

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung von Subgruppen der Myalgischen  
Enzephalomyelitis/ des Chronischen Fatigue Syndroms  
basierend auf Erkrankungsbeginn, Symptomen und Biomarkern

Characterization of subgroups in Myalgic Encephalomyelitis/  
Chronic Fatigue Syndrome based on onset trigger, symptoms  
and biomarkers

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marvin Szklarski

Datum der Promotion: 30.11.2023

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstract (Deutsch)</b> .....	<b>9</b>
<b>Abstract (Englisch)</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>13</b>
1.1 <i>Myalgische Enzephalomyelitis/ Chronisches Fatigue Syndrom – Krankheitsbild und Diagnostik</i> .....	13
1.2 <i>Vorstellung untersuchter Marker</i> .....	16
1.2.1 Cluster of Differentiation 26.....	16
1.2.2 Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	18
1.3 <i>Zielsetzung</i> .....	22
<b>2. Methodik</b> .....	<b>23</b>
2.1 <i>Patient*innen und Kontrollkohorte</i> .....	23
2.2 <i>Fragebögen zur Symptomevaluation</i> .....	23
2.2.1 Symptom-Score.....	23
2.2.2 Composite Autonomic Symptom Score 31.....	24
2.2.3 Bell Disability Scale.....	24
2.2.4 Chalder Fatigue Scale.....	24
2.2.5 Short Form 36 Health Survey.....	25
2.3 <i>Schellong-Test</i> .....	25
2.4 <i>Labordiagnostik</i> .....	25
2.5 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> .....	27
2.5.1 Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	27
2.5.2 Bestimmung von sCD26.....	27
2.5.3 Bestimmung der AAK gegen GPCR.....	28

2.6 CD26-Expressionsanalysen .....	28
2.7 Statistik.....	31
<b>3 Kerneergebnisse.....</b>	<b>34</b>
3.1 <i>“Delineating the association between soluble CD26 and autoantibodies against G-protein coupled receptors, immunological and cardiovascular parameters identifies distinct patterns in post-infectious vs. non-infection-triggered Myalgic Encephalomyelitis/ Chronic fatigue syndrome” (Szklański et al., 2021).....</i>	34
3.1.1 Studienpopulation .....	34
3.1.2 Kernaussage 1.....	34
3.1.3 Kernaussage 2.....	36
3.1.4 Kernaussage 3.....	36
3.2 <i>“Autoantibodies to vasoregulative G-protein coupled receptors correlate with symptom severity, autonomic dysfunction and disability in Myalgic Encephalomyelitis / Chronic Fatigue Syndrome” (Freitag et al., 2021).....</i>	38
3.2.1 Studienpopulation .....	38
3.2.2 Kernaussage 1.....	38
3.2.3 Kernaussage 2.....	39
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>42</b>
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	42
4.2 Interpretation der Ergebnisse und Einbettung in den bisherigen Forschungsstand .....	42
4.2.1 Hinweise auf Autoimmunität bei infektionsassoziiertem ME/CFS .....	44
4.2.2 Mögliche Mechanismen GPCR-gerichteter Autoimmunität .....	45
4.2.3 Endotheliale Dysfunktion als mögliche Konsequenz GPCR-gerichteter Autoimmunität.....	46
4.2.4 Autoimmunität im Fokus erster Therapieansätze .....	48
4.3 Stärken und Schwächen der Studien .....	49
4.4 Implikationen für zukünftige Forschung.....	51
<b>5 Schlussfolgerungen .....</b>	<b>53</b>

<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>54</b>
<b>7 Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>67</b>
<b>8 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen</b> .....	<b>68</b>
<b>9 Publikationen im Rahmen dieser Dissertation</b> .....	<b>69</b>
8.1 SZKLARSKI, M., FREITAG, H., LORENZ, S., BECKER, S. C., SOTZNY, F., BAUER, S., HARTWIG, J., HEIDECKE, H., WITKE, K., KEDOR, C., HANITSCH, L. G., GRABOWSKI, P., SEPULVEDA, N. & SCHEIBENBOGEN, C. 2021. <i>Delineating     the Association Between Soluble CD26 and Autoantibodies Against G-Protein     Coupled Receptors, Immunological and Cardiovascular Parameters Identifies Distinct     Patterns in Post-Infectious vs. Non-Infection-Triggered Myalgic     Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. Front Immunol, 12, 644548.</i> .....	69
9.1.1 Auszug aus der Journal Summary List (ISi Web of KnowledgeSM): Immunology (2019).....	70
9.1.2 Druckversion der Publikation .....	72
9.2 FREITAG, H., SZKLARSKI, M., LORENZ, S., SOTZNY, F., BAUER, S., PHILIPPE, A., KEDOR, C., GRABOWSKI, P., LANGE, T., RIEMECASTEN, G., HEIDECKE, H. & SCHEIBENBOGEN, C. 2021. <i>Autoantibodies to Vasoregulative G-     Protein-Coupled Receptors Correlate with Symptom Severity, Autonomic Dysfunction     and Disability in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. J Clin Med,     10, 3675.</i> .....	86
9.2.1 Auszug aus der Journal Summary List (ISi Web of KnowledgeSM): Medicine, General and Internal (2020).....	87
9.2.2. Druckversion der Publikation .....	90
<b>10 Lebenslauf</b> .....	<b>103</b>
<b>11 Publikationsliste</b> .....	<b>104</b>
<b>12 Danksagung</b> .....	<b>105</b>

## Abkürzungsverzeichnis

- AAK - Autoantikörper
- ACE - Angiotensin Converting Enzyme
- AChR - Acetylcholinrezeptor
- AdR - Adrenerger Rezeptor
- ALAT - Alanin-Aminotransferase
- ANA - Antinukleäre Antikörper
- ANCA - Anti-Neutrophile-cytoplasmatische Antikörper
- APC - Antigen-präsentierende Zelle
- ASAT - Aspartat-Aminotransferase
- AT1-R - Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
- AUC - Area under the curve
- BH - Benjamini/Hochberg
- BNP - Brain Natriuretic Peptide
- BY - Benjamini/Yekutieli
- CARMA1 - Caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein-1
- CD - Cluster of Differentiation
- cGMP - Zyklisches Guanosinmonophosphat
- CK - Creatinkinase
- COMPASS 31 - Composite Autonomic Symptom Score 31
- COVID-19 - Coronavirus-disease-2019
- CrP - C-reaktives Protein
- DPP-4 - Dipeptidyl-Peptidase-4
- EBV - Epstein-Barr-Virus
- ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay
- eNOS - Endothelial Nitric Oxide Synthase
- ETA-R - Endothelin-Rezeptor Typ A
- ETB-R - Endothelin-Rezeptor Typ B
- EUROMENE - European Network on ME/CFS
- fT3 - Freies Trijodthyronin
- fT4 - Freies Tetrajodthyronin/Thyroxin
- G-Protein - Guanosintriphosphat-bindendes Protein

GDP - Guanosindiphosphat  
GGT - Gamma-Glutamyltransferase  
GLP-1 - Glucagon-like peptide-1  
GPCR - G-Protein-gekoppelter Rezeptor  
GTP - Guansintriphosphat  
HHV-6 - Humanes Herpesvirus 6  
Ig - Immunglobulin  
IL - Interleukin  
IL-1b - IL-1beta  
IQR - Interquartile range  
KLK - Kallikrein Related Peptide  
LDH - Laktatdehydrogenase  
M6P/IGFIIR - Mannose-6-Phosphat/Insulin-like Growth Factor II  
ME/CFS – Myalgische Enzephalomyelitis/Chronisches Fatigue Syndrom  
MFI - Mediane Fluoreszenzintensität  
MMP - Matrix-Metalloprotease  
MS - Multiple Sklerose  
NF-KB - Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells  
PAH - Pulmonal arterielle Hypertonie  
PAR - Protease-aktivierter Rezeptor  
PEM - Postexertionelle Malaise  
POTS - Posturales orthostatisches Tachykardiesyndrom  
RA - Rheumatoide Arthritis  
RAAS - Renin-Angiotensin-Aldosteron-System  
ROC - Receiver-Operating-Characteristic  
SARS-CoV-2 - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2  
sCD - Soluble Cluster of Differentiation  
SDF-1alpha - Stroma cell-derived Factor-1alpha  
SF-36 - Short Form 36 Health Survey  
sIL2R - Löslicher Interleukin-2-Rezeptor  
SLE - Systemischer Lupus erythematodes  
SSc - Systemische Sklerose  
Tg - Thyreoglobulin  
TPO - Thyreoperoxidase

TR - Thyreotropin-Rezeptor

TSH - Thyreoidea-stimulierendes Hormon

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: sCD26-Konzentration bei ME/CFS-Patient*innen und Kontrollen stratifiziert nach Geschlecht. ....	35
Abbildung 2: ROC-Kurven für die Unterscheidung von ME/CFS-Patient*innen und Kontrollen .....	35
Abbildung 3: Korrelationsnetzwerke zwischen sCD26 und klinischen sowie paraklinischen Parametern .....	38
Abbildung 4: Korrelationen zwischen AAB/IgG-Quotienten und Symptomen bei Patient*innen mit ME/CFS .....	41

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kanadische Konsenskriterien von 2003 zur Diagnosestellung bei ME/CFS. ....	14
Tabelle 2: Labordiagnostik .....	25
Tabelle 3: Fluoreszenzmarkierte Antikörper in der Durchflusszytometrie.....	30



## Abstract (Deutsch)

Die Myalgische Enzephalomyelitis, auch Chronisches Fatigue Syndrom genannt (ME/CFS), ist eine erworbene Multisystemerkrankung. Zu den Kernsymptomen zählen Fatigue, Belastungsintoleranz und Schmerzen sowie kognitive, autonome und immunologische Manifestationen. Die Diagnosestellung von ME/CFS basiert auf klinischen Kriterien. Spezifische Biomarker existieren derzeit nicht, Studien weisen jedoch auf eine Rolle von löslichem Cluster of Differentiation 26 (sCD26) und Autoantikörpern (AAK) gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) hin. In einer Vielzahl der Fälle beginnt die Erkrankung infolge von Infektionen. Ziel dieser Arbeit war es, die pathophysiologische Bedeutung potenzieller Biomarker unter Annahme unterschiedlicher Entstehungsmechanismen bei Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn gegenüber solchen mit anderweitigen Auslösern zu bestimmen.

In einer ersten Studie wurde sCD26, aufgrund der enzymatischen Aktivität auch Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) genannt, im Serum von 205 ME/CFS-Patient\*innen und 98 Kontrollen analysiert und verglichen. Es folgte für ME/CFS-Patient\*innen eine umfassende Korrelationsanalyse zwischen sCD26 und klinischen wie laborchemischen Parametern getrennt nach Art des Erkrankungsbeginns. Zusätzlich wurde für 12 Patient\*innen und 12 Kontrollen die CD26-Expression auf Lymphozytensubpopulationen bestimmt. In einer weiteren Studie erfolgte eine Korrelationsanalyse zwischen AAK gegen vasoregulative GPCR und Symptomausprägungen bei 116 ME/CFS-Patient\*innen getrennt nach Art des Erkrankungsbeginns.

Es konnte gezeigt werden, dass bei ME/CFS-Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn sCD26 mit zahlreichen immunologischen und metabolischen Parametern korrelierte, deren Veränderungen auch im Zusammenhang mit DPP-4-Inhibitoren beschrieben worden sind. Zudem zeigten sich inverse Korrelationen mit AAK gegen alpha1-adrenerge und M3-acetylcholinerge Rezeptoren. In dieser Subgruppe fanden sich in der zweiten Studie Korrelationen zwischen zahlreichen GPCR-AAK und der Schwere von Fatigue, Muskelschmerzen und kognitiven Symptomen sowie stärkerer alltagsrelevanter Funktionseinschränkung. Keine dieser Korrelationen fand sich bei Patient\*innen ohne infektionsassoziierten Erkrankungsbeginn. Hier korrelierte sCD26 invers mit orthostatisch verursachtem Herzfrequenzanstieg und AAK gegen alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren mit der Schwere orthostatischer Symptome.

Unterschiedliche Korrelationsmuster zwischen AAK gegen GPCR und Symptomen lassen die Annahme zu, dass es bei Patient\*innen mit ME/CFS nach einer Infektion infolge dieser zu einer veränderten Funktion der AAK oder ihrer Rezeptoren beziehungsweise Signalwege gekommen ist. Die Assoziation von sCD26 und GPCR-AAK deutet darüber hinaus auf die Dysregulation weiterer Teile des Immunsystems mit potenziell pathologischen Folgen hin. Die vorgestellten Unterschiede gegenüber Patient\*innen mit nicht-infektiöser Genese sprechen für zwei abgrenzbare Subgruppen.

## Abstract (Englisch)

Myalgic Encephalomyelitis, also known as Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS), is an acquired multisystemic disease. Symptoms include fatigue, exertion intolerance, pain as well as cognitive, autonomous and immunological manifestations. In the absence of serological biomarkers diagnosis is based on clinical criteria. Studies, however, indicate soluble cluster of differentiation 26 (sCD26) and autoantibodies (AAB) to G-protein coupled receptors (GPCR) to be involved. Disease onset is often preceded by infections. This dissertation aimed to evaluate the pathomechanistic role of potential biomarkers under the assumption of different factors driving the disease in patients with infection-triggered as compared to non-infectious ME/CFS.

In a first study, sCD26, also known as dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) due to its enzymatic activity, was analyzed in serum samples of 205 ME/CFS-patients as well as 98 controls. Comprehensive, onset-stratified correlation analyzes were performed between sCD26 and clinical as well as paraclinical parameters. In addition, CD26-expression on lymphocyte subpopulations was determined for 12 ME/CFS-patients and 12 controls. A second study evaluated correlations between symptom severity and AAB to vasoregulative GPCR in 116 ME/CFS-patients stratified by onset trigger.

In ME/CFS-patients with infection-triggered onset, several correlations between sCD26 and metabolic as well as immunological parameters were found which are in line with reported effects of DPP-4-inhibitors. Further, sCD26 inversely correlated with AAB against alpha1-adrenergic and M3-acetylcholinergic receptors. In this subgroup, the second study revealed correlations between several GPCR-AAB and the severity of fatigue, muscle pain, cognitive symptoms as well as adverse outcomes in the Short Form 36 Health Survey, the Composite Autonomic Symptom Score 31 and the Bell Disability Scale. None of these correlations were found in patients without infection-triggered onset. In the latter subgroup, sCD26 inversely correlated with changes in heart rate after orthostatic challenge and AAB against alpha- and beta-adrenergic receptors correlated with the severity of orthostatic symptoms.

Distinct correlation patterns between GPCR-AAB and symptoms suggest that in the postinfectious ME/CFS-subgroup functional changes to the GPCR-AAB or their receptors and respective pathways might have occurred in response to an infection. The associations found between GPCR-AAB and sCD26 point to dysregulations of further

parts of the immune system with potentially pathological implications. The results presented in this work indicate two delimitable subgroups in ME/CFS.

# 1. Einleitung

## 1.1 Myalgische Enzephalomyelitis/ Chronisches Fatigue Syndrom – Krankheitsbild und Diagnostik

Die Myalgische Enzephalomyelitis, auch Chronisches Fatigue Syndrom (ME/CFS), ist eine erworbene Erkrankung vielfältiger Symptomatik, welche häufig mit schweren persönlichen und beruflichen Einschränkungen für Betroffene einhergeht (Collin et al., 2011). Aktuelle Schätzungen aus den USA geben eine Prävalenz von 0,86% an, wobei besonders Frauen im jungen und mittleren Lebensalter betroffen sind (Valdez et al., 2018, Bakken et al., 2014).

Zu den häufigsten auslösenden Ereignissen einer ME/CFS-Erkrankung zählen akute Infektionen, welche sich meist in den oberen Atemwegen, dem Gastrointestinaltrakt oder in Form unspezifischer Allgemeinsymptome manifestieren (Carruthers et al., 2003, Chu et al., 2019). Wiederholt in Assoziation mit ME/CFS beschriebene Erreger sind unter anderem das Epstein-Barr-Virus (EBV), das humane Herpesvirus 6 (HHV-6), das Parvovirus B19 sowie Coxiella Burnetti (DuBois et al., 1984, Ablashi et al., 2000, Kerr et al., 2002, Ayres et al., 1998). Dieser Infektionsbezug gewinnt besondere Bedeutung im Rahmen der aktuellen Pandemie, ausgehend vom „Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2“ (SARS-CoV-2). Erste Auswertungen zeigten, dass Patient\*innen, welche nach einer SARS-CoV-2-Infektion die Diagnosekriterien für ME/CFS erfüllen, schwerere Fatigue und funktionelle Einschränkungen zeigen als solche mit chronischem Coronavirus-disease-2019(COVID-19)-Syndrom ohne Vollbild eines ME/CFS (Kedor et al., 2021). Darüber hinaus wurden unter anderem Stress und einschneidende Lebensereignisse als Auslöser beschrieben, wobei diese gleichzeitig als prädisponierende Faktoren in Verbindung mit einer Infektion diskutiert werden (Chu et al., 2019).

Zur Diagnosestellung werden die kanadischen Konsenskriterien von 2003 herangezogen. Demnach muss obligat eine neu aufgetretene körperliche oder geistige Erschöpfung unklarer Ursache vorliegen, welche durch physische oder kognitive Anstrengung überproportional verstärkt wird und meist nur mit einer Verzögerung von über 24 Stunden abklingt. Letzteres wird auch als postexertionelle Malaise (PEM) bezeichnet. Hinzu kommen Schlafstörungen und Muskel-, Gelenk- oder Kopfschmerzen. Patient\*innen leiden unter mindestens zwei Symptomen aus dem neurokognitiven Spektrum sowie mindestens einem Symptom aus zweien der Bereiche autonomer,

neuroendokriner oder immunologischer Manifestationen (Carruthers et al., 2003). Einen Überblick über die kanadischen Konsenskriterien bietet **Tabelle 1**.

*Tabelle 1: Kanadische Konsenskriterien von 2003 zur Diagnosestellung bei ME/CFS modifiziert nach (Carruthers et al., 2003)*

Die Symptome bestehen seit mindestens 6 Monaten und sind im Rahmen des Erkrankungsbeginns neu oder in veränderter Form aufgetreten.	
Hauptkriterien (alle müssen erfüllt sein)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fatigue</li> <li>• PEM</li> <li>• Schlafstörungen</li> <li>• Schmerzen</li> </ul>
Neurologische/kognitive Manifestationen (mindestens zwei müssen bestehen)	Verwirrung, Konzentrations- und Gedächtnisstörungen, Desorientierung, Wortfindungsstörungen, Störungen der Sensorik, Ataxie, Muskelschwäche, Faszikulationen, Reizempfindlichkeit
Mindestens ein Symptom in zwei der Kategorien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Autonome Manifestationen: beispielsweise orthostatische Intoleranz, Reizdarmsyndrom, Übelkeit, Miktionsstörungen, Palpitationen</li> <li>• Neuroendokrine Manifestationen: beispielsweise übermäßiges Schwitzen, Störungen der Temperaturregulation, Appetitverlust, Gewichtsveränderungen</li> <li>• Immunologische Manifestationen: beispielsweise Lymphknotenschwellung, grippeartige Symptome, neu aufgetretene Unverträglichkeiten</li> </ul>
Ausschlussdiagnosen	Morbus Addison, Cushing-Syndrom, Hyper- oder Hypothyreose, Anämie, Hämochromatose, Diabetes mellitus, maligne Erkrankungen, behandelbare Schlafstörungen, rheumatologische Erkrankungen, Immundefekterkrankungen, Multiple Sklerose, Parkinson-Syndrom, Myasthenia Gravis, Vitamin B12-Mangel, chronisch verlaufende Infektionserkrankungen wie

	Tuberkulose, chronische Hepatitis oder Lyme-Borreliose, primär psychiatrische Erkrankungen und Substanzabusus
Komorbiditäten	Fibromyalgie-Syndrom, myofaszielles Schmerzsyndrom, kranio-mandibuläre Dysfunktion, Reizdarmsyndrom, Interstitielle Zystitis, Reizblasensyndrom, Raynaud-Syndrom, Mitralklappenprolaps, Depression, Migräne, Allergien, Multiple Chemikaliensensibilität, Hashimoto-Thyreoiditis, Sicca-Syndrom

Verbreitet sind zudem weiterhin die Fukuda-Kriterien von 1994, welche jedoch weniger umfangreich sind und weitgehend von den kanadischen Konsenskriterien abgelöst wurden (Fukuda et al., 1994). Vor Diagnosestellung sollte eine umfangreiche Ausschlussdiagnostik anderer mit Fatigue einhergehender Erkrankungen erfolgen. Es wird empfohlen, mittels Anamnese, körperlicher und laborchemischer Untersuchung nach Hinweisen auf Herz-, Leber- oder Nierenfunktionsstörungen, Anämie, Endokrinopathien vor allem der Schilddrüse, Infektionen oder maligne Erkrankungen zu suchen. Weiterführende Untersuchungen wie eine zerebrale Bildgebung, Polysomnographie, serologische oder rheumatologische Diagnostik sollten nur bei entsprechenden Hinweisen erfolgen. Eine psychiatrische Mitbeurteilung zum Ausschluss einer schweren Depression ist sinnvoll (Carruthers et al., 2003, Grabowski and Scheibenbogen, 2020).

Spezifische, für die klinische Praxis empfohlene Biomarker zur Diagnostik des ME/CFS existieren derzeit nicht. Die ergänzenden diagnostischen Empfehlungen des „European Network on ME/CFS“ (EUROMENE) dienen lediglich unterstützend und lassen eine Einschätzung der Erkrankungsschwere zu (Nacul et al., 2021). So können verminderte Spiegel von Creatinkinase (CK) Ausdruck muskulärer Inaktivität im Rahmen eines schweren Verlaufes sein, ein erhöhtes „Brain Natriuretic Peptide“ (BNP) kann auf ein geringes Herzvolumen hindeuten (Nacul et al., 2019, Tomas et al., 2017). Bei Hinweisen auf einen Immundefekt sollte ein Immunglobulinmangel ausgeschlossen werden (Guenther et al., 2015).

Um die Suche nach diagnostischen Markern für ME/CFS zu organisieren, wurde im Rahmen des „EUROMENE ME/CFS Biomarker Landscape Project“ die aktuelle europäische Forschung zu diesem Thema systematisiert und analysiert. Das Ergebnis waren grundlegende strategische Empfehlungen zur Entwicklung diagnostischer

Biomarker für ME/CFS, darunter eine Stratifizierung der Patient\*innen nach Geschlecht und Art des Krankheitsbeginns sowie eine symptombasierte Subgruppendefinition (Scheibenbogen et al., 2017).

## 1.2 Vorstellung untersuchter Marker

### 1.2.1 Cluster of Differentiation 26

„Cluster of Differentiation“ (CD) 26 ist ein 110 Kilodalton großes Glykoprotein mit einer Vielzahl enzymatischer und nicht-enzymatischer Funktionen. Bestehend aus einem N-terminalen intrazellulären Teil, einer Transmembranregion und einem C-terminalen extrazellulär liegenden Teil, findet es sich an der Zelloberfläche verschiedener Ursprungsgewebe (Iwaki-Egawa et al., 1998). Es wird unter anderem auf Hepatozyten, Endothelzellen von Pankreas- und Gallengängen, in den proximalen Tubuli der Niere, auf vaskulärem Endothel, aber auch auf T- und B-Zellen exprimiert (Lojda, 1979, Augstein et al., 2015, Mentzel et al., 1996, Tanaka et al., 1992, Buhling et al., 1995).

Durch einen als „Shedding“ bezeichneten Vorgang kann eine lösliche Form (sCD26) proteolytisch abgespalten werden, welche nur aus der N-terminalen Domäne besteht (Iwaki-Egawa et al., 1998, Hooper et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass die Regulation des Shedding in glatter Gefäßmuskulatur durch die Matrix-Metalloproteasen (MMP) 1, 2 und 14, in Adipozyten durch MMP 9 und in T<sub>H17</sub>-Zellen durch „Kallikrein Related Peptide“ (KLK) 5 erfolgt (Rohrborn et al., 2014, Nargis et al., 2017). Als wichtige Quelle gelten zudem Lymphozyten, welche auf Aktivierung hin gespeichertes sCD26 freigeben (Casrouge et al., 2018, Lettau et al., 2019).

Schon früh wurde gezeigt, dass rekombinantes sCD26 die Proliferationsreaktion von T-Zellen nach Kontakt mit Tetanustoxoid verstärkt (Tanaka et al., 1994). Dieser Effekt scheint auf eine verstärkte Expression des co-stimulatorischen CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) zurückzugehen (Ohnuma et al., 2001). Später zeigten die Autor\*innen, dass für die proliferationsfördernden Eigenschaften des zellständigen CD26 die Bindung an Caveolin-1 auf APC von entscheidender Bedeutung ist. Zum einen verstärkt dies deren co-stimulatorische Wirkung mittels vermehrter CD86-Expression, zum anderen kommt es durch Interaktion zwischen CD26 und Caveolin-1 zur Aktivierung des „nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells“ (NF- $\kappa$ B)-Signalwegs über „Caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein-1“ (CARMA1) (Ohnuma et al., 2007, Ohnuma et al., 2005,



Ohnuma et al., 2004). Während frühere Studien die Effekte auf die T-Zellproliferation im Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität von CD26 sahen, sprechen neuere Daten dafür, dass weitere Mechanismen involviert sind (Yu et al., 2011, Ikeda et al., 2013).

Enzymatisch zählt CD26 zu den Serin-Proteasen und besitzt eine Dipeptidyl-Peptidase-4(DPP-4)-Aktivität, weshalb die Bezeichnungen CD26 und DPP-4 häufig analog verwendet werden (Tanaka et al., 1992). Diese Aktivität erlaubt es, Proteine mit bevorzugt Prolin oder Alanin in N-terminaler Position zu spalten und in ihrer Funktion zu beeinflussen (Heins et al., 1988). Es konnte gezeigt werden, dass 95% der Serum-DPP-4-Aktivität sCD26 zuzuschreiben sind (Durinx et al., 2000). Die Substrate von CD26 sind an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt. So beeinflusst CD26 die Migration von Leukozyten durch Spaltung des „Stroma cell-derived Factor-1alpha“ (SDF-1alpha) und Interaktion mit dem „Mannose-6-Phosphat/Insulin-like Growth Factor II“ (M6P/IGFIIIR) (Ikushima et al., 2002, Lambeir et al., 2001). Es spaltet „Glucagon-like peptide-1“ (GLP-1) und ist so an der Blutzuckerregulation beteiligt (Mentlein et al., 1993). Über Interaktion mit BNP und Bradykinin, sowie Steuerung der endothelialen Stickstofffreisetzung hat CD26 Einfluss auf den Blutdruck (Vanderheyden et al., 2009, Fryer et al., 2008, Mason et al., 2012). Entsprechend konnten unter Therapie mit DPP-4-Inhibitoren im Rahmen der Behandlung eines Diabetes mellitus neben der angestrebten Blutzuckerkontrolle auch eine verminderte T-Zellproliferation und Zytokinproduktion, eine verbesserte Endothelfunktion und eine Senkung des Blutdrucks beobachtet werden (Matsubara et al., 2012, Oliveira et al., 2019, Kitagawa et al., 2018, Richter et al., 2008). Veränderungen von sCD26-Serumkonzentration und zellulärer CD26-Expression wurden bei verschiedenen Krankheitsbildern mit klinischen Ähnlichkeiten zu ME/CFS beschrieben. Verminderte sCD26-Serumkonzentrationen fanden sich bei Patient\*innen mit Rheumatoider Arthritis (RA), Systemischem Lupus erythematodes (SLE), generalisierten Anti-Neutrophile-cytoplasmatische-Antikörper(ANCA)-assoziierten Vaskulitiden, aber auch Multipler Sklerose (MS) (Cordero et al., 2001, Schonermarck et al., 2000, Kobayashi et al., 2002, Tejera-Alhambra et al., 2014). Bei Patient\*innen mit RA korrelierte die sCD26-Serumkonzentration invers mit der Anzahl geschwollener Gelenke, bei SLE-Patient\*innen zeigte sich eine inverse Korrelation mit dem „SLE Disease Activity Index Score“ und im Falle von ANCA-assoziierten Vaskulitiden stiegen die sCD26 Serumkonzentrationen mit der Remission der Erkrankung wieder an (Cordero et al., 2001, Schonermarck et al., 2000, Kobayashi et al., 2002). Die Expressionsdichte von

CD26 auf Monozyten und CD4+ T-Zellen von Patient\*innen mit aktiver RA fand sich erhöht, bei Patient\*innen mit SLE war sie auf CD4+ T-Zellen und natürlichen Killerzellen vermindert (Ellingsen et al., 2007, Wong et al., 2009). Bei Patient\*innen mit MS fanden sich vermehrt CD26-exprimierende CD8+ und CD4+ T-Zellen, wobei die Frequenz letzterer mit dem „MS Severity Score“ und der Anzahl neuer kontrastmittelanreichernder Läsionen in der kranialen Magnetresonanztomographie korrelierte (Tejera-Alhambra et al., 2014, Khoury et al., 2000, Krakauer et al., 2006).

Klimas et al. beschrieben erstmals eine erhöhte Zahl CD26-exprimierender CD2+ T-Zellen in Zusammenhang mit ME/CFS (Klimas et al., 1990). Nachfolgend fanden sich ein erhöhter Anteil CD26-exprimierender CD2+CD8+ T-Zellen bei ME/CFS-Patient\*innen und es wurde gezeigt, dass Patient\*innen mit einem viralen Erkrankungsbeginn mehr CD26-exprimierende CD2+, CD4+ sowie CD2+CD4+ T-Zellen aufweisen als solche ohne viralen Beginn der Erkrankung (Porter et al., 2010). Die Serumkonzentrationen von sCD26 bei ME/CFS zeigten sich vermindert, ebenso wie die Expressionsdichte von CD26 auf CD2+ T-Zellen, während die Gesamtzahl CD26-exprimierender Zellen als erhöht beschrieben wurde. Die Anzahl CD26-exprimierender Zellen, die Expressionsdichte und die sCD26-Konzentrationen wurden als ausreichend sensitive diagnostische Marker für ME/CFS evaluiert (Fletcher et al., 2010). Darüber hinaus fand sich bei ME/CFS-Patient\*innen eine Verringerung der DPP-4-Aktivität auf mononuklearen Zellen des peripheren Blutes, gemessen per Substratumsatz. Niedrige DPP4-Aktivität korrelierte mit gesteigerter belastungsabhängiger Lipidperoxidation, welche im Rahmen eines Ungleichgewichtes des Reduktions-Oxidations-Systems interpretiert wurde. Die DPP-4-Aktivität korrelierte weiterhin mit der „London Handicap Scale“ und invers mit dem Schmerzaspekt des „Short Form 36 Health Survey“ (SF-36) (Fenouillet et al., 2016).

## 1.2.2 Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

### 1.2.2.1 Autoimmunität

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig), dienen als Teil der erworbenen Immunantwort der Abwehr verschiedener Erreger. Sie erkennen dabei eine spezifische Zielstruktur, das Antigen, und können diese inaktivieren oder für andere Teile des Immunsystems markieren (Schroeder and Cavacini, 2010). Im Rahmen der B-Zellreifung entsteht durch Umsortierung bestimmter variabler Genregionen und zufällige Punktmutationen eine Vielzahl verschiedener Antikörper, von denen diejenigen, welche das präsentierte

Antigen am besten binden, selektiert werden. Zugunsten der großen Variabilität dieses Prozesses wird die Entstehung von Antikörpern in Kauf genommen, welche sich gegen körpereigene Strukturen richten, sogenannter Autoantikörper (AAK). Ein Großteil dieser autoreaktiven B-Zellen wird im Prozess der B-Zellreifung aussortiert (Wardemann et al., 2003).

Autoimmunität kann jedoch auch auf anderem Wege zustande kommen. Zu den führenden Hypothesen gehört die des „Molecular Mimicry“. Dieser zufolge kann sich eine Immunreaktion gegen Erregerbestandteile auch gegen körpereigene Strukturen richten, sofern beide Antigene eine große strukturelle Ähnlichkeit aufweisen (Fujinami and Oldstone, 1985). Dagegen können nach dem Modell der „Bystander Activation“ die im Rahmen einer Infektion hohen lokalen Zytokinspiegel, vor allem von Typ-1-Interferon, genügen, um T-Zellen Antigen-unabhängig zu aktivieren (Tough et al., 1996). Auf diese Weise können zudem selbstreaktive T-Zellen aktiviert werden, deren Bindungsstärke im Normalfall nicht für eine Aktivierung ausreicht (Enouz et al., 2012). Zuletzt können durch sogenanntes „Epitope Spreading“ während einer Infektion auch nicht-strukturverwandte Antigene Ziel der Immunreaktion werden (Miller et al., 1997).

Kommt es im Rahmen der Immunreaktion gegen körpereigene Zellen zu einer Beeinflussung oder Zerstörung dieser, so spricht man von einer Autoimmunerkrankung.

#### *1.2.2.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren*

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) bilden eine der größten Rezeptorklassen des menschlichen Körpers und sind an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt. Strukturelle Gemeinsamkeiten aller GPCR sind ein N-terminal extrazellulärer Teil, eine Abfolge von sieben alpha-Helices, welche die Zellmembran durchziehen, und ein C-terminal intrazellulärer Teil. Hinzu kommt ihre Fähigkeit, mit einem Guanosintriphosphat(GTP)-bindenden Protein (G-Protein) zu interagieren (Fredriksson et al., 2003). G-Proteine bestehen aus je einer alpha-, beta- und gamma-Untereinheit. Die alpha-Untereinheit ist in der Lage GTP zu binden und zu Guanosindiphosphat (GDP) zu spalten. Im inaktiven Zustand ist GDP gebunden und die G-alpha-Einheit liegt im Verbund mit G-beta und -gamma vor. Auf die Aktivierung des Rezeptors hin dissoziiert GDP von der alpha-Untereinheit und GTP wird gebunden. Die alpha-Untereinheit löst sich vom Komplex aus beta- und gamma-Untereinheit. Beide Teile können nun Effekte in der nachfolgenden Signalkette auslösen, wobei für die alpha-Untereinheit vier verschiedene Formen mit unterschiedlichen nachgeschalteten Effekten existieren. Nach Hydrolyse des GTP

zu GDP assoziieren alpha- und beta-/gamma-Untereinheiten des G-Proteins wieder in ihrem inaktiven Zustand (Gilman, 1995).

### *1.2.2.3 In dieser Arbeit analysierte GPCR-AAK*

Zunehmend finden sich Hinweise auf vaskuläre Dysfunktion und Störungen der Kreislaufregulation bei Patient\*innen mit ME/CFS. Es konnte gezeigt werden, dass es belastungsabhängig zu einer verminderten Sauerstoffversorgung der Skelettmuskulatur kommt (Keller et al., 2014). Weiterhin wurde eine übermäßig verminderte zerebrale Perfusion als Reaktion auf orthostatischen Stress beobachtet (van Campen et al., 2020). Es lässt sich somit vermuten, dass Störungen der Perfusion an der Entstehung muskulärer sowie kognitiver Symptomatik bei ME/CFS beteiligt sind (Wirth and Scheibenbogen, 2020).

In dieser Arbeit wurden aus diesem Grund AAK gegen GPCR analysiert, welche an der Gefäß- und Kreislaufregulation beteiligt sind. Alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren (AdR) entfalten ihre Wirkung als Zielrezeptoren in sympathisch innervierten Geweben nach Bindung von Noradrenalin. Bezogen auf die Kreislaufregulation vermitteln postsynaptisch gelegene alpha1- und in geringerem Maße auch alpha2-AdR vasokonstriktorische Effekte, während präsynaptische alpha2-AdR im Sinne einer negativen Rückkopplung die Wirkung des Noradrenalins dämpfen (Duka et al., 2000, Langer, 1974). Die Aktivierung von alpha1-AdR am Herzen steigert Schlagkraft (positive Inotropie) und Herzfrequenz (positive Chronotropie), wohingegen präsynaptische alpha2-AdR auch hier eine hemmende Wirkung haben (Curiel et al., 1989, Parker et al., 1995). Beta1- und beta-2-AdR bewirken an den Gefäßen eine Vasodilatation (Chruscinski et al., 2001). Sie finden sich zudem auf Kardiomyozyten und bewirken dort positive Ino- und Chronotropie, sowie eine schnellere Relaxation (positive Lusitropie), wobei beta-1-AdR deutlich stärker exprimiert sind (Kaumann et al., 1996, Steinfath et al., 1992). Dahingegen wurde für beta-3-AdR eine negativ inotrope und vasodilatorische Wirkung beschrieben (Trochu et al., 1999, Gauthier et al., 1996). Muskarinische Acetylcholinrezeptoren (AChR) werden als Zielrezeptoren des Parasympathikus durch Acetylcholin aktiviert. M3-AChR wirken vasodilatorisch und beeinflussen die Schlagkraft und -frequenz des Herzens negativ (Beny et al., 2008, Wang et al., 1999). M4-AChR wurden auf venösem Endothel und in der zerebralen Mikrozirkulation gefunden (Radu et al., 2017, Ryberg et al., 2008). Ein vasokonstriktorisches Effekt wird angenommen (Kovalenko et al., 2014). Mit Endothelin-1 wurde zuletzt ein weiterer wichtiger Mediator in der Gefäßregulation

entdeckt (Yanagisawa et al., 1988). Es vermittelt Vasokonstriktion über den Endothelin-Rezeptor Typ A (ETA-R), während die Aktivierung von Endothelin-Rezeptoren vom Typ B (ETB-R) vasodilatorisch wirkt (Verhaar et al., 1998). Beide Rezeptoren wurden auch am Herzen nachgewiesen, wobei vor allem ETA-R zu positiver Inotropie beitragen (Ponické et al., 1998). Angiotensin II ist als Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ein wichtiger Bestandteil der Blutdruckregulation. Durch Bindung am Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT1-R) vermittelt es unter anderem Vasokonstriktion (Nguyen Dinh Cat and Touyz, 2011). Die Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) 1, auch Thrombin-Rezeptor, und 2 spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Entzündungssignalen. Anders als bei den zuvor vorgestellten Rezeptoren sind die Liganden hier Teil der N-terminalen Sequenz und können nach Abspaltung durch bestimmte Proteasen den Rezeptor aktivieren (Vu et al., 1991). Während man zunächst eine vasokonstriktorische Wirkung von PAR-1 und eine vasodilatorische Wirkung von PAR-2 vermutete, zeigten erste in-vivo Ergebnisse am Menschen ein differenzierteres Bild (Tognetto et al., 2003, Tennant et al., 2008). So führte die Aktivierung von PAR-2 zu einer Vasodilatation im arteriellen und venösen System, während eine PAR-1-Aktivierung nur im venösen System eine Vasokonstriktion verursachte (Gudmundsdottir et al., 2006). AAK gegen einige dieser GPCR wurden im Zusammenhang mit verschiedenen kardiovaskulären und rheumatischen Erkrankungen beschrieben. Erste Ergebnisse legten eine Beteiligung beta1-AdR-gerichteter AAK in der Pathogenese dilatativer Kardiomyopathie nahe (Wallukat et al., 1991). Es wurden AAK gegen alpha1-AdR und AT1-R bei Patient\*innen mit arterieller Hypertonie gefunden (Fu et al., 2000, Fu et al., 1994). AAK gegen AT1-R konnten auch bei Patient\*innen mit vaskulärer Nierentransplantatabstoßung und Präeklampsie nachgewiesen werden (Wallukat et al., 1999, Dragun et al., 2005). Bei Patient\*innen mit pulmonal arterieller Hypertonie (PAH) im Rahmen eines SLE wurden vermehrt AAK gegen ETA-R gemessen, bei PAH im Rahmen einer Systemischen Sklerose (SSc) vermehrt ETA-R und AT1-R-AAK (Guo et al., 2015, Becker et al., 2014). Erhöhte Serum-AAK gegen alpha1-AdR und M4-AChR wurden im Zusammenhang mit dem posturalen orthostatischen Tachykardiesyndrom (POTS) beschrieben (Gunning et al., 2019). Eine neuere Studie identifizierte spezifische AAK-Muster sowohl bei Patient\*innen mit verschiedenen Erkrankungen als auch bei gesunden Kontrollen. Es wurde diskutiert, dass diese AAK nicht zwangsläufig mit Autoimmunerkrankungen einhergehen müssen, sondern auch als Teil eines

physiologischen regulatorischen Netzwerkes verstanden werden können (Cabral-Marques et al., 2018).

Tanaka et al. zeigten erstmals erhöhte Serumkonzentrationen von M1-AChR-AAK in ME/CFS-Patient\*innen und assoziierten diese mit vermehrter muskulärer Schwäche (Tanaka et al., 2003). Erhöhte AAK-Konzentrationen gegen beta2-AdR, sowie M3- und M4-mAChR bei Patient\*innen mit ME/CFS wurden von Mitarbeiter\*innen der AG Scheibenbogen nachgewiesen (Loebel et al., 2016). Eine weitere Studie bestätigte erhöhte Serumkonzentrationen von AAK gegen beta2-AdR, M3- und M4-mAChR, sowie beta1-AdR (Bynke, 2020). Es wurde gezeigt, dass Serum-AAK gegen muskarinische AChR das Bindungsverhalten zerebraler AChR beeinflussen und erhöhte Serum-Spiegel von beta2-AdR-AAK wurden zuletzt mit strukturellen Veränderungen in für die Schmerzmodulation zuständigen Hirnregionen in Verbindung gebracht (Yamamoto et al., 2012, Fujii et al., 2020). Erste Therapiestudien mittels Immunadsorption bei ME/CFS-Patient\*innen mit erhöhten beta2-AdR-AAK-Konzentrationen zeigten einen erfolgreichen Rückgang dieser AAK und eine teils Monate lang anhaltende Besserung der Symptomatik (Scheibenbogen et al., 2018, Tolle et al., 2020).

### 1.3 Zielsetzung

Erstes Ziel dieser Arbeit war es, sCD26 als vielversprechenden Biomarker unter der Annahme unterschiedlicher zugrundeliegender Pathomechanismen bei ME/CFS-Patient\*innen mit und ohne infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn zu analysieren. Hierzu erfolgte neben der vergleichenden Analyse der sCD26-Konzentrationen bei Patient\*innen und Kontrollen eine umfassende Korrelationsanalyse mit klinischen und laborchemischen Parametern, darunter den zuletzt intensiv beforschten AAK gegen GPCR. Vor dem Hintergrund dieser ersten Arbeit erfolgte eine weitere Studie, in welcher der Zusammenhang zwischen AAK gegen GPCR und der Symptomatik der Patient\*innen unter Berücksichtigung eines infektionsassoziierten Erkrankungsbeginns untersucht wurde.

## 2. Methodik

Die diagnostische Evaluation der Patient\*innen sowie die Symptomerfassung bei Studieneinschluss erfolgten in beiden hier vorgestellten Studien nach demselben Prozedere. Auf methodische Eigenheiten bei der Bestimmung der jeweiligen untersuchten Biomarker wird an den entsprechenden Stellen eingegangen.

### 2.1 Patient\*innen und Kontrollkohorte

Die Studienpatient\*innen wurden im Rahmen der ME/CFS-Sprechstunde der Klinik für Medizinische Immunologie an der Charité Universitätsmedizin Berlin rekrutiert. Voraussetzung für die Vorstellung war eine umfangreiche ambulante internistische und neurologische Ausschlussdiagnostik anderer Erkrankungen, welche mit Fatigue einhergehen können. Die Diagnosestellung basierte auf den kanadischen Konsenskriterien von 2003 (Carruthers et al., 2003). Bei allen Patient\*innen erfolgte eine anamnestische Abklärung von Krankheitsbeginn und -verlauf, wobei spezifisch nach einer Infektion zu Beginn der Beschwerden gefragt wurde. Weiterhin wurden mögliche Komorbiditäten erfasst. Die Kontrollkohorte zum Vergleich der sCD26-Serumspiegel wurde nach anamnestischem Ausschluss von Fatigue oder mit solcher einhergehender Erkrankungen unter den Mitarbeiter\*innen der Klinik für Medizinische Immunologie der Charité Universitätsmedizin Berlin rekrutiert. Es erfolgte keine weitere klinische oder laborchemische Evaluation. Die Studien wurden im Rahmen der Ethikanträge EA2/038/14, EA2/067/20 und EA4/090/10 seitens der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin genehmigt. Alle Patient\*innen und Mitarbeiter\*innen in der Kontrollkohorte gaben ihre informierte schriftliche Zustimmung zur Teilnahme.

### 2.2 Fragebögen zur Symptomevaluation

#### 2.2.1 Symptom-Score

Die Schwere der Kernsymptome des ME/CFS basierend auf den kanadischen Kriterien von 2003 wurde in Anlehnung an einen von Fluge et al. entwickelten Fragebogen evaluiert (Carruthers et al., 2003, Fluge et al., 2015). Erfasst wurden Fatigue, Muskelschmerzen, immunologische Symptome als Mittelwert der Angaben für schmerzhafte Lymphknoten, Halsschmerzen und grippale Beschwerden, kognitive Einschränkungen als Mittelwert der Angaben für Erinnerungsvermögen, Konzentrationsfähigkeit und geistige Ermüdbarkeit, sowie eine Einschätzung der

allgemeinen Erkrankungsschwere. Fehlende Beschwerden wurden dabei subjektiv durch die Patient\*innen mit „1“ bewertet, stärkste Beschwerden mit „10“. In der zweiten vorgestellten Studie wurden nur die Kernsymptome ohne die Einschätzung der allgemeinen Erkrankungsschwere eingeschlossen.

### 2.2.2 Composite Autonomic Symptom Score 31

Zur Einschätzung von Symptomen autonomer Dysfunktion wurde der „Composite Autonomic Symptom Score 31“ (COMPASS-31) verwendet (Sletten et al., 2012). Dieser deckt neben Symptomen orthostatischer Intoleranz, vasomotorische, sekretomotorische und gastrointestinale Manifestationen sowie Beschwerden im Zusammenhang mit der Miktionskontrolle und Pupillomotorik ab. Dabei beziehen sich die Fragen auf spezifische Symptome aus den jeweiligen Bereichen und deren Verlauf über die Zeit. Die Punkte in den einzelnen Kategorien werden nach Vorgabe der Autor\*innen gewichtet. Eine maximale Punktzahl von „100“ für den kumulativen Score steht für schwerste Symptome, während „0“ fehlende Beschwerden beschreibt.

### 2.2.3 Bell Disability Scale

Die Einschränkung des Alltags durch die Erkrankung wurde mittels eines Fragebogens nach Bell erhoben (Bell, 1995). Die Patient\*innen ordneten ihren Aktivitätszustand deskriptiven Items zu. Ein Bell-Score von „0“ beschreibt einen Zustand der Bettlägerigkeit, ein Bell-Score von „100“ steht für ein normales Aktivitätsniveau ohne Einschränkung des Alltags.

### 2.2.4 Chalder Fatigue Scale

Zur weiteren Evaluation Fatigue-bezogener Einschränkungen wurde in der ersten vorgestellten Studie die „Chalder Fatigue Scale“ genutzt (Cella and Chalder, 2010, Chalder et al., 1993). Anhand einer Likert-Skala gaben die Patient\*innen Auskunft über die Ausprägung elf verschiedener Aspekte der Fatigue im Vergleich zum Zeitpunkt vor Beschwerdebeginn. Eine Maximalpunktzahl von „33“ spricht für eine schwere Ausprägung, die Minimalpunktzahl ist „0“.



### 2.2.5 Short Form 36 Health Survey

Mithilfe eines Teilbereiches des SF-36 wurden körperliche Aktivitäten des täglichen Lebens eingeschätzt (Ware and Sherbourne, 1992). Jede der zehn angeführten Aktivitäten war mit „stark eingeschränkt – 0 Punkte“, „etwas eingeschränkt – 5 Punkte“ oder „überhaupt nicht eingeschränkt – 10 Punkte“ zu bewerten. Ein Ergebnis von „0“ Punkten beschreibt maximale Einschränkungen im täglichen Leben, „100“ Punkte entsprechen voller Belastbarkeit.

### 2.3 Schellong-Test

Zur Detektion eines häufig mit ME/CFS vergesellschafteten POTS erfolgte ein Schellong-Test. Nach 10-minütiger Ruhezeit im Sitzen wurden zunächst Ruhepuls und -blutdruck erfasst. Die Patient\*innen wurden gebeten, aufzustehen und es wurden Puls und Blutdruck unmittelbar, sowie zwei, fünf und zehn Minuten nach dem Aufstehen erfasst. Abbruchkriterien waren Erschöpfung, Schwindel und drohende Ohnmacht. Ein POTS wurde diagnostiziert bei einem Anstieg der Herzfrequenz um mindestens 30 Schläge pro Minute im Vergleich zum Ausgangswert oder auf einen Absolutwert von über 120 Schläge pro Minute ohne symptomatischen Blutdruckabfall. Ein in einigen Fällen bereits extern diagnostiziertes POTS wurde ebenfalls als solches eingeschlossen.

### 2.4 Labordiagnostik

Alle Patient\*innen erhielten im Rahmen der Diagnosestellung eine ausführliche Labordiagnostik durch die Labor Berlin GmbH, welche der Ausschlussdiagnostik und Erfassung von Immundefekten diente. Für die Korrelationsanalysen mit sCD26 wurden diejenigen Parameter eingeschlossen, für die sich basierend auf den enzymatischen und nicht-enzymatischen Funktion von CD26 eine Interaktion vermuten ließ. Einen Überblick bietet **Tabelle 2**.

*Tabelle 2: Labordiagnostik*

Bereich	Untersuchte Parameter
Hämatologie	Differentialblutbild
Klinische Chemie	Natrium, Kalium, Calcium, Phosphat, Zink, Kreatinin, Alanin-Aminotransferase

	(ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Gamma-Glutamyltransferase (GGT), Bilirubin, NTpro-BNP, Laktatdehydrogenase (LDH), CK, HbA1c, Albumin, Gesamtprotein, Serumelektrophorese: IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, Komplementfaktoren C3 und C4, Ferritin, Angiotensin Converting Enzyme (ACE), C-reaktives Protein (CrP)
Endokrinologie	basales Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH), freies Trijodthyronin (fT3), freies Tetrajodthyronin/Thyroxin (fT4), Thyreoperoxidase(TPO)-Antikörper, Thyreotropin-Rezeptor(TR)-Antikörper, Thyreoglobulin(Tg)-Antikörper
Immunologie	Lymphozytensubpopulationen: CD3+ T-Zellen, CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen, CD4+CD8+ in % der T-Zellen, CD4/CD8-Ratio, CD19+ B-Zellen, Aktivierungsmarker: HLA-DR+ in