Eine spezifische Kombination von Naturstoffen ist wirksam bei der Hemmung von SARS-CoV-2 und seinen Varianten Alpha, Beta, Gamma, Delta, Kappa und My

European Journal of Microbiology and Immunology

DOI: 10.1556/1886.2021.00022
© 2021 Die Autoren

ANNA GOC, ALEKSANDRA NIEDZWIECKI*, VADIM IVANOV, SVETLANA IVANOVA und MATTHIAS RATH

Dr. Rath Research Institute, 5941 Optical Ct., San Jose, CA 95138, USA

Erhalten: 30. November 2021 • Genehmigt: 20. Dezember 2021

ORIGINAL-FORSCHUNGSBERICHT

ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der Verfügbarkeit eines Impfstoffs breitet sich COVID-19 durch das Auftreten von Mutationen von SARS-CoV-2 weiterhin weltweit aus. Unsere frühere Forschung wies darauf hin, dass eine bestimmte Kombination pflanzlicher Verbindungen die Bindung von SARS-CoV-2 an den ACE2-Rezeptor hemmen und wichtige Zellmechanismen der viralen Infektiosität kontrollieren kann. In dieser Studie haben wir die Wirksamkeit einer bestimmten Kombination von Pflanzenextrakten und Spurenelementen gegen das ursprüngliche SARS-CoV-2 sowie seine Varianten Alpha, Beta, Gamma, Delta, Kappa und My beurteilt. Die Zusammensetzung aus Vitamin C, N-Acetylcystein, Resveratrol, Theaflavin, Curcumin, Quercetin, Naringenin, Baicalin und Brokkoliextrakt zeigte die höchste Wirksamkeit: sie hemmte die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) von SARS-CoV-2 an den ACE2-Rezeptor der Zelle um 90 %. Die In-vitro-Exposition der für den Test pseudotypisierten Varianten mit dieser Formulierung unmittelbar bei bzw. 1 h vor dem Kontakt mit humanen Lungenzellen führte zu einer bis zu 60%igen Hemmung ihres Zelleintritts. Außerdem hemmte diese Zusammensetzung andere Zellmechanismen der viralen Infektiosität signifikant, einschließlich der Aktivität von viraler RdRp, Furin und Cathepsin L. Diese Erkenntnisse weisen auf die Wirksamkeit natürlicher Verbindungen gegen SARS-CoV-2 und seiner mutierten Formen aufgrund von pleiotropen Mechanismen hin. Unsere Ergebnisse implizieren, dass die gleichzeitige Hemmung mehrerer Mechanismen der viralen Infektion von Wirtszellen eine effektive Strategie zur Verhinderung einer Infektion mit SARS-CoV-2 sein könnte.

SCHLAGWÖRTER

SARS-CoV-2, Varianten, RdRp, Furin, Cathepsin L

EINFÜHRUNG

Trotz der Verfügbarkeit von Impfstoffen und der drastischen Maßnahmen für die öffentliche Gesundheit breitet sich die SARS-CoV-2-Infektion weiter aus [1]. Laut der WHO gab es bis zum 31. August 2021 weltweit fast 217 Millionen Fälle, wobei mehr als 4,51 Millionen Tote zu verzeichnen waren [2].

Innerhalb eines Pandemiejahres sind mehrere Virusvarianten von SARS-CoV-2 aufgetreten; dazu gehören die Varianten aus dem Vereinigten Königreich (B.1.1.7, Alpha), Südafrika (B.1.315, Beta) und Brasilien (P.1, Gamma) sowie die mutierten Formen aus Indien, die als die Stämme B.1.617.1 (Kappa) und B.1.617.2 (Delta) bekannt sind [3]. All diese Varianten haben sich auch in andere Länder ausgebreitet, wobei jede Mutation potenziell weitere Varianten hervorbringen kann. Dies war bei der Variante R.1 aus Japan der Fall, welche die Mutation E484K auf dem Spikeprotein hervorgebracht hat, die zu einer „erhöhten Resistenz“ gegen Antikörper aus den derzeitigen Impfstoffen geführt hat [4], und gilt auch für die Mutation D614G, die zu einer höheren Infektiosität führt und in allen anderen Varianten vorhanden ist, die über den Alpha-Stamm hinausgegangen sind [5]. Klinische Berichte zeigen auch, dass die britische Variante Patienten anstecken kann, die den gegen das ursprüngliche SARS-CoV-2 entwickelten Impfstoff erhalten haben, und somit dessen Anspruch auf universelle Wirksamkeit infrage stellt [6].

* Korrespondenz-Autor.
Dr. Rath Research Institute BV,
5941 Optical Ct., San Jose,
CA 95138, USA.
Tel.: 01 408 567 5050.
E-Mail: author@drrath.com

AKJournals

Nicht authentifiziert | Heruntergeladen am 21.01.22 um 19:56 UTC

In letzter Zeit verdichten sich die Hinweise darauf, dass die neu aufgetretenen Varianten My und R.1 möglicherweise Antikörpern entgehen, die durch die Impfstoffe gegen das ursprüngliche SARS-CoV-2 aufgebaut werden [7]. Die gegenwärtige COVID-19-Pandemie wird durch die in rascher Abfolge auftretenden Mutationen von SARS-CoV-2 hervorgerufen. Aus diesem Grund ist zu erwarten, dass die endgültige Bekämpfung der Pandemie erschwert wird durch die Notwendigkeit, für jede neue Variante neue Impfstoffe zu entwickeln, sowie durch die wissenschaftlichen, wirtschaftlichen und sozialen Konsequenzen einer solchen Strategie.

Der Zelleintrittsmechanismus von SARS-CoV-2 wurde umfassend erforscht und es zeigte sich, dass er durch ein Spikeprotein ausgelöst wird, das an der Oberfläche des Virus verankert ist. Das Spikeprotein ist ein Trimer mit drei rezeptorbindenden S1-Köpfen auf einem trimeren Membranfusions-S2-Stamm [8]. Das S1-Spikeprotein auf SARS-CoV-2 enthält eine Rezeptorbindungsdomäne (RBD), die sich über den humanen ACE2-Rezeptor (hACE2) auf der Oberfläche vieler Arten von Zellen an eine Zielzelle bindet und von humanen Proteasen proteolytisch aktiviert wird. Der Eintritt in die Wirtszelle ist eine wichtige Determinante der viralen Infektiosität und Pathogenese [9–11].

Die Zellinfektion durch SARS-CoV-2 wird durch mehrere enzymatische Proteine des Wirts wie die transmembrane Serinprotease 2 (TMPRSS2), Furin, Cathepsin L sowie die RNA-dependente RNA-Polymerase (RdRp), welche die virale RNA-Multiplikation katalysiert, erleichtert [12]. Die RNA-dependente RNA-Polymerase (RdRP) ist ein strukturkonservatives Virenenzym ohne Wirtszellenhomologe und war deshalb zur Entwicklung von selektiven Hemmern als potenziell sicherere Alternative für die Behandlung von COVID-19, welche die Proteine der humanen Wirtszellen nicht direkt beeinträchtigt, interessant [13].

Die Anwendung natürlicher Verbindungen mit ihren breit gefächerten pleiotropen Wirkweisen bietet eine Möglichkeit, unterschiedliche Mechanismen im Zusammenhang mit einer Infektion mit SARS-CoV-2 innerhalb eines hohen Sicherheitsrahmens zu steuern. Seit dem Auftreten von COVID-19 haben mehrere Studien die Wirksamkeit solcher Verbindungen als Hemmer belegt [14–17]. Unsere früheren Studien zeigten auch die Wirksamkeit von Verbindungen pflanzlichen Ursprungs im Hinblick auf mehrere Zellmechanismen der Infektiosität von SARS-CoV-2 auf [18–20]. In dieser Studie beurteilten wir die Wirksamkeit einer bestimmten Kombination aus Spurenelementen und Pflanzenextrakten gegen neu aufgetretene mutierte Formen von SARS-CoV-2 sowie die Aktivität wichtiger Enzyme, die an der Verarbeitung der Viren in humanen Alveolarzellen beteiligt sind. Dieser Ansatz zielt auf eine gleichzeitige Hemmung mehrerer Zellmechanismen ab, die unabhängig von Mutation und/oder Subtyp an der Infektiosität von SARS-CoV-2 beteiligt sind, und eröffnet so neue Wege hin zu einer globalen Kontrolle der Pandemie.

MATERIALIEN UND METHODEN

Zelllinien, Virionenpartikel und Antikörper

A549- und VeroE6-Zellen wurden von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen. Die hACE2/A549-Zellen (z. B. A549-Zellen, die den humanen ACE2-Rezeptor stabil überexprimieren) und die vom eGFP-Luciferase-SARS-CoV-2-Spikeprotein eingekapselten pseudotypisierten Partikel wurden von GenScript (Piscataway, NJ, USA) bezogen. Das pseudotypisierte ΔG-Luciferase-rVSV (G*ΔG-Luciferase) wurde von Kerafast (Boston, MA, USA) bezogen. Alpha, Beta, Gamma, Delta, Kappa, My sowie die reinen pseudotypisierten Partikel eGFP-Luciferase-SARS-CoV-2 stammen von BPS Bioscience (San Diego, CA, USA). Alle anderen Verbindungen außer dem Brokkoliextrakt, der von Bulk Supplements (Henderson, NV, USA) bezogen wurde, stammen von Sigma (St. Louis, MO, USA).

Zusammensetzungen pflanzlichen Ursprungs

Die in dieser Studie getesteten Zusammensetzungen natürlicher Verbindungen werden in Tabelle 1 angeführt. Die Stammlösungen dieser Zusammensetzungen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) 50 mg/ml-1 vorbereitet und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Für die Experimente wurde die Stammlösung mit 1 X phosphatgepufferter Salzlösung (1 X PBS) oder einem vom Hersteller des verwendeten Kits empfohlenen Puffer (Enzymaktivitätsassays) oder dem entsprechenden Zellkulturmedium (zellbasierte Experimente) zur endgültigen in den Abbildungen angegebenen Konzentration verdünnt.

Die Bindung von pseudotypisierten Virionen von SARS-CoV-2 an den hACE2-Rezeptor

Das Experiment folgte unserer zuvor veröffentlichten Methodik [18, 19]. Das ursprüngliche vom eGFP-Luciferase-SARS-CoV-2-Spikeprotein eingekapselte Pseudovirion oder seine Varianten wurden mit 0 – 100 mg/ml-1 von Mix V entweder 1 h bei 37 °C inkubiert und dann einer Monoschicht von hACE2/A549-Zellen hinzugefügt oder unmittelbar den hACE2/A549-Zellen hinzugefügt. Die Zellen wurden weitere 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach der 48 h dauernden Inkubationsphase wurde die Transduktionswirksamkeit durch Aufzeichnung der Luciferaseaktivität über ein Luciferaseassaysystem (Promega, Madison, WI, USA) und ein Spektrofluorometer (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) quantifiziert. Die positive Kontrolle bestand aus reinen pseudotypisierten Partikeln eGFP-Luciferase-SARS-CoV-2 und die negative Kontrolle aus pseudotypisierten Partikeln ΔG-Luciferase-rVSV. Die Daten werden als Prozentsatz der Kontrolle ohne Zusatz von Mix V präsentiert (durchschnittliche ±-Standardabweichung (SD), n = 5).

In-vitro-RdRp-Aktivitätsassay

Die *In-vitro*-RdRp-Aktivität wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers über ein SARS-CoV-2-RNA-Polymeraseassaykit (ProFoldin, Hudson, MA, USA) beurteilt.

Tabelle 1. Zusammensetzungen der in der Studie getesteten Pflanzenextrakte und Spurenelemente

Substanz	Mix A	Mix B	Mix C	Mix V	Mix E
Grünteeextrakt	+	+	+		
Resveratrol	+	+	+	+	+
Brokkoliextrakt	+	+	+	+	+
Curcumin	+	+	+	+	+
Quercetin	+	+	+	+	+
Naringenin	+	+	+	+	+
Baicalin	+	+	+	+	+
Theaflavin	+			+	+
Vitamin C	+	+	+	+	+
N-acetylcysteine	+	+		+	
Fucoidan			+		+

Nicht authentifiziert | Heruntergeladen am 21.01.22 um 19:56 UTC

Kurz zusammengefasst wurden 0,5 g/l 50 X rekombinante RdRp oder 20 g/l Zelllysat [um Zellen mit eGFP-Luciferase-SARS-CoV-2-RdRp-Lentivirus (GenScript, Piscataway, NJ, USA) zu transduzieren, wurden VeroE6-Zellen in eine 6-Well-Titerplatte mit dem komplexen Nährmedium eingebracht und 30 min lang mit 8 g/l ml-1 Polybren (Sigma, St. Louis, MO, USA) behandelt; dann wurde das eGFP-Luciferase-SARS-CoV-2-RdRp-Lentivirus mit einer Multiplizität der Infektion (MOI = 5) [unsere früheren vorläufigen Ergebnisse zeigten, dass mit dieser MOI eine Transduktionsrate von nahezu 100 % erreicht werden kann] und einer Spininokulation bei 1 000 X g über 1,5 h hinzugefügt. Nach einer Inkubation über 24 h bei 37 °C wurden die Zellen mit frischem komplexem Nährmedium gefüttert. 48 h nach der Inokulation wurden die Zellen mit 1 mM EDTA getrennt und dreimal mit 1 X PBS, das mit 3 % fetalem Kälberserum (FBS) angereichert wurde, gewaschen] mit 2,5 g/l 50 X Puffer, 20 g/l Wasser (nur bei Verwendung des rekombinanten RdRp-Enzyms) und 1,0 g/l von Mix V bei einer Konzentration von 0 – 100 gg/ml-1 15 min bei RT inkubiert und danach der Hauptmix mit 0,5 g/l 50 X NTP und 0,5 g/l 50 X Probe (als einsträngiges Polyribonucleotid) hinzugefügt. Die Reaktion (25 g/l) wurde 2 h lang bei 34 °C inkubiert und dann durch das Hinzufügen von 65 g/l 10 X Fluoreszenzfarbstoff angehalten; das Fluoreszenzsignal wurde mit einem Fluoreszenzspektrometer (Tecan, Group Ltd., Männedorf, Schweiz) über 10 min bei einer Extension/Emission = 488/535 nm aufgezeichnet. Die positive Kontrolle enthielt 100 gg/ml-1 Remdesivir. Die Ergebnisse werden als Prozentsatz der Kontrolle ohne Zusatz von Mix V präsentiert (durchschnittliche ±-SD, n = 5).

Furinaktivitätsassay

Die Auswirkungen von Mix V auf die Furin-Enzymaktivität wurden über ein Furinaktivitätsassaykit SensoLyte Rh110 (AnaSpec, Fremont, CA, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers bewertet. Kurz zusammengefasst wurde Mix V in Konzentrationen von 5 und 10 mg mL – 1 15 Minuten lang mit rekombinantem Furin-Protein gemischt. Anschließend wurde das fluorogene Furin-Substrat Rh110 hinzugefügt.Die Proben wurden 1 h lang bei 22 °C inkubiert und die Fluoreszenz wurde bei einer Extension/Emission = 490/520 nm mit einem Fluoreszenzspektrometer (Cytofluor 4000 von Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA) aufgezeichnet. Die positive Kontrolle als Peptidylchlormethylketon (Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CMK) enthielt 0,1 g/M. Die Daten werden als Prozentsatz der Kontrolle ohne Zusatz von Mix V präsentiert (durchschnittliche ±-SD, n = 5).

Cathepsin-L-Aktivitätsassay

Die Auswirkungen von Mix V auf die Aktivität des rekombinanten Cathepsin L wurde über ein Cathepsin-L-Aktivitätsscreeningassaykit (BPS Bioscience, San Diego, CA, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers bewertet. Im Anschluss wurde das Kulturmedium aufgezogen und es wurden 100 g/l Methanol hinzugefügt. Die Absorption wurde bei 570 nm mit einem Fluoreszenzspektrometer (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) beurteilt. Die Daten werden als Prozentsatz der Kontrolle ohne Zusatz von Mix V präsentiert (durchschnittliche ±-SD, n = 8).

Viabilität

Das Zellviabilitätsassay wurde mit MTT-Substrat durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurden 40 X 103 A549-Zellen pro Well bis zu 48 h lang mit unterschiedlichen Konzentrationen von purem Mix V oder von Mix V in Kombination mit Vitamin D und Zink behandelt. Danach wurden die Wells mit 1 X PBS gewaschen und komplexes Nährmedium mit einem Zusatz von 5 mg/ml-1 MTT hinzugefügt und danach 4 h lang bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Kulturmedium aufgezogen und es wurden 100 g/l Methanol hinzugefügt. Die Absorption wurde bei 570 nm mit einem Fluoreszenzspektrometer (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) beurteilt. Die Daten werden als Prozentsatz der Kontrolle ohne Zusatz von Mix V präsentiert (durchschnittliche ±-SD, n = 8).

Statistische Analyse

Die Daten aller Experimente werden als Durchschnittswerte mit Standardabweichung aus zumindest drei unabhängigen Experimenten präsentiert. Der Vergleich zwischen unterschiedlichen Proben erfolgte durch einen zweiseitigen T-Test mit dem Programm Microsoft Office Excel. Unterschiede zwischen Proben wurden bei einem P-Wert unter 0,05 als signifikant erachtet.

Ethik

An dieser Studie waren keine Testpersonen beteiligt. Aus diesem Grund sind eine ethische Zulassung der Ethikkommission sowie Einwilligungserklärungen nicht relevant.

ERGEBNISSE

Auswahl der wirksamsten Zusammensetzung natürlicher Verbindungen basierend auf der Hemmung der viralen RBD-Bindung an den hACE2-Rezeptor

Die Ergebnisse in Abb. 1 zeigen die Wirksamkeit unterschiedlicher Kombinationen aus Pflanzenextrakten und Spurenelementen auf die Hemmung der RBD-Bindung von SARS-CoV-2 an Lungenepithelzellen, die den humanen ACE2-Rezeptor überexprimieren. Alle fünf Zusammensetzungen wiesen Hemmwirkungen auf die RBD-Bindung in einem Umfang von 50 % und mehr auf. Die höchste Hemmung, nämlich um 90 % im Vergleich zur Kontrolle, wurde mit Mix V in einer Konzentration von 10 gg/ml-1 erreicht (Abb. 1A). Der Zusatz von Vitamin D oder Zink zu Mix V verstärkte die Hemmung der RBD-Bindung an den humanen ACE2-Rezeptor wie in Abb. 1B gezeigt nicht zusätzlich.

Auswirkung von Mix V auf die Zellanhaftung und das Eindringen von SARS-CoV-2 und seinen pseudotypisierten Varianten

Die Auswirkungen unterschiedlicher Anwendungsmuster von Mix V auf Zellanhaftung und -eintritt von eGFP-Luc-Spike-ummantelten pseudotypisierten Varianten wurden anhand von A549/hACE2-Zellen getestet. Die in Abb. 2A präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Exposition von Pseudovirionen mit Mix V vor der Infektion von humanen Lungenzellen zur Reduktion des Zelleintritts aller getesteten SARS-CoV-2-Varianten beigetragen hat. Somit führte das Zuführen von Mix V bei 10 gg/ml-1 zum ursprünglichen SARS-CoV-2-Stamm sowie zu seinen Varianten Alpha, Beta, Gamma, Delta, Kappa und My über 1 h vor dem Hinzufügen zu A549/hACE2-Zellen zu einem um 39, 48, 42, 57, 51, 39 bzw. 24 % reduzierten Vireneintritt. Abbildung 2B zeigt die Wirkungen von Mix V auf die Zelleintrittshemmung der Testvarianten bei gleichzeitiger Anwendung mit pseudotypisierten Virionen und A549/hACE2-Zellen. Mit Mix V in einer Konzentration von 10 µg/ml-1 wurde der Zelleintritt von Alpha-Virionen um 38 %, von Beta-Virionen um 48 % und von Gamma-Virionen um 41 % gehemmt. Die Hemmwirkung von Mix V beim Eintritt in die ursprünglichen SARS-

Nicht authentifiziert | Heruntergeladen am 21.01.22 um 19:56 UTC

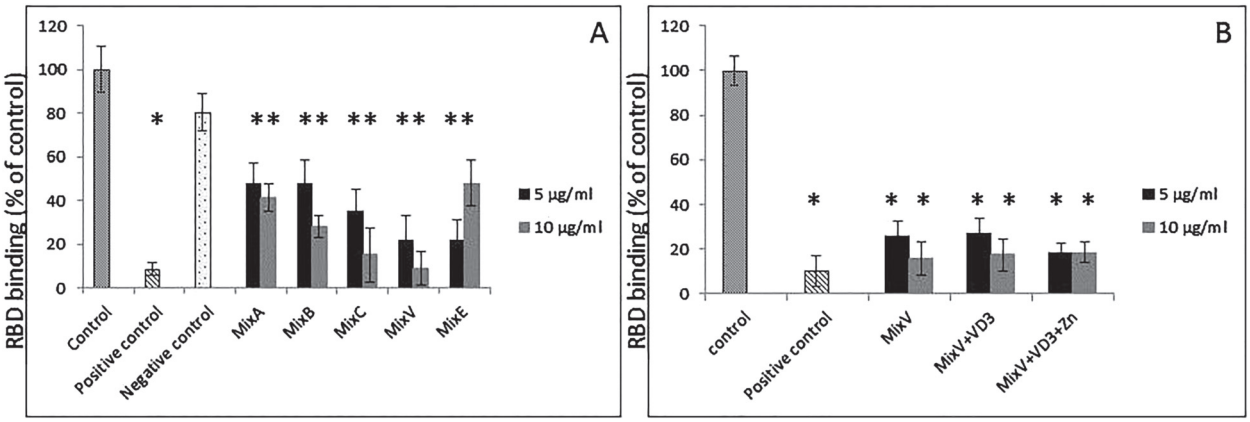

Abb. 1. Wirkung der Testzusammensetzungen auf die RBD-Spikeproteinanhaftung von SARS-CoV-2 an Lungenepithelzellen. Hemmwirkung der Mixe A, B, C, V und E auf die virale RBD-Bindung von SARS-CoV-2 an den humanen ACE2-Rezeptor (A). Hemmwirkung von Mix V bei Zugabe von Vitamin D und Zink auf die virale RBD-Bindung von SARS-CoV-2 an den humanen ACE2-Rezeptor (B); Kontrolle – 0,25 % DMSO, positive und negative Kontrollen wurden vom Hersteller des Kits geliefert; die Daten werden als Prozentsatz der Kontrolle ±SD präsentiert; *P < 0,001; VD3 – 25-Hydroxy-Vitamin D3 bei 25 µg/ml-1, Zn – Zinkaspartat bei 2,5 µg/ml-1

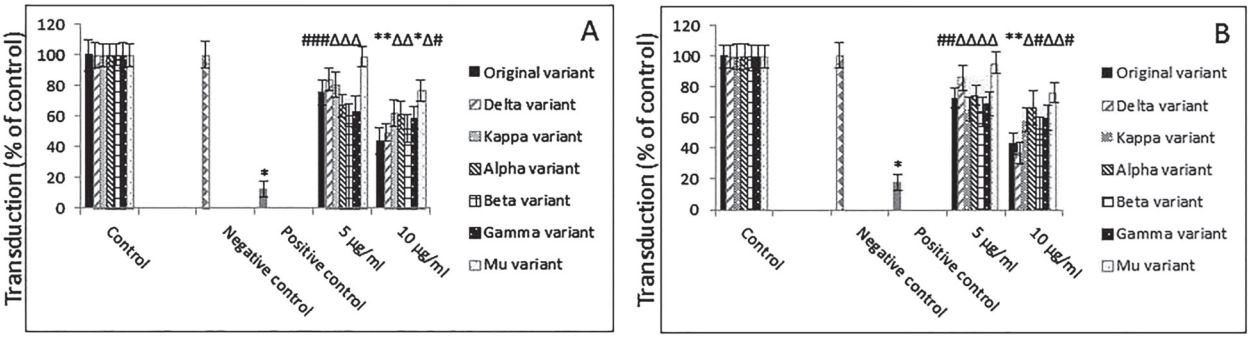

Abb. 2. Wirkung von Mix V auf den Eintritt der pseudotypisierten Varianten der SARS-CoV-2-eGFP-Luciferase. hACE2/A549-Zellen wurden mit sechs unterschiedlichen Varianten von mit Spikeproteinen eingekapselten SARS-CoV-2-Pseudovirionen inokuliert und mit Mix V in den angegebenen Konzentrationen entweder als Vorbehandlung (A) oder als unmittelbare Exposition (B) behandelt. Kontrolle – 0,05 % DMSO, negative Kontrolle – pseudotypisierte ΔG-Luciferase (G*ΔGLuciferase)-rVSV, positive Kontrolle – reine eGFP-Luciferase-Pseudovirione von SARS-CoV-2; # P < 0,05, Δ P < 0,01, * P < 0,001

CoV-2-Virionen lag bei 57 % und bei den Varianten Delta, Kappa und My bei 64, 42 bzw. 24 %. Die in Abb. 3A präsentierten Ergebnisse zeigen, dass Mix V mit 5 bzw. 10 µg/ml-1 die Viabilität von A549/hACE2-Zellen nicht beeinflusste und dass die Verabreichung von Vitamin D3 alleine oder in Verbindung mit Zink keine zusätzlichen Auswirkungen auf ihr Überleben hatte (Abb. 3B).

Wirkung von Mix V auf die virale RdRp

In unserer Studie haben wir auch getestet, ob Mix V über die Bindungsschritte des Infektionsvorgangs mit SARS-CoV-2 hinaus wirkt, indem wir seine Wirkung auf andere wichtige Zellmechanismen der viralen Infektion wie die für die Virenreplikation nötige RdRp-Aktivität untersuchten. Wie in Abb. 4A gezeigt, wurde die Enzymaktivität der rekombinanten SARS-CoV-2-RdRp mit Mix V mit 10 µg/ml-1 signifikant um 53 % gehemmt. Weder Vitamin D3 noch Zink verstärkten diese Hemmwirkung. Eine ähnliche Hemmwirkung von Mix V auf die RdRp-Aktivität wurde ebenso bei der Verwendung des Lysats von Zellen, die das RdRp-Protein überexprimieren, beobachtet (Abb. 4B).

Wirkung von Mix V auf Wirtszellenproteasen

Es wurde dokumentiert, dass unterschiedliche bestimmte Wirtszellproteasen wie unter anderem Furin und Cathepsin L erforderlich sind, um den Zelleintritt von SARS-CoV-2 durch enzymatische „vorbereitende“ Spikeproteine und viralen Austritt zu erleichtern. In unserer Studie haben wir zellfreie Assays angewendet, um die direkten Wirkungen von Mix V auf die Aktivität dieser Enzyme zu untersuchen. Wie in Abb. 5A dargestellt, konnten wir mit Mix V mit 5 bzw. 10 µg/ml-1 eine Hemmung der Furinaktivität um 12 bzw. 34 % beobachten. Diese Hemmwirkung von Mix V wurde durch den Zusatz von Vitamin D noch weiter auf 54 % verstärkt. Eine Kombination aus Mix V mit Vitamin D und Zink hemmte die Furinaktivität sogar um 78 %. Wie in Abb. 5B gezeigt, wirkte Mix V, wenn auch schwach, ebenso in der Reduktion der Aktivität von Cathepsin L, das am endosomalen Austritt von SARS-CoV-2 beteiligt ist. Mit 10 gg/ml-1 von Mix V wurde die Enzymaktivität von Cathepsin L um 14 % reduziert; der Zusatz von Vitamin D3 hatte keine signifikante Wirkung auf die Hemmung von Cathepsin L.

Nicht authentifiziert | Heruntergeladen am 21.01.22 um 19:56 UTC

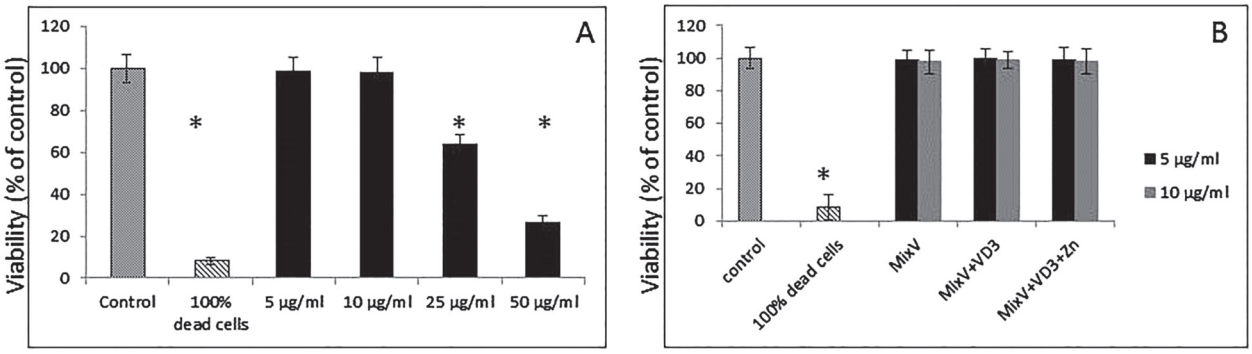

Abb. 3. Viabilität von humanen Lungenepithelzellen. Wirkung von Mix V auf das Überleben von A549/hACE2-Zellen (A). Wirkung von Mix V in Kombination mit Vitamin D3 und Zink auf das Überleben von A549/hACE2-Zellen (B). Die Viabilität von A549/hACE2-Zellen wurde wie im Abschnitt „Experimentelle Verfahren" über die MTT-Methode bewertet; Kontrollen – 0,05 % DMSO; * P < 0,001 VD3 – 25-Hydroxy-Vitamin D3 bei 25 mg/ml-1, Zn – Zinkaspartat bei 2,5 mg/ml-1

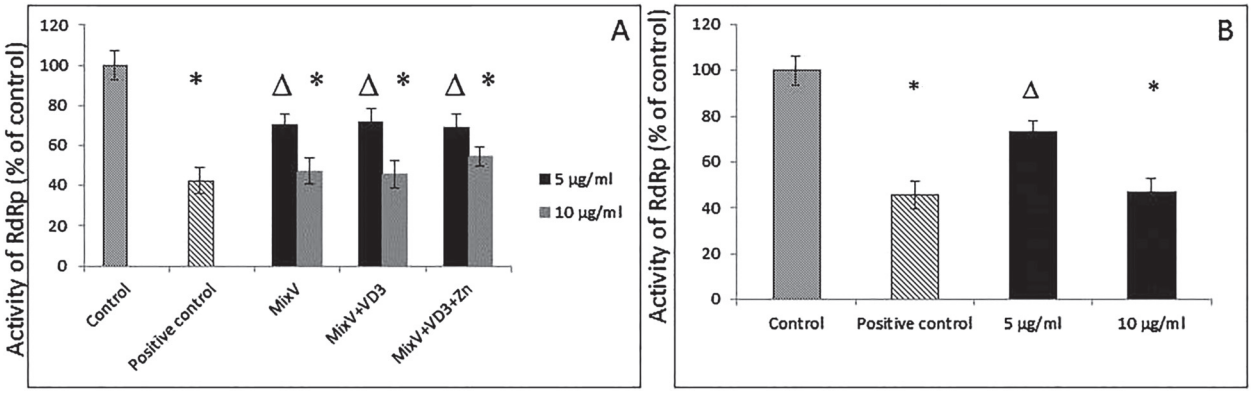

Abb. 4. Wirkung von Mix V auf die virale RdRp. Wirkung von Mix V alleine (A) und in Kombination mit Vitamin D3 und Zink (B) auf die Aktivität der SARS-CoV-2-RdRp. Das gereinigte rekombinante RdRp-Enzym in VeroE6-Zellen wurde mit Mix V in den angegebenen Konzentrationen 15 min lang bei RT inkubiert. Nach der Anwendung des Reaktionsmixes aus NTP und RNA wurde 2 h lang bei 34 °C eine Probeninkubation ausgeführt. Nach 10 min wurde bei Extension/Emission = 488/535 nm mit einem Spektrofluorometer das Signal gemessen. Kontrolle – 0,05 % DMSO, positive Kontrolle – 100 mg/ml-1 Remdesivir;
Δ P < 0,01, * P < 0,001; VD3 – 25-Hydroxy-Vitamin-D3 bei 25 mg/ml-1, Zn – Zinkaspartat bei 2,5 mg/ml-1

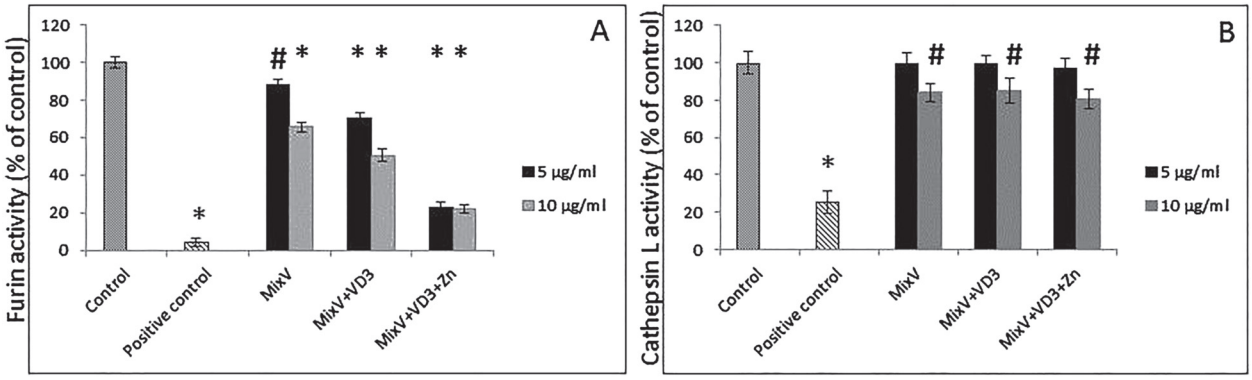

Abb. 5. Wirkung von Mix V auf die Zellenproteasen. Wirkung von Mix V auf die Furinaktivität (A). Furin wurde als rekombinantes Protein mit Mix V alleine oder in Kombination mit Vitamin D und Zink in den angegebenen Konzentrationen 15 min lang inkubiert; danach wurde fluorogenes Rh110-Furinsubstrat hinzugefügt und 1 h bei 22 °C inkubiert. Wirkung von Mix V auf die Cathepsin-L-Aktivität (B und C). Cathepsin L wurde als rekombinantes Protein mit Mix V alleine oder in Kombination mit Vitamin D und Zink in den angegebenen Konzentrationen 1 h lang bei 22 °C inkubiert; danach wurde 30 min lang 10 mM fluorogenes Substrat angewendet. Kontrolle – 0,05 % DMSO, positive Kontrolle – 25 mg/ml-1 E-64; # P < 0,05, * P < 0,001, VD3 – 25-Hydroxy-Vitamin-D3 bei 25 mg/ml-1, Zn – Zinkaspartat bei 2,5 mg/ml-1

Nicht authentifiziert | Heruntergeladen am 21.01.22 um 19:56 UTC

DISKUSSION

Unsere Studie stellt einen neuen umfassenden Ansatz im Kampf gegen COVID-19 dar, da sie darauf abzielt, nicht nur einen, sondern mehrere Zellmechanismen im Zusammenhang mit der Infektiosität von SARS-CoV-2 gleichzeitig zu kontrollieren. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine bestimmte Kombination pflanzlicher Wirkstoffe und ausgewählter Spurenelemente (Mix V) wichtige Schritte für die Zellinfektiosität des ursprünglichen SARS-CoV-2-Stamms und seiner mutierten Formen Alpha, Beta, Gamma, Delta, Kappa und My signifikant beeinflussen kann, indem die virale Bindung an die ACE2-Rezeptoren der Zelle gehemmt, die Verfügbarkeit dieser Rezeptoren an humanen Lungenzellen gesenkt und die Aktivität der viralen RdRp, die für die Virenreplikation nötig ist, reduziert wird. Außerdem blockierten diese natürlichen Verbindungen den Zelleneintritt der Virionen, indem die Aktivität wichtiger Enzyme wie Furin und Cathepsin L gesenkt wurde (siehe Abb. 6). Diese Erkenntnisse erweitern die Ergebnisse unserer früheren Studie mit SARS-CoV-2-Virionenpartikeln, die wichtige Inhaltsstoffe für diese Kombination identifizierte, welche zur Hemmung der viralen Bindung an den hACE2-Rezeptor beitrugen und die Expression der ACE2-Rezeptoren an humanen kleinen Alveolarepithelzellen reduzierten [21]. Unter Berücksichtigung der unmittelbaren Verfügbarkeit und des hohen Sicherheitsprofils dieser natürlichen Verbindungen stellt ihr Einsatz eine überzeugende präventive Maßnahme dar, beispielsweise als Ergänzung für Impfstoffe und Behandlungen gegen COVID.

Alle getesteten Nährstoffkombinationen (A, B, C, D und E) trugen zu einer Blockade der RBD-Bindung an ACE2 um etwa 50 % bei, der Mix V wies dabei die höchste Hemmung der viralen Bindung, nämlich um 90 %, auf. Dies würde darauf hinweisen, dass hier ein synergetischer oder zumindest additiver Effekt eine Rolle spielen könnte, wobei andere wie beispielsweise allotrope Interaktionen zwischen den Verbindungen von Mix V und RBD/ACE2 nicht auszuschließen sind.

Unsere Studie untersuchte die Hemmwirkungen von Mix V auf die Zellinternalisierung von SARS-CoV-2-Virionen und seinen mutierten Formen anhand von unterschiedlichen Expositionsmustern dieser Virione mit Mix V und humanen Lungenzellen. Dabei inkubierten wir Testvirionen vor ihrer Exposition mit den Zellen 1 h lang mit Mix V und kombinierten Mix V unmittelbar mit Virionen und Zellen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die maximale Hemmung der Zelltransduktion durch diese Virionen erreicht wird, wenn all diese Elemente zum gleichen Zeitpunkt interagierten. Dies würde implizieren, dass dieser Mix die metabolischen Aspekte der Zell-Virionen-Interaktion beeinflusst und nicht auf das Virus selbst wirkt. Obwohl die Wirksamkeit in der Hemmung der Vireninternalisierung nicht virenspezifisch war, hemmte Mix V das ursprüngliche SARS-CoV-2 sowie die Delta-Variante im Vergleich zu anderen mutierten Formen dennoch am stärksten.

Neben der Hemmwirkung von Mix V auf die Zellanbindung und das Eindringen von SARS-CoV-2-Virionen beobachteten wir auch, dass Mix V die am endosomalen Austritt sowie der Vermehrung des Virus beteiligten Zellmechanismen beeinflusste, indem die Aktivität der an der Verarbeitung der Virenzellen beteiligten Enzyme reduziert wurde. Unter den proteolytischen Enzymen, die an diesen Vorgängen beteiligt sind, erwies sich die Aktivität von Cathepsin L und Furin als wichtig für die Pathogenität von SARS-CoV-2 [22, 23]. Es zeigte sich auch, dass die Furinaktivität gegenüber dem SARS-CoV-1-Spikeprotein für die Fusion der Virionen mit der Wirtsmembran erforderlich ist, ohne die Infektiosität des Virus direkt zu beeinflussen [24]. Offenbar wäre es für eine effektive Kontrolle und Behandlung einer SARS-CoV-2-Infektion erforderlich, mehrere Proteasen gleichzeitig zu hemmen, um diese pathologischen Umwandlungen wirksam zu blockieren.

Hier haben wir gezeigt, dass Mix V zusätzlich zur Blockierung der Virenbindung an hACE2-überexprimierende Lungenepithelzellen die Aktivität des Membranproteasefurins und des endosomalen Cathepsin L senkte. Die Reduktion der Aktivität dieser Enzyme wurde bei nicht toxischen Konzentrationen von Mix V beobachtet. Diese Wirkung ist signifikant, da die fehlende zusätzliche Furinspaltstelle auf dem SARS-CoV-1-Spikeprotein wesentlichen Einfluss auf seine Infektiosität hat [25].

Neben der Infektion mit SARS-CoV-2 wird die potenzielle Signalverknüpfung zwischen Spikeprotein, Furin und ACE2 mit dem Auftreten von unerwünschten kardiovaskulären Ereignissen in Zusammenhang gebracht [26]. Da diese Enzyme auch an unterschiedlichen biochemischen Prozessen beteiligt sind, könnte das Fehlen einer vollständigen Hemmung bei den in der Studie verwendeten Konzentrationen von Mix V von Vorteil sein. Wir haben beobachtet, dass Vitamin D3 und Zink eine zusätzliche Wirkung auf die Reduktion der Enzymaktivität von Furin, jedoch nicht von Cathepsin L hatten. Schließlich konnten wir bei diesen Konzentrationen auch eine deutliche Hemmung der Aktivität der viralen RdRp verzeichnen, was zu einer niedrigeren Replikationsrate des Virus führt.

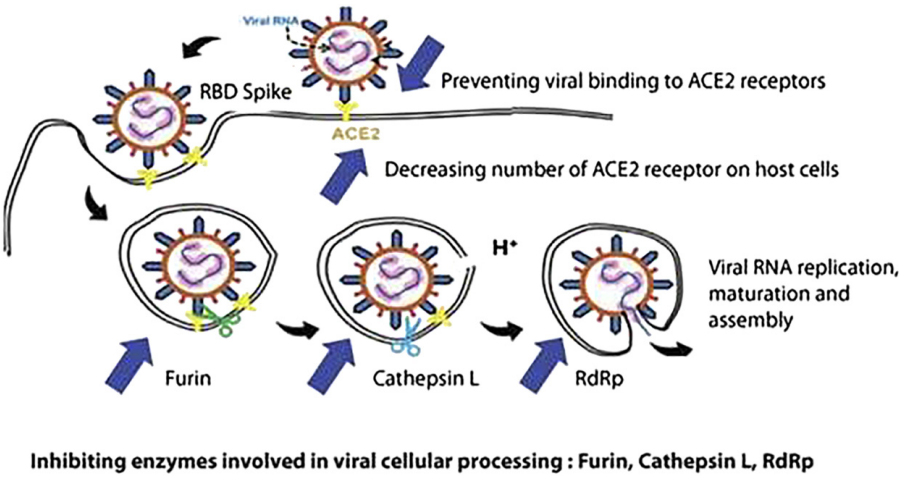

Abb. 6. Schematische Darstellung der Wirkungen von Mix V auf wichtige Zellabläufe im Zusammenhang mit der Infektiosität von SARS-CoV-2

Nicht authentifiziert | Heruntergeladen am 21.01.22 um 19:56 UTC

Basierend auf dieser Studie und unseren früheren Erkenntnissen [18, 19, 27], könnte diese Kombination aus Verbindungen pflanzlichen Ursprungs und Spurenelementen eine neue Strategie gegen SARS-CoV-2 eröffnen, indem mehrere Aspekte des viralen Lebenszyklus einschließlich des Vireneintritts und der Replikation gleichzeitig beeinflusst werden. Diese Strategie war auch in unseren früheren Studien, einschließlich jener zum humanen Influenzavirus H1N1, zur Vogelgrippe H1N5 etc. enthalten, die auf der Auswahl natürlicher Komponenten basierten, die bei einer breiten Palette von Erregern gleichzeitig auf wichtige pathologische Mechanismen abzielen [28–31].

Unsere Studie weist darauf hin, dass eine gleichzeitige Kontrolle wichtiger Schritte der Infektiosität von SARS-CoV-2 durch eine bestimmte Kombination aus pflanzlichen und biologisch wirksamen Verbindungen in der Behandlung von komplexen Pathologien wie solchen, die an dieser Virusinfektion beteiligt sind, wirksam sein kann. Zusammengefasst und mit dem kürzlich erfolgten klinischen Beleg, dass Infusionen mit Vitamin C eine COVID-19-Erkrankung auch im fortgeschrittenen Stadium erfolgreich bekämpfen können [32], könnten pflanzliche Verbindungen aufgrund ihrer pleiotropen biologischen Wirkung einen neuen Ansatz gegen SARS-CoV-2 und seine Mutationen darstellen.

Finanzierung: Diese Forschung wurde mit Mitteln der gemeinnützigen Stiftung Dr. Rath Health Foundation unterstützt, die zur Stichting Administratiekantoor Dr. Rath Holding, NL, gehört.

Beiträge der Autoren: A. G. entwickelte, designte und führte die Experimente durch, analysierte Daten, überprüfte den Artikel und war hauptverantwortlich für den endgültigen Inhalt; V. I. und S. I. designten und führten die Experimente durch, analysierten Daten, überprüften den Artikel und waren hauptverantwortlich für den endgültigen Inhalt. A. N. und M.R. und M. R. überwachten, validierten, verfassten den Artikel und waren hauptverantwortlich für den endgültigen Inhalt. Alle Autoren hatten vollständigen Zugriff auf alle Daten der Studie, haben das endgültige Manuskript gelesen und genehmigt und übernehmen die Verantwortung für die Vollständigkeit der Daten und die Genauigkeit der Datenanalyse.

Interessenkonflikt: Dr. Rath und Dr. Niedzwiecki sind Mitglieder der gemeinnützigen Dr. Rath Health Foundation, erhalten jedoch keine finanziellen Einnahmen von ihr. Alle Autoren erklären, dass kein potenzieller Interessenkonflikt im Hinblick auf Forschung, Autorenschaft und/oder Veröffentlichung dieses Artikels besteht.

Angaben zur Datenverfügbarkeit: Alle während dieser Studie generierten oder analysierten Daten sind in diesem veröffentlichten Artikel enthalten.

DANKSAGUNG

Die Autoren danken Dr. Bilwa Bhanap, Vyoma Bhanap, Waldemar Sumera und Cathy Flowers für ihren geschätzten Beitrag zu diesem Manuskript.

REFERENZEN

1. Chakraborty I, Maity P. COVID-19 outbreak: migration, effects on society, global environment and prevention. Sci Total Environ 2020;728:138882. *https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138882*.
2. WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard. *https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-oncovid-19*—31-august-2021.
3. Tracking SARS-CoV-2 variants. *https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/*.
4. Andreano E, Piccini G, Licastro D, Casalino L, Johnson NV, Paciello I, et al. SARS-CoV-2 escape from a highly neutralizing COVID-19 convalescent plasma. Proc Natl Acad Sci USA 2021; 118(36):e2103154118. *https://doi.org/10.1073/pnas.2103154118*.
5. Zhang L, Cui Z, Li Q, Wang B, Yu Y, Wu J, et al. Ten emerging SARS-CoV-2 spike variants exhibit variable infectivity, animal tropism, and antibody neutralization. Commun Biol 2021;4(1):1196. *https://doi.org/10.1038/s42003-021-02728-4*.
6. Collier DA, Marco AD, Ferreira IATM, Meng B, Datir RP, Walls AC, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 to mRNA vaccineelicited antibodies. Nature 2021;593:136–41. *https://doi.org/10.1038/s41586-021-03412-7*.
7. Dyson L, Hill EM,Moore S, Curran-Sebastian J, TildesleyMJ, Lythgoe KA, et al. Possible future waves of SARS-CoV-2 infection generated by variants of concern with a range of characteristics. Nat Commun 2021;12(1):5730. *https://doi.org/10.1038/s41467-021-25915-7*.
8. Li, F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. Annu Rev Virol 2016;3:237–61. *https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301*.
9. Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng B J, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV-a target for vaccine and therapeutic development. Nat Rev Microbiol 2009;7:226– 36. *https://doi.org/10.1038/nrmicro2090*.
10. Du L, Yang Y, Zhou Y, Lu L, Li F, Jiang S. MERS-CoV spike protein: a key target for antivirals. Expert Opin Ther Targets 2017; 21(2):131–43. *https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1271415*.
11. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. Methods Mol Biol 2015;1282:1–23. *https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1*.
12. Glowacka I, Bertram S, Müller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, et al. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. J Virol 2011; 85(9):4122–34.
13. Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. Proc Natl Acad Sci 2005;102(33):11876–81.

Nicht authentifiziert | Heruntergeladen am 21.01.22 um 19:56 UTC

14. Zhang D, Hamdoun S, Chen R, Yang L, Ip CK, Qu Y, et al. Identification of natural compounds as SARS-CoV-2 entry inhibitors by molecular docking-based virtual screening with biolayer interferometry. Pharmacol Res 2021;172:105820. *https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105820*.
15. Muchtaridi M, Fauzi M, Khairul Ikram NK, Mohd Gazzali A, Wahab HA. Natural flavonoids as potential angiotensin-converting enzyme 2 inhibitors for anti-SARS-CoV-2. Molecules 2020;25(17):3980. *https://doi.org/10.3390/molecules25173980*.
16. Gopinath K, Jokinen EM, Kurkinen ST, Pentikäinen OT. Screening of natural products targeting SARS-CoV-2-ACE2 receptor interface-A MixMD based HTVS pipeline. Front Chem 2020;8:589769. *https://doi.org/10.3389/fchem.2020.589769*.
17. Yang LJ, Chen RH, Hamdoun S, Coghi P, Ng JPL, Zhang DW, et al. Corilagin prevents SARS-CoV-2 infection by targeting RBD-ACE2 binding. Phytomedicine 2021;87:153591. *https://doi.org/10.1016/j. phymed.2021.153591*.
18. Goc A, Ivanov V, Ivanova S, Chatterjee M, Rath M, Niedzwiecki A. Simultaneous inhibition of SARS-CoV-2 infectivity by a specific combination of plant-derived compounds. Eur J Bio Biotech 2021;2(5):24–33. *https://doi.org/10.24018/ejbio.2021.2.5.258*.
19. Goc A, Sumera W, Rath M, Niedzwiecki A. Phenolic compounds disrupt spike-mediated receptor-binding and entry of SARS-CoV-2 pseudo-virions, PLOS ONE 2021;16(6):e0253489. *https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489*.
20. Goc A, Niedzwiecki A, Rath M. Polyunsaturated u-3 fatty acids inhibit ACE2-controlled SARS-CoV-2 binding and cellular entry. Sci Rep 2021;11:5207. *https://doi.org/10.1038/s41598-021-84850-1*.
21. Ivanov V, Goc A, Ivanova S, Niedzwiecki A, Rath M. Inhibition of ACE2 expression by Ascorbic acid alone and its combination with other natural compounds. Infect Dis Res Trmt (Auckl) 2021;14:1–7. *https://doi.org/10.1177/1178633721994605*.
22. Liu T, Luo S, Libby P, Shi GP. Cathepsin L-selective inhibitors: a potentially promising treatment for COVID-19 patients. Pharmacol Ther 2020;213:107587. *https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107587*.
23. Tian S, Huang Q, Fang Y, Wu J. Furin DB: A database of 20-residue furin cleavage site motifs, substrates and their associated drugs. Int J Mol Sci 2011;12(2):1060–5. *https://doi.org/10.3390/ijms12021060*.
24. Follis KE, York J, Nunberg JH. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. Virology 2006;350(2):358–69. *https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.003*.
25. Johnson BA, Xie X, Kumari BK, Lokugamage G, Muruato A, Zou J, et al. Furin cleavage site is key to SARS-CoV-2 pathogenesis. bio-Rxiv 2020:268854. *https://doi.org/10.1101/2020.08.26.268854* Preprint.
26. Ming Y, Qiang L. Involvement of spike protein, furin, and ACE2 in SARS-CoV-2-related cardiovascular complications. SN Compr ClinMed 2020;2:1103–8. *https://doi.org/10.1007/s42399-020-00400-2*.
27. Ivanov V, Ivanova S, Niedzwiecki A, Rath M. Effective and safe global public health strategy to fight the COVID-19 pandemic: specific micronutrient combination inhibits Coronavirus cell-entry receptor (ACE2) expression. J Cell Med Nat Health 2020. *https://jcmnh.org/effective-and-safe-global-public-health-strategy-tofight-the-covid-19-pandemic-specific-micronutrient-compositioninhibits-coronavirus-cell-entry-receptor-ace2-expression/*.
28. Barbour EK, Rayya EG, Houssam, AS, El-Hakim RG, Niedzwiecki A, Nour AMA, et al. Alleviation of histopathologic effects of avian influenza virus by a specific nutrient synergy. Int J Appl Res Vet Med 2007;5(1):9–16.
29. Jariwalla RJ, Gangapurkar B, Pandit A, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Micronutrient cooperation in suppression of HIV production in chronically and latently infected cells. Mol Med Rep 2010;3(3):377–85. *https://doi.org/10.3892/mmr_00000268*.
30. Deryabin PG, Lvov DK, Botikov AG, Ivanov V, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, et al. Effects of a nutrient mixture on infectious properties of the highly pathogenic strain of avian influenza virus A/H5N1. Biofactors 2008;33(2):85–97. *https://doi.org/10.1002/biof.5520330201*.
31. Jariwalla RJ, Roomi MW, Gangapurkar B, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Suppression of influenza A virus nuclear antigen production and neuraminidase activity by a nutrient mixture containing ascorbic acid, green tea extract and amino acids. Biofactors 2001;31(1):1–15. *https://doi.org/10.1002/biof.5520310101*.
32. Zhang J, Rao X, Li Y, Zhu Y, Liu F, Guo G, et al. High dose vitamin C infusion for the treatment of critically ill COVID-19. Ann Intensive Care 2021;11(1):5. *https://doi.org/10.1186/s13613-020-00792-3*.

Freier Zugang. Dies ist ein frei zugänglicher Artikel, der gemäß Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License *(https:// creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)*, verbreitet wird, wodurch uneingeschränkte Verwendung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Medium zu nicht kommerziellen Zwecken gestattet werden, solange Originalautor und Quelle genannt, ein Link zur CC-Lizenz angegeben und eventuelle Änderungen markiert werden.

Nicht authentifiziert | Heruntergeladen am 21.01.22 um 19:56 UTC