post-COVID-19 condition in Sweden: a prospective cohort study. *Lancet Reg Health Eur* 28, 100595 (2023)

126. Wang, C.C., Prather, K.A., Sznitman, J., Jimenez, J.L., Lakdawala, S.S., Tufekci, Z., Marr, L.C.: Airborne transmission of respiratory viruses. *Science* 373, eabd9149 (2021)

127. Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., Peng, Z.: Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 323, 1061–1069 (2020)

128. Weissman, B.A., Gross, S.S.: Measurement of NO and NO synthase. *Curr Protoc Neurosci* 5, 7.13.1-7.13.22 (2001)

129. World Health Organization: WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. https://www.who.int/news-room/speeches/item/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020, Abrufdatum: 27.02.2026

130. World Health Organization: Disease Outbreak News COVID-19 - China. https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2020-DON233, Abrufdatum: 05.01.2026

131. World Health Organization: Coronavirus disease (COVID-19). https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-(covid-19), Abrufdatum: 05.02.2026

132. World Health Organization: Post COVID-19 condition (Long COVID). https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/post-covid-19-condition, Abrufdatum: 27.02.2026

133. Wright Muelas, M., Ortega, F., Breitling, R., Bendtsen, C., Westerhoff, H.V.: Rational cell culture optimization enhances experimental reproducibility in cancer cells. *Sci Rep* 8, 3029 (2018)

134. Wu, A., Duan, T., Tang, D., Xu, Y., Feng, L., Zheng, Z., Zhu, J., Wang, R., Zhu, Q.: Determination of Nitric Oxide-Derived Nitrite and Nitrate in Biological Samples by HPLC Coupled to Nitrite Oxidation. *Chromatographia* 76, 1649–1655 (2013)

135. Yang, C.Y., Pownall, H.J., Gotto, Jr., A.M.: Identification of peptides containing tryptophan, tyrosine, and phenylalanine using photodiode-array spectrophotometry. *Analytical biochemistry* 145, 67–72 (1985)

136. Yang, H., Xiao, X., Zhao, X., Wu, Y.: Intrinsic Fluorescence Spectra of Tryptophan, Tyrosine and Phenyloalanine. In: *Proceedings of the 5th International Conference on Advanced Design and Manufacturing Engineering*, S. 224–233. Atlantis Press, Shenzen, China (2015)

137. Yayama, K., Hiyoshi, H., Imazu, D., Okamoto, H.: Angiotensin II stimulates endothelial NO synthase phosphorylation in thoracic aorta of mice with abdominal aortic banding via type 2 receptor. *Hypertension* 48, 958–964 (2006)

138. Yu, I.T.S., Wong, T.W., Chiu, Y.L., Lee, N., Li, Y.: Temporal-spatial analysis of severe acute respiratory syndrome among hospital inpatients. *Clin Infect Dis* 40, 1237–1243 (2005)

139. Zhang, H., Li, H.-B., Lyu, J.-R., Lei, X.-M., Li, W., Wu, G., Lyu, J., Dai, Z.-M.: Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *Int J Infect Dis* 96, 19–24 (2020)

140. Zhang, J., Guo, Y., Ge, W., Zhou, X., Pan, M.: High glucose induces apoptosis of HUVECs in a mitochondria-dependent manner by suppressing hexokinase 2 expression. *Exp Ther Med* 18, 621–629 (2019)

141. Zhang, L., Wang, J., Liang, J., Feng, D., Deng, F., Yang, Y., Lu, Y., Hu, Z.: Propofol prevents human umbilical vein endothelial cell injury from Ang II-induced apoptosis by activating the ACE2-(1-7)-Mas axis and eNOS phosphorylation. *PLoS One* 13, e0199373 (2018)

142. Zhao, Z., Zhang, F., Xu, M., Huang, K., Zhong, W., Cai, W., Yin, Z., Huang, S., Deng, Z., Wei, M., Xiong, J., Hawkey, P.M.: Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J Med Microbiol* 52, 715–720 (2003)

143. 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.: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273 (2020)

7. Anhang

7.1 Paarweise vergleichende Analyse der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 von Peptid-Kombinationen in Abhängigkeit von der Substrat- und Peptid-Konzentration

Tabelle 22: Signifikanzprüfung (p-Wert) der ACE2-Aktivität von Peptid-Kombinationen in Abhängigkeit von der Peptid- und Substrat-Konzentration.

