

MMD GmbH & Co. KG

Post Covid- /Post Vac-Syndrom

Die Rolle von SARS-CoV-2 Spikeproteinen

Prof. Dr. Brigitte König

4.8.2023

INHALTSVERZEICHNIS

Die Rolle von SARS-CoV-2 Spikeproteinen bei Post Covid- /Post Vac-Syndrom	2
Ursachen von Post Covid-/Post Vac Syndrom	2
SARS-CoV-2 Spikeprotein (S-Protein) - Wirtsrezeptorbindung.....	2
SARS-CoV-2 Spikeprotein (S-Protein) - Zelltropismus.....	3
SARS-CoV-2 Spikeprotein (S-Protein) – Pathogenese.....	3
Nachweismethoden rund um das SARS-CoV-2 Spikeprotein.....	4
Analyse persistierender SARS-CoV-2 Spikeproteine	4
Quantitative Bestimmung des SARS-CoV-2 Spikeproteins in Plasma/Serum.....	4
Quantitative Bestimmung des SARS-CoV-2 Spikeproteins in Exosomen	4
Quantitative Bestimmung des SARS-CoV-2 Spikeproteins in Immunzellen (PBMC)	5
Analyse persistierender Impf-mRNA	5
Nachweis von Impf-mRNA in Exosomen	5
Nachweis von Impf-mRNA in Immunzellen (PBMC).....	6
Nachweis von Impf-mRNA in Muttermilch.....	6
Analyse einer SARS-CoV-2 Persistenz	6
Nachweis von SARS-CoV-2 RNA in Serum (hoch sensitiv)	7
Nachweis von SARS-CoV-2 RNA in Immunzellen	7
Nachweis von SARS-CoV-2 RNA im Stuhl	7
Nachweis von SARS-CoV-2 RNA im Samen.....	7
Nachweis von restlicher dnA und/oder RNA aus den Impfstoffen	8
Integration der Impf-mRNA in das Genom	8
Nachweis der Impf-mRNA-Spikesequenz im Zellkern	9
Nachweis des SV-40 Enhancer der SARS-CoV-2 mRNA Expressionsvektoren	9
Nachweis der Expressionsvektoren (Plasmide) von Pfizer/Moderna in Darmbakterien.....	9
Ausgewählte Literatur	11
Auftragsformular	12

DIE ROLLE VON SARS-COV-2 SPIKEPROTEINEN BEI POST COVID- /POST VAC-SYNDROM

URSACHEN VON POST COVID-/POST VAC SYNDROM

Zu den derzeitigen Hypothesen der zugrundeliegenden Pathophysiologie, die sehr wahrscheinlich oft in Kombination auftreten und sich auch gegenseitig bedingen, gehören:

- Die Auslösung einer gestörten Immuntoleranz und damit einhergehender Autoimmunität nach der akuten Virusinfektion (Post-Covid) bzw. durch die Auseinandersetzung mit dem Impfantigen (Post-Vac). mikro-/und makrovaskuläre thromboembolische Ereignisse und nicht reparierte Gewebeschäden
- eine Dysbiose des intestinalen Mikrobioms
- Niedrige Level an Stresshormonen, schwelende Entzündungsreaktionen, Stoffwechseleränderungen
- Mitochondriale Dysfunktion
- reaktivierte Virusinfektionen, wie z.B. CMV, EBV oder andere Herpesviren
- persistierende SARS-CoV-2-Viren und/oder Spike-Proteine (Infektion/Impfung) in Geweben oder im Blut.

DAS SPIKE-PROTEIN IST EIN MULTIFUNKTIONALES PROTEIN, DAS ZUR WIRTSREZEPTORBINDUNG, ZUM ZELLTROPISMUS UND ZUR PATHOGENESE BEITRÄGT

SARS-COV-2 SPIKEPROTEIN (S-PROTEIN) - WIRTSREZEPTORBINDUNG

Das SARS-CoV-2 (Coronavirus mit schwerem akutem respiratorischem Syndrom, das für die Krankheit COVID-19 verantwortlich ist) nutzt die Spike-Proteine seiner Hülle, um vor allem die Zellen zu infizieren, die auf der

Membran das Enzym Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) exprimieren. Das ACE2 (Angiotensin-Converting-Enzym) fungiert als Haupt-Rezeptor.

Es scheint, dass SARS-CoV-2 auch weitere Strukturen auf der Zelloberfläche als Rezeptoren verwenden kann, z.B. Integrine. Darüber hinaus sind weitere Eintrittsmechanismen vorstellbar, die aber untergeordnete Rollen spielen.

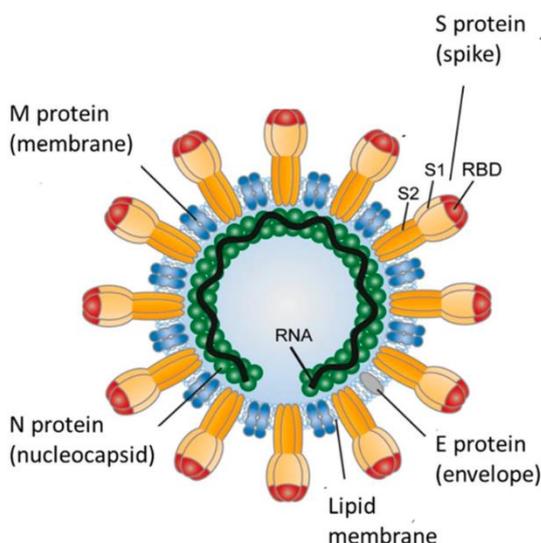


Abbildung 1: Struktur des SARS-CoV-2, ein RNA-Virus, das ein Nucleokapsid-Phosphoprotein (N), ein Membran-Glykoprotein (M), eine Hülle (E), ein Spike-Glykoprotein (S) und ein Nichtstrukturprotein kodiert.

SARS-COV-2 SPIKEPROTEIN (S-PROTEIN) - ZELLTROPISMUS

ACE2, der Rezeptor für das SARS-CoV-2 Virus, liegt membrangebunden auf der Oberfläche mehrerer Zelltypen vor. In hoher Konzentration ist ACE2 insbesondere zu finden auf der Schleimhaut der oberen Atemwege, des Gastrointestinaltraktes, im Flimmerepithel der Eileiter, im Endothel, in den Blutplättchen und in löslicher Form im Plasma. Somit kann das Virus in viele Organe/Gewebe eindringen und zu Funktionsstörungen führen.

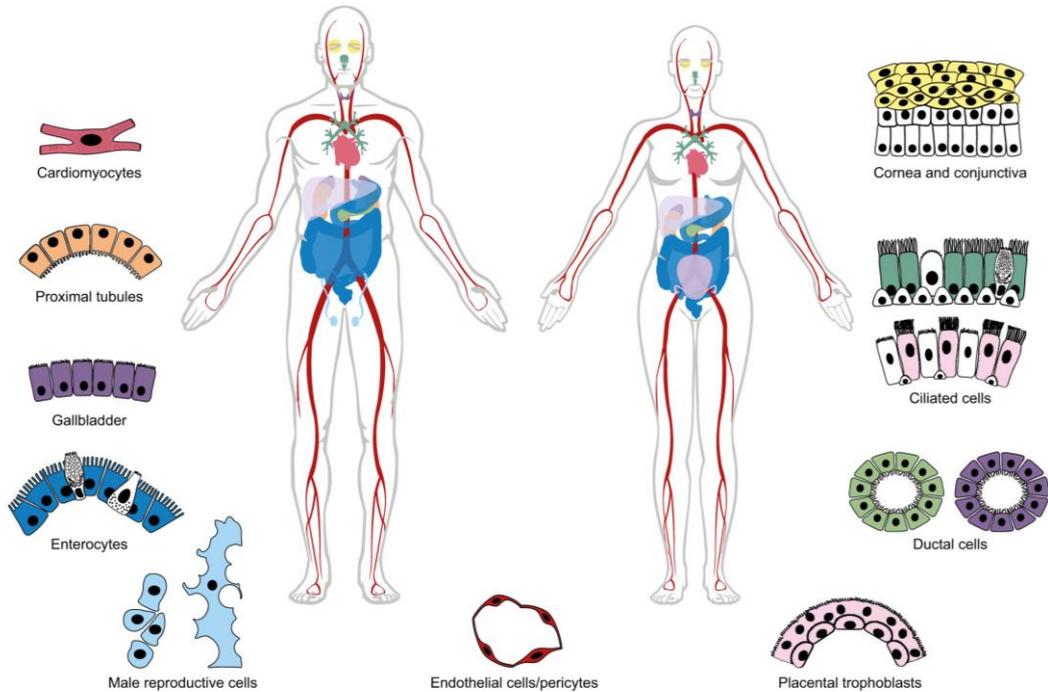


Abbildung 2: Gewebe mit hohen Konzentrationen an ACE2, dem Rezeptor für das SARS-CoV-2.

SARS-COV-2 SPIKEPROTEIN (S-PROTEIN) – PATHOGENESE

Das SARS-CoV-2 Spikeprotein dient dem Virus nicht nur zum Eintritt in eine Zielzelle. Das SARS-CoV-2 S-Protein übt auch in Abwesenheit anderer viraler Komponenten direkte Wirkungen auf menschliche Zellen aus. Freies Spikeprotein bindet z.B. ebenso an ACE-2, sowie an spezifische Acetylcholinrezeptoren (nicotinic acetylcholine receptors; nAChRcl) und kann potenzielle toxikologischen Probleme hervorrufen.



Es mehren sich die Hinweise, dass das SARS-CoV-2 Spikeprotein direkt Mitochondrien schädigt und/oder die Bioenergetik der Mitochondrien verändert. Diese Effekte konnten insbesondere in Gehirnzellen, Herzmuskelzellen und Muskelzellen nachgewiesen werden.

Weiterführende mitochondriale Diagnostik finden Sie auf unserer Homepage www.mmd-web.de (z.B. Auftragsformular II_B; BHI Premium).

Abbildung 3: Das Mitochondrion

NACHWEISMETHODEN RUND UM DAS SARS-COV-2 SPIKEPROTEIN

Die nachfolgend aufgeführten Testassays sind mit wenigen Ausnahmen (quantitative Bestimmung von Spikeproteinen in Plasma/Serum) nicht für den Hochdurchsatz geeignet. Um eine hohe Sensitivität und Spezifität mit einer optimalen Nachweisgrenze zu erreichen, sind die einzelnen Untersuchungsschritte labor- und Personalintensiv. Die meisten Bearbeitungsschritte sind nicht automatisierbar. Eine Bereitstellung der Ergebnisse kann daher in Abhängigkeit des Testes bis zu 10 Tagen dauern.

ANALYSE PERSISTIERENDER SARS-COV-2 SPIKEPROTEINE

Es kann aktuell nicht zwischen den Spikeproteinen der verschiedenen SARS-CoV-2 Varianten und dem Spikeprotein nach Impfung unterschieden werden. Wir arbeiten mit Hochdruck an der Unterscheidung der Spikeproteine und deren eindeutige Zuordnung zu den Virusvarianten bzw. der SARS-CoV-2 Impfung.

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES SARS-COV-2 SPIKEPROTEINS IN PLASMA/SERUM

Es wird das freie SARS-CoV-2 Spikeprotein nachgewiesen, welches nicht an Antikörper gebunden ist. Der Nachweis erfolgt mittels ELISA. Die Nachweisgrenze ist 4,5pg/ml. Jeder Nachweis des Spikeproteins ist mit den Beschwerden abzugleichen.

- Das Spikeprotein wird mittels ELISA nachgewiesen. Die Nachweisgrenze beträgt 4,5pg/ml Serum.

Das an Antikörper gebundene Spikeprotein können wir nicht nachweisen. Daher empfehlen wir die parallele Bestimmung von Gesamt anti-SARS-CoV-2-IgG sowie die quantitative Bestimmung der neutralisierenden Kapazität der IgG Antikörper gegenüber dem Original Virus SARS-CoV-2 (WUHAN) und den Varianten Alpha, Beta, Gamma, Delta und Omicron (Unser Auftragsformular VIII; Punkt 1.1).

DER NACHWEIS DES SARS-COV-2 SPIKEPROTEINS IN PLASMA/SERUM IST EIN DEUTLICHER HINWEIS AUF PERSISTIERENDES SPIKEPROTEIN.

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES SARS-COV-2 SPIKEPROTEINS IN EXOSOMEN

Ein wichtiges Kommunikationsnetzwerk zwischen Zellen besteht aus extrazellulären Vesikeln (EVs), die ständig von einer Zelle freigesetzt und später von einer anderen Zelle aufgenommen werden, die sich in einem entfernten Organ befinden könnte. Kleine Vesikel, sogenannte Exosomen, können eine vielfältige Sammlung biologisch aktiver Moleküle liefern, darunter mRNA, microRNAs (miRNAs), Proteine und Lipide.

Es konnte gezeigt werden, dass die Proteine des SARS-CoV-2, aber ebenso die produzierten Proteine nach der Impfung in extrazelluläre Vesikel (Exosomen) verpackt und über den Blutstrom an Gewebe/Organe verteilt werden. So kann das SARS-CoV-2 Spikeprotein über den Transport in Exosomen zu Organen mit höherer Dichte an relevanten Rezeptoren für das Spikeprotein gelangen.

- Es werden die Spikeprotein in aufgereinigten Exosomen aus etwa 4ml Serum/Plasma nachgewiesen.

DER NACHWEIS DES SARS-COV-2 SPIKEPROTEINS IN EXOSOMEN IST EIN DEUTLICHER HINWEIS FÜR EINE SYSTEMISCHE WIRKUNG DES SPIKEPROTEINS.

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES SARS-COV-2 SPIKEPROTEINS IN IMMUNZELLEN (PBMC)

Spikeproteine befinden sich vorrangig in Geweben/Organen, die eine hohe Dichte an ACE-2 als Virusrezeptor haben. Somit entziehen sich die Spikeproteine dem Nachweis im Serum.

Konventionelle immunologische Erkenntnisse lehren, dass Antigen-präsentierende Zellen (insbesondere Makrophagen) extrazelluläre potenziell pathogene Partikel mithilfe einer Reihe geeigneter Rezeptoren „einfangen“. Diese Partikel werden dann durch Endozytose oder Phagozytose (abhängig von der Partikeldimension und dem Zelltyp) internalisiert, in kleine Peptide (ca. 30 Aminosäuren) „verarbeitet“ (d. h. verdaut) und schließlich dem weiteren Abbau zugeführt..

Das irgendwo im Körper vorhandene Spikeprotein wird also von Makrophagen aufgenommen und kann in diesen, die eine Fraktion in den Immunzellen darstellen, nachgewiesen werden.

- Es werden die Spikeprotein in aufgereinigten Immunzellen (1×10^6) nachgewiesen.

DER NACHWEIS DES SARS-COV-2 SPIKEPROTEINS IN IMMUNZELLEN IST EIN DEUTLICHER HINWEIS FÜR DIE PRODUKTION DES SPIKEPROTEINS IM KÖRPER.

Ein negatives Ergebnis auf das SARS-CoV-2 Spikeprotein schließt seine Anwesenheit im Körper nicht aus. Bei weiterbestehendem Verdacht auf persistierendes SARS-CoV-2 Spikeprotein ist die Untersuchung zu wiederholen (Plasma/Serum; Exosomen, Immunzellen).

ANALYSE PERSISTIERENDER IMPF-MRNA

Als Quelle persistierender SARS-CoV-2 Spikeproteine kommt bei geimpften Personen die Impf-mRNA in Betracht. Da sich die Sequenz der Impf-mRNA von der Sequenz des SARS-CoV-2 unterscheidet, kann die Impf-mRNA einwandfrei von der Virus-RNA unterschieden werden.

Der Nachweis auf Impf-mRNA erfasst Comirnaty (BioNTech/Pfizer) und Spikevax (Moderna) sowie Vaxzevria (AstraZeneca).

NACHWEIS VON IMPF-MRNA IN EXOSOMEN

Untersuchungen haben gezeigt, dass Impf-mRNA auch noch 1 Monat nach der Impfung im Serum nachweisbar sein kann. Es ist unwahrscheinlich, dass Impf-mRNA lange Zeit nach der Impfung im Serum nachweisbar ist.

Allerdings dienen Exosomen, also extrazelluläre Vesikel, dem Transport von mRNA, auch der Impf-mRNA. Exosomen können ihre Fracht überall im Körper aufnehmen und ebenso verteilen.

- Es wird die mRNA in aufgereinigten Exosomen aus etwa 4ml Serum/Plasma mittels RT-PCR quantitativ nachgewiesen

DER NACHWEIS VON IMPF-MRNA IN EXOSOMEN UNZELLEN IST EIN DEUTLICHER HINWEIS FÜR EINE PERSISTENZ DER IMPF-MRNA.

NACHWEIS VON IMPF-MRNA IN IMMUNZELLEN (PBMC)

Virale RNA wird von den menschlichen Zellen als fremd erkannt und löst dadurch Abwehrreaktionen aus, die ihre Übersetzung in Proteine beeinträchtigen und gleichzeitig ihren Abbau steuern. Die SARS-CoV-2-Spike-Glykoprotein-mRNA wurde „humanisiert“, um die mRNA zu stabilisieren und damit ihre Translation zu verbessern. So wurde eine Guanin-methylierte Kappe, 3'- und 5'-untranslatierte Regionen (UTRs), die von denen menschlicher Proteine kopiert wurden, und schließlich ein langer Poly(A)-Schwanz hinzugefügt. Der Ersatz von Uridinen durch Pseudouridine oder (noch besser) durch Methylpseudouridin verhindert die Erkennung als fremde mRNA durch die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) und die anschließende Aktivierung von IFN Typ I.

Ob die Impf-mRNA in Immunzellen, z.B. in langlebigen Gedächtniszellen, persistieren kann, ist nicht bekannt. Es ist bislang auch nicht bekannt, ob Makrophagen die Impf-mRNA, die sich in Exosomen befinden, wieder aufnehmen.

- Es wird die mRNA in aufgereinigten Immunzellen (1×10^6) mittels RT-PCR quantitativ nachgewiesen.

DER NACHWEIS VON IMPF-MRNA IN IMMUNZELLEN IST EIN DEUTLICHER HINWEIS FÜR EINE PERSISTENZ DER IMPF-MRNA.

NACHWEIS VON IMPF-MRNA IN MUTTERMILCH

Es konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass sich die mRNA des COVID-19-Impfstoffs von Pfizer/Moderna in der abgepumpten Muttermilch (EBM) von stillenden Personen befindet.

Für den Nachweis der mRNA wird die gesamte Muttermilch und eine angereicherte Exosomenfraktion der Muttermilch (etwa 3ml) analysiert.

- Es wird die mRNA in unfraktionierter Muttermilch (1ml) als auch in aufgereinigten Exosomen aus etwa 4ml Muttermilch mittels RT-PCR quantitativ nachgewiesen.

DER NACHWEIS VON IMPF-MRNA DER MUTTERMILCH IST KEIN BEWEIS FÜR DIE BILDUNG VON SPIKEPROTEINEN UND LÄSST NICHT AUF EINE MÖGLICHE KUMULATIVE IMPFSTOFF-MRNA-EXPOSITION NACH HÄUFIGEM STILLEN BEI SÄUGLINGEN SCHLIEßEN.**ANALYSE EINER SARS-COV-2 PERSISTENZ**

Eine umfangreiche Metaanalyse von Cevik et al. weist darauf hin, dass die Virusausscheidung (wie durch PCR nachgewiesen) bei einer breiten Probenentnahme über längere Zeiträume andauern kann. Die maximale Dauer der viralen RNA-Ausscheidung betrug 83 Tage oberen Atemwegen, 59 Tage in den unteren Atemwegen, 126 Tage in Stuhlproben und 60 Tage in Serumproben. Allerdings wurde für die Analysen geringe Mengen an Material verwendet (Serum, Stuhl).

Eine wichtige Frage bezüglich der Persistenz von Post Covid- /Post Vac- Symptomen ist weiterhin:

- **Korrelieren die Symptome mit einer möglichen Persistenz des Virus in verschiedenen Kompartimenten?**

NACHWEIS VON SARS-COV-2 RNA IN SERUM (HOCH SENSITIV)

Der Nachweis von RNA im Blut während der akuten Phase von COVID-19 korrelierte in verschiedenen Studien mit dem PASC-Risiko, obwohl bei diesen Patienten die RNA nach mehreren Monaten im Allgemeinen kaum noch nachweisbar ist (Su et al., 2022).

- Alle in etwa 4ml Serum/Plasma befindlichen Viren werden mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Anschließend wird mittels quantitativer RT-PCR auf SARS-CoV-2 RNA analysiert.

NACHWEIS VON SARS-COV-2 RNA IN IMMUNZELLEN

Virale RNA wird von den menschlichen Zellen als fremd erkannt und löst dadurch Abwehrreaktionen aus, die ihre Übersetzung in Proteine beeinträchtigen und gleichzeitig ihren Abbau steuern. Ob das SARS-CoV-2 Virus in Immunzellen, z.B. in langlebigen Gedächtniszellen, persistieren kann, ist nicht bekannt. Es ist bislang auch nicht bekannt, ob Makrophagen das Virus, welches sich irgendwo im Körper befindet, wieder aufnehmen.

- Es wird die SARS-CoV-2-spezifische mRNA in aufgereinigten Immunzellen (1×10^6) mittels RT-PCR quantitativ nachgewiesen. Wir verwenden drei verschiedene Abschnitte der SARS-CoV-2 mRNA, die für die Rezeptorbindestelle des SARS-CoV-2 Spikeproteins (RBD), das Spikeprotein außerhalb von RBD (S), und das Hüllprotein (E) kodieren.

DER NACHWEIS VON SARS-COV-2 MRNA IN IMMUNZELLEN IST EIN DEUTLICHER HINWEIS FÜR EINE PERSISTENZ DES VIRUS

NACHWEIS VON SARS-COV-2 RNA IM STUHL

Einer der bisher größten Autopsieserien von Patienten mit COVID-19 zeigte deutliche Hinweise auf eine Infektion des Dünndarms durch SARS-CoV-2. Somit ist SARS-CoV-2 in der Lage, den Magen-Darm-Trakt zu infizieren. Dieser postulierte Gastrointestinaltrakt-Tropismus von SARS-CoV-2 entspricht der Tatsache dass andere Betacoronaviren, die Säugetiere infizieren, Magen-Darm-Erkrankungen verursachen können.

Die bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Darm von Personen mit POST COVID ein Virusreservoir ist.

- Aus einem Aliquot einer Stuhlprobe wird die gesamte RNA isoliert und auf die Anwesenheit von SARS-CoV-2 RNA analysiert.

NACHWEIS VON SARS-COV-2 RNA IM SAMEN

Der Hoden gehört zu dem Gewebe mit hoher Dichte an Angiotensin-Converting-Enzym-2 (ACE-2), den Bindungsstellen für SARS CoV-2. Autopsieberichte haben eine virale Invasion des Hodens gezeigt. Ob das männliche Fortpflanzungsorgan ein Ort viraler Persistenz ist, ist nicht geklärt. Ebenso ungeklärt ist eine mögliche Auswirkung einer viralen Persistenz auf die Spermaqualität.

- Alle in etwa 4ml Samen befindlichen Viren werden mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Anschließend wird mittels quantitativer RT-PCR auf SARS-CoV-2 RNA analysiert.

EIN NEGATIVES ERGEBNIS AUF SARS-COV-2 PERSISTENZ (RNA NACHWEIS) SCHLIEßT SEINE ANWESENHEIT IM KÖRPER NICHT AUS.

EIN POSITIVES ERGEBNIS AUF SARS-COV-2 PERSISTENZ (RNA NACHWEIS) IST KEIN NACHWEIS VON INFEKTIÖSEM VIRUS UND/ODER SPIKEPROTEINPRODUKTION.

NACHWEIS VON RESTLICHER DNA UND/ODER RNA AUS DEN IMPFSTOFFEN

Mit Hilfe Impfspezifischer Analysen können verschiedene Körperflüssigkeiten, (z.B. Blut, Speichel, Sperma), Immunzellen (insbesondere Monozyten/Makrophagen) sowie Gewebe auf Reste von Impfstoffen analysiert werden. Die Impfstoffreste können sowohl mRNA als auch DNA basiert sein.

Wir bieten einen Test an, der 4 Zielsequenzen beinhaltet: 1) Das Impf-Spike (Pfizer, Moderna, Janssen), 2) die „Ori“ Sequenz des Transkriptionsplasmid (VaxOri), welches für die Impfstoffherstellung verwendet wurde; 3) die SV40-Enhancersequenz des Transkriptionsplasmid, welches für die Impfstoffherstellung verwendet wurde; 4) eine Kontrollsequenz (RNAaseP). Es handelt sich um einen Test, bei dem der SV40 Enhancer die höchste Empfindlichkeit bietet. Der SV40Enhancer ist nur auf dem Transkriptionsplasmid im Pfizerimpfstoff vorhanden, sodass ein SV40-Zielversagen mit Spike-positivem qPCR auf eine Moderna-Impfung und nicht auf eine Pfizer-Impfung hinweisen würde. Der RNaseP-Assay bestätigt, dass Sie DNA und/oder RNA ordnungsgemäß aus dem Gewebe isoliert wurde. Das VaxOri ist sowohl in Moderna als auch in Pfizer enthalten, jedoch nicht in Janssen.

Eine Logikmatrix zur Ableitung, welcher Impfstoff sich im Probenmaterial befindet, ist in nachfolgender Tabelle dargestellt. Dies wird komplizierter, wenn Impfstoffe bei demselben Patienten gemischt werden, aber vermutlich wird der zuletzt verabreichte Impfstoff das Signal dominieren.

ZIELSEQUENZ	ERGEBNIS	IMPFSTOFF
SPIKE VAX	Positiv	Pfizer
SPIKE ORI	Positiv	Pfizer
SPIKE SV40	Positiv	Pfizer
RNASEP	positiv	Kontrolle ok
SPIKE VAX	Positiv	Moderna
SPIKE ORI	Positiv	Moderna
SPIKE SV40	Negativ	Moderna
RNASEP	positiv	Kontrolle ok
SPIKE VAX	Positiv	Janssen
SPIKE ORI	Negativ	Janssen
SPIKE SV40	Negativ	Janssen
RNASEP	positiv	Kontrolle ok

INTEGRATION DER IMPF-MRNA IN DAS GENOM

Geht bei einer mRNA Impfung auch ein Teil der RNA in die DNA über - baut sich also in unsere Zellen ein? Diese Frage beschäftigt viele Menschen. Die zentrale Frage nach der möglichen Integration der Impf-mRNA in unser menschliches Genom ist umso aktueller, da in einigen Impfstoffchargen Plasmid DNA nachgewiesen wurde. Obwohl davon auszugehen ist, dass Plasmid-DNA in unseren Zellen (im Zytosol) abgebaut wird, ist ein Transport in den Zellkern nicht auszuschließen. Die Plasmid DNA im Pfizer-Impfstoff enthält den „SV40-Enhancer“, welcher einen Transport in den Zellkern ermöglicht (nukleäres Lokalisierungssignal (NLS)).

NACHWEIS DER IMPF-MRNA-SPIKESEQUENZ IM ZELLKERN

Wir bieten daher den Nachweis von DNA mit der Impf-mRNA-Spikesequenz im Zellkern an.

- Aus Immunzellen oder anderen Zelltypen (z.B. Mundschleimhautzellen, Samenzellen) wird zunächst der Zellkern isoliert. Aus den Zellkernen wird die Gesamt-DNA isoliert. Diese wird auf die Anwesenheit der Spikesequenz des Impfstoffes (Pfizer, Moderna, Janssen) überprüft.

DER NACHWEIS DER IMPF-MRNA SPIKESEQUENZ IN DER ZELLKERN-DNA IST EIN BEWEIS FÜR DIE ÜBERWINDUNG DER ZELLKERNGRENZE DURCH DEN IMPFSTOFF. DER NACHWEIS VON DNA MIT DER IMPF-MRNA-SPIKESEQUENZ IST NICHT BEWEISEND FÜR DIE INTEGRATION DER IMPF-MRNA IN DAS MENSCHLICHE GENOM UND KEIN BEWEIS FÜR EINE STÄNDIGE PRODUKTION DES SPIKEPROTEINS.

NACHWEIS DES SV-40 ENHANCER DER SARS-COV-2 MRNA EXPRESSIONSVEKTOREN

Wir bieten den Nachweis des SV40-Enhancer-Sequenz des Impfstoffs von Pfizer im Zellkern an.

- Aus Immunzellen oder anderen Zelltypen (z.B. Mundschleimhautzellen) wird zunächst der Zellkern isoliert. Aus den Zellkernen wird die Gesamt-DNA isoliert. Diese wird auf die Anwesenheit der SV40-Enhancer Sequenz überprüft.

DER NACHWEIS DER SV40-ENHANCER SEQUENZ IST KEIN NACHWEIS FÜR DEN EINBAU IN DAS MENSCHLICHE GENOM. DER NACHWEIS DER SV40-ENHANCER SEQUENZ DES PFIZER-IMPSTOFFS (COMIRNATY) IM ZELLKERN IST ALLERDINGS EIN NACHWEIS FÜR DIE PERSISTENZ DES IMPFSTOFFS IM MENSCHLICHEN KÖRPER UND INSBESONDERE IM ZELLKERN.

NACHWEIS DER EXPRESSIONSVEKTOREN (PLASMIDE) VON PFIZER/MODERNA IN DARMBAKTERIEN

Obwohl davon auszugehen ist, dass kontaminierende Plasmid-DNA in den mRNA Impfstoffen (Pfizer, Moderna) im menschlichen Körper abgebaut wird, ist ein Transport in unseren Darm bis zum Nachweis des Gegenteils nicht ganz ausgeschlossen. Ob die Plasmid-DNA dann in unsere Darmbakterien, insbesondere in *Escherichia coli* Bakterien, aufgenommen werden kann, bleibt zu überprüfen.

Wir bieten daher den Nachweis der Expressionsvektoren (Pfizer, Moderna) in Darmbakterien an.

- Aliquots einer Stuhlprobe werden aerob/anaerob unter Einsatz der Antibiotika Kanamycin und Neomycin bebrütet. Im Anschluss wird aus den vermehrt angezüchteten Bakterien Plasmide isoliert. Diese werden mittels PCR auf die Anwesenheit der Expressionsvektoren (Plasmide) der mRNA Impfstoffe (Pfizer, Moderna) überprüft (Spike, Vector, SV40).

DER NACHWEIS DER EXPRESSIONSVEKTOREN IST KEIN NACHWEIS FÜR DIE KONTINUIERLICHE BILDUNG VON SARS-COV-2 SPIKEPROTEINEN. DER NACHWEIS DER SV40-ENHACER SEQUENZ DES PFIZER-IMPSTOFFES (COMIRNATY) IST ALLERDINGS EIN NACHWEIS FÜR DIE PERSISTENZ DES IMPFSTOFFS IM MENSCHLICHEN KÖRPER.

AUSGEWÄHLTE LITERATUR

Trougakos IP, Terpos E, Alexopoulos H, Politou M, Paraskevis D, Scorilas A, Kastritis E, Andreakos E, Dimopoulos MA. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. *Trends Mol Med.* 2022 Jul;28(7):542-554. doi: 10.1016/j.molmed.2022.04.007. Epub 2022 Apr 21. PMID: 35537987; PMCID: PMC9021367.

Cosentino M, Marino F. Understanding the Pharmacology of COVID-19 mRNA Vaccines: Playing Dice with the Spike? *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 17;23(18):10881. doi: 10.3390/ijms231810881. PMID: 36142792; PMCID: PMC9502275.

Seneff S, Nigh G, Kyriakopoulos AM, McCullough PA. Innate immune suppression by SARS-CoV-2 mRNA vaccinations: The role of G-quadruplexes, exosomes, and MicroRNAs. *Food Chem Toxicol.* 2022 Jun;164:113008. doi: 10.1016/j.fct.2022.113008. Epub 2022 Apr 15. PMID: 35436552; PMCID: PMC9012513.

Bansal S, Perincheri S, Fleming T, Poulson C, Tiffany B, Bremner RM, Mohanakumar T. Cutting Edge: Circulating Exosomes with COVID Spike Protein Are Induced by BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) Vaccination prior to Development of Antibodies: A Novel Mechanism for Immune Activation by mRNA Vaccines. *J Immunol.* 2021 Nov 15;207(10):2405-2410. doi: 10.4049/jimmunol.2100637. Epub 2021 Oct 15. PMID: 34654691.

Zoe Swank and others, Persistent Circulating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Spike Is Associated With Post-acute Coronavirus Disease 2019 Sequelae, *CLINICAL INFECTIOUS DISEASES*, Volume 76, Issue 3, 1 February 2023, Pages e487–e490, <https://doi.org/10.1093/cid/ciac722>

Pesce E, Manfrini N, Cordiglieri C, Santi S, Bandera A, Gobbin A, Gruarin P, Favalli A, Bombaci M, Cuomo A, Collino F, Cricri G, Ungaro R, Lombardi A, Mangioni D, Muscatello A, Aliberti S, Blasi F, Gori A, Abrignani S, De Francesco R, Biffo S and Grifantini R (2022) Exosomes Recovered From the Plasma of COVID-19 Patients Expose SARS-CoV-2 Spike-Derived Fragments and Contribute to the Adaptive Immune Response. *Front. Immunol.* 12:785941. doi: 10.3389/fimmu.2021.785941

Clough E, Inigo J, Chandra D, Chaves L, Reynolds JL, Aalinkeel R, Schwartz SA, Khmaladze A, Mahajan SD. Mitochondrial Dynamics in SARS-COV2 Spike Protein Treated Human Microglia: Implications for Neuro-COVID. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2021 Dec;16(4):770-784. doi: 10.1007/s11481-021-10015-6. Epub 2021 Oct 2. Erratum in: *J Neuroimmune Pharmacol.* 2021 Dec 11;: PMID: 34599743; PMCID: PMC8487226.

Kim ES, Jeon MT, Kim KS, Lee S, Kim S, Kim DG. Spike Proteins of SARS-CoV-2 Induce Pathological Changes in Molecular Delivery and Metabolic Function in the Brain Endothelial Cells. *Viruses.* 2021 Oct 8;13(10):2021. doi: 10.3390/v13102021. PMID: 34696455; PMCID: PMC8538996.

Huynh TV, Rethi L, Lee TW, Higa S, Kao YH, Chen YJ. Spike Protein Impairs Mitochondrial Function in Human Cardiomyocytes: Mechanisms Underlying Cardiac Injury in COVID-19. *Cells.* 2023 Mar 11;12(6):877. doi: 10.3390/cells12060877. PMID: 36980218; PMCID: PMC10046940.

Cevik M, Kuppalli K, Kindrachuk J, Peiris M. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2 *BMJ* 2020; 371 :m3862 doi:10.1136/bmj.m3862

Cevik M, Tate M, Lloyd O, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding and infectiousness: a living systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe* 2020; (forthcoming) doi:10.1016/S2666-5247(20)30172-5. Google Scholar

Dean DA, Dean BS, Muller S, Smith LC. Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp Cell Res.* 1999 Dec 15;253(2):713-22. doi: 10.1006/excr.1999.4716. PMID: 10585295; PMCID: PMC4152905.

Brojna C, Brojna B, Bisaccia DR, Lauritano F, Marino G, Montano L, Cristoni S, Prisco M, Piscopo M. Could SARS-CoV-2 Have Bacteriophage Behavior or Induce the Activity of Other Bacteriophages? *Vaccines (Basel)*. 2022 Apr 29;10(5):708. doi: 10.3390/vaccines10050708. PMID: 35632464; PMCID: PMC9143435.

Brojna C, Brojna B, Bisaccia DR, Lauritano F, Marino G, Montano L, Cristoni S, Prisco M, Piscopo M. Could SARS-CoV-2 Have Bacteriophage Behavior or Induce the Activity of Other Bacteriophages? *Vaccines (Basel)*. 2022 Apr 29;10(5):708. doi: 10.3390/vaccines10050708. PMID: 35632464; PMCID: PMC9143435.

Prasad TK, Rao NM. The role of plasmid constructs containing the SV40 DNA nuclear-targeting sequence in cationic lipid-mediated DNA delivery. *Cell Mol Biol Lett*. 2005;10(2):203-15. PMID: 16010286.

McKernan, K., Helbert, Y., Kane, L. T., & McLaughlin, S. (2023, April 10). Sequencing of bivalent Moderna and Pfizer mRNA vaccines reveals nanogram to microgram quantities of expression vector dsDNA per dose. <https://doi.org/10.31219/osf.io/b9t7m>

Hanna N, Heffes-Doon A, Lin X, Manzano De Mejia C, Botros B, Gurzenda E, Nayak A. Detection of Messenger RNA COVID-19 Vaccines in Human Breast Milk. *JAMA Pediatr*. 2022 Dec 1;176(12):1268-1270. doi: 10.1001/jamapediatrics.2022.3581. Erratum in: *JAMA Pediatr*. 2022 Nov 1;176(11):1154. PMID: 36156636; PMCID: PMC9513706.

Purpura LJ, Alukal J, Chong AM, Liu L, Cantos A, Shah J, et al. SARS-CoV-2 RNA Shedding in Semen and Oligozoospermia of Patient with Severe Coronavirus Disease 11 Weeks after Infection. *Emerg Infect Dis*. 2022;28(1):196-200. <https://doi.org/10.3201/eid2801.211521>

AUFTRAGSFORMULAR

Auftragsformular Post Covid-/Post VAc-Syndrom

SARS-CoV-2 Spikeprotein, Impf-mRNA, Viruspersistenz,

Ausgabe vom 01.08.2023 |