Auflistung der p-Werte aller paarweisen Peptid-Kombinationen in Abhängigkeit von der Substrat- und Peptid-Konzentration. Signifikant unterschiedliche Peptid-Kombinationen sind mit einem Stern (*) markiert, wobei die Anzahl der Sterne den Grad der Signifikanz widerspiegeln (s. Signifikanz-Code). Ein p-Wert < 0,05 gilt als statistisch signifikant.

(ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym; AT = Angiotensin;
Positivkontrolle = Reaktion von ACE2 und fluorogenem Substrat ohne Zusatz von Angiotensinen;
*Signifikanz-Code: *** = < 0,001, ** = < 0,01, * = < 0,05)*

Substrat-Konzentration (µM)	Peptid-Kombination	Peptid-Konzentration (10 µM)	Peptid-Konzentration (33 µM)
		p-Wert	
5	AT 1-6 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	AT 1-7 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	AT 2-6 / AT 1-5	0,815	< 0,001 ***
5	AT 2-7 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	AT 3-7 / AT 1-5	0,064	< 0,001 ***
5	Positivkontrolle / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	AT 1-7 / AT 1-6	0,137	0,146
5	AT 2-6 / AT 1-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	AT 2-7 / AT 1-6	< 0,001 ***	0,00201 **
5	AT 3-7 / AT 1-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	Positivkontrolle / AT 1-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	AT 2-6 / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	AT 2-7 / AT 1-7	0,0470*	0,825
5	AT 3-7 / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	Positivkontrolle / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	AT 2-7 / AT 2-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	AT 3-7 / AT 2-6	0,754	0,034 *
5	Positivkontrolle / AT 2-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	AT 3-7 / AT 2-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	Positivkontrolle / AT 2-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
5	Positivkontrolle / AT 3-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***

Tabelle 22: Signifikanzprüfung (p-Wert) der ACE2-Aktivität von Peptid-Kombinationen in Abhängigkeit von der Peptid- und Substrat-Konzentration (Fortsetzung).

Substrat-Konzentration (µM)	Peptid-Kombination	Peptid-Konzentration (10 µM)	Peptid-Konzentration (33 µM)
		p-Wert	
1,67	AT 1-6 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	AT 1-7 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	AT 2-6 / AT 1-5	0,999	< 0,001 ***
1,67	AT 2-7 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	AT 3-7 / AT 1-5	0,604	0,0179*
1,67	Positivkontrolle / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	AT 1-7 / AT 1-6	0,054	0,124
1,67	AT 2-6 / AT 1-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	AT 2-7 / AT 1-6	< 0,001 ***	0,00375 **
1,67	AT 3-7 / AT 1-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	Positivkontrolle / AT 1-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	AT 2-6 / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	AT 2-7 / AT 1-7	0,015 *	0,923
1,67	AT 3-7 / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	Positivkontrolle / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	AT 2-7 / AT 2-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	AT 3-7 / AT 2-6	0,291	0,027*
1,67	Positivkontrolle / AT 2-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	AT 3-7 / AT 2-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	Positivkontrolle / AT 2-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1,67	Positivkontrolle / AT 3-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1	AT 1-6 / AT 1-5	0,003**	< 0,001 ***
1	AT 1-7 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1	AT 2-6 / AT 1-5	0,997	0,028*
1	AT 2-7 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1	AT 3-7 / AT 1-5	0,948	0,068
1	Positivkontrolle / AT 1-5	0,00740 **	0,00562 **
1	AT 1-7 / AT 1-6	0,767	0,896
1	AT 2-6 / AT 1-6	< 0,001 ***	0,00378 **
1	AT 2-7 / AT 1-6	0,011*	0,611
1	AT 3-7 / AT 1-6	0,089	0,001**
1	Positivkontrolle / AT 1-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1	AT 2-6 / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1	AT 2-7 / AT 1-7	0,440	0,999
1	AT 3-7 / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1	Positivkontrolle / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1	AT 2-7 / AT 2-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1	AT 3-7 / AT 2-6	0,676	0,999
1	Positivkontrolle / AT 2-6	0,04847 *	< 0,001 ***
1	AT 3-7 / AT 2-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1	Positivkontrolle / AT 2-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
1	Positivkontrolle / AT 3-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***

Tabelle 22: Signifikanzprüfung (p-Wert) der ACE2-Aktivität von Peptid-Kombinationen in Abhängigkeit von der Peptid- und Substrat-Konzentration (Fortsetzung).

Substrat-Konzentration (µM)	Peptid-Kombination	Peptid-Konzentration (10 µM)	Peptid-Konzentration (33 µM)
		p-Wert	
0,71	AT 1-6 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	AT 1-7 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	AT 2-6 / AT 1-5	0,969	< 0,001 ***
0,71	AT 2-7 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	AT 3-7 / AT 1-5	0,798	0,003**
0,71	Positivkontrolle / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	AT 1-7 / AT 1-6	0,030*	0,215
0,71	AT 2-6 / AT 1-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	AT 2-7 / AT 1-6	< 0,001 ***	0,38386
0,71	AT 3-7 / AT 1-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	Positivkontrolle / AT 1-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	AT 2-6 / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	AT 2-7 / AT 1-7	0,461	0,999
0,71	AT 3-7 / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	Positivkontrolle / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	AT 2-7 / AT 2-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	AT 3-7 / AT 2-6	0,231	0,998
0,71	Positivkontrolle / AT 2-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	AT 3-7 / AT 2-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	Positivkontrolle / AT 2-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,71	Positivkontrolle / AT 3-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,56	AT 1-6 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,56	AT 1-7 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,56	AT 2-6 / AT 1-5	0,823	0,013*
0,56	AT 2-7 / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,56	AT 3-7 / AT 1-5	0,852	0,064
0,56	Positivkontrolle / AT 1-5	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,56	AT 1-7 / AT 1-6	0,999	0,797
0,56	AT 2-6 / AT 1-6	< 0,001 ***	0,00725 **
0,56	AT 2-7 / AT 1-6	0,032*	0,182
0,56	AT 3-7 / AT 1-6	0,031*	0,001**
0,56	Positivkontrolle / AT 1-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,56	AT 2-6 / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,56	AT 2-7 / AT 1-7	0,074	0,948
0,56	AT 3-7 / AT 1-7	0,012	< 0,001 ***
0,56	Positivkontrolle / AT 1-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,56	AT 2-7 / AT 2-6	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,56	AT 3-7 / AT 2-6	0,108	0,999
0,56	Positivkontrolle / AT 2-6	0,001**	< 0,001 ***
0,56	AT 3-7 / AT 2-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,56	Positivkontrolle / AT 2-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***
0,56	Positivkontrolle / AT 3-7	< 0,001 ***	< 0,001 ***

7.2 Rohdaten der Aktivität des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) 2 mit und ohne Zusatz von Angiotensinen

Tabelle 23: Rohdaten des enzymbasierten Assays *Hemmung der ACE2-Aktivität durch Angiotensine*.

Die ACE2-Aktivität mit und ohne Zusatz von Angiotensinen ist für jede Kombination aus Substrat- und Peptid-Konzentration mit der dazugehörigen Standardabweichung aufgezeigt. Die ACE2-Aktivität ergab sich aus der initialen Steigung der Fluoreszenzintensität, welche als Regression über den gesamten Messzeitraum von 20 min und einer Extrapolation auf den Startzeitpunkt der Messung ermittelt wurde.

(ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym; AT = Angiotensin; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Positivkontrolle = Reaktion von ACE2 und fluorogenem Substrat ohne Zusatz von Angiotensinen)

Substrat-Konzentration (µM)	Art des Peptids	Peptid-Konzentration (µM)	MW ACE2-Aktivität (µM)	SD ACE2-Aktivität (µM)
5	AT 1-7	33	21,080	1,228
1,67	AT 1-7	33	6,582	0,837
1	AT 1-7	33	3,740	0,519
0,71	AT 1-7	33	1,360	1,315
0,56	AT 1-7	33	2,151	0,233
5	AT 1-7	10	50,110	6,150
1,67	AT 1-7	10	15,970	2,151
1	AT 1-7	10	9,308	1,194
0,71	AT 1-7	10	6,273	0,421
0,56	AT 1-7	10	5,730	1,339
5	AT 1-6	33	31,622	3,787
1,67	AT 1-6	33	10,477	1,515
1	AT 1-6	33	5,446	0,929
0,71	AT 1-6	33	3,482	0,449
0,56	AT 1-6	33	3,251	0,342
5	AT 1-6	10	60,203	7,680
1,67	AT 1-6	10	19,515	2,703
1	AT 1-6	10	11,163	1,425
0,71	AT 1-6	10	8,135	1,198
0,56	AT 1-6	10	5,914	1,394
5	AT 2-7	33	15,448	1,745
1,67	AT 2-7	33	4,905	0,864
1	AT 2-7	33	3,007	0,794
0,71	AT 2-7	33	1,642	0,214
0,56	AT 2-7	33	1,350	0,246
5	AT 2-7	10	38,432	2,444
1,67	AT 2-7	10	11,917	1,370
1	AT 2-7	10	6,822	0,878
0,71	AT 2-7	10	5,124	0,791
0,56	AT 2-7	10	3,920	0,431

Tabelle 23: Rohdaten des enzymbasierten Assays *Hemmung der ACE2-Aktivität durch Angiotensine* (Fortsetzung).

Substrat-Konzentration (µM)	Art des Peptids	Peptid-Konzentration (µM)	MW ACE2-Aktivität (µM)	SD ACE2-Aktivität (µM)
5	AT 1-5	33	87,857	13,103
1,67	AT 1-5	33	27,731	4,714
1	AT 1-5	33	15,258	2,822
0,71	AT 1-5	33	11,594	2,066
0,56	AT 1-5	33	8,651	1,773
5	AT 1-5	10	90,924	15,933
1,67	AT 1-5	10	28,027	3,643
1	AT 1-5	10	15,928	2,096
0,71	AT 1-5	10	11,589	1,884
0,56	AT 1-5	10	8,752	2,051
5	AT 2-6	33	55,617	4,438
1,67	AT 2-6	33	18,115	1,975
1	AT 2-6	33	10,764	1,048
0,71	AT 2-6	33	7,716	0,754
0,56	AT 2-6	33	6,015	0,490
5	AT 2-6	10	85,511	10,569
1,67	AT 2-6	10	28,621	3,702
1	AT 2-6	10	16,669	1,942
0,71	AT 2-6	10	12,136	1,396
0,56	AT 2-6	10	9,627	1,390
5	AT 3-7	33	68,399	10,920
1,67	AT 3-7	33	22,828	2,381
1	AT 3-7	33	11,201	2,424
0,71	AT 3-7	33	8,198	1,021
0,56	AT 3-7	33	6,421	2,018
5	AT 3-7	10	79,667	11,202
1,67	AT 3-7	10	25,946	3,380
1	AT 3-7	10	14,628	3,598
0,71	AT 3-7	10	10,749	2,050
0,56	AT 3-7	10	7,914	2,014
5	Positivkontrolle	-	120,048	9,855
1,67	Positivkontrolle	-	35,476	4,038
1	Positivkontrolle	-	20,421	4,033
0,71	Positivkontrolle	-	15,484	1,824
0,56	Positivkontrolle	-	12,199	1,620

8. Danksagung

In erster Linie geht mein Dank an meinen Doktorvater PD. Dr. rer. nat. Markus Hoenicka, welcher mir bei Fragen und Problemen stets zuverlässig zur Seite stand. Seine Anregungen bezüglich wissenschaftlichem Denken und Arbeiten haben mich nachhaltig geprägt und zu meiner fachlichen Entwicklung beigetragen. Besonders in der letzten Phase der Fertigstellung dieser Dissertation war er mir eine sehr große Hilfe und trug maßgeblich zur Vollendung der Arbeit bei.
In diesem Zusammenhang möchte ich auch Professor Dr. med. Andreas Liebold für die Möglichkeit der Promotion in der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie danken.

Des Weiteren gilt mein Dank dem BMBF für die finanzielle Unterstützung meiner Dissertation im Rahmen des Projekts *STAMINA-Cov19*.

Ich danke Sara Bergmann für ihre stetige Unterstützung im Labor und die Hilfestellung bei der Durchführung der Labormethoden. Auch bedanke ich mich bei ihr hinsichtlich der präzisen Einarbeitung in das Arbeiten mit Zellkulturen und das Erlernen der Labortechniken. Sie hatte darüber hinaus stets ein offenes Ohr für mich und bei aufkommenden Problemen eine Lösung parat.

Zudem bedanke ich mich bei dem vorherigen Doktoranden meiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der Stammlösungen der Angiotensine und den fachlichen Austausch darüber.

Auch möchte ich meinen Dank an die Mitarbeitenden des Traumalabors am Universitätsklinikum Ulm für den Zugang und die Mitbenutzung des Spark-Multimode-Mikroplattenlesers des Forschungslabors der Klinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie aussprechen. Bei Unklarheiten bezüglich der Anwendung des Messgeräts wurde mir zu jeder Zeit zuverlässig weitergeholfen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei dem zuständigen Sales Specialist Detection der Firma Tecan Deutschland GmbH, welcher mir bei den Einstellungen des Messprotokolls des Spark-Multimode-Mikroplattenlesers behilflich war.

Zum Abschluss danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für die tatkräftige Unterstützung von Beginn an. Sie haben mich in allen Phasen dieser Arbeit und meines gesamten Studiums begleitet und standen mir darüber hinaus mit Rat und Tat jederzeit zur Seite. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen, daher ist diese Dissertation ihnen gewidmet.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Amelie Lena Bogenschütz
Geburtsjahr:	1999

Bildungsweg

10/2018 – 12/2025:	**Studium der Humanmedizin** Universität Ulm
09/2020:	**Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**
10/2024:	**Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**
11/2025:	**Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**
2021 – 2026:	**Promotion** Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Ulm; Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Andreas Liebold Leiter Forschungslabor: PD. Dr. rer. nat. Markus Hoenicka

Praktische Erfahrungen

09/2017 – 08/2018:	**Bundesfreiwilligendienst** Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Universitätsklinikum Tübingen; Intensivstation 39
11/2020 – 01/2021:	**Studentische Aushilfe** Universitätsklinikum Ulm; COVID-Station (CF5)
05/2021:	**Studentische Aushilfe** Universitätsklinikum Ulm; Abteilung Neonatologie

07/2021:	**Wissenschaftliche Hilfskraft** Universitätsklinikum Ulm; Peer Teaching Rachenabstrich/Blutentnahme
10/2023 – 09/2024:	**Studentische Tutorin** Universitätsklinikum Ulm; Zentrum für Chirurgie
11/2024 – 03/2025:	**Praktisches Jahr: Tertial Innere Medizin** Universitätsklinikum Heidelberg
03/2025 – 06/2025:	**Praktisches Jahr: Tertial Pädiatrie** München Klinik Schwabing/Klinikum rechts der Isar (Technische Universität München)
06/2025 – 10/2025:	**Praktisches Jahr: Tertial Chirurgie** Universitätsklinikum Ulm

Berufliche Tätigkeiten

seit 03/2026:	**Assistenzärztin** Universitätsklinikum Regensburg; Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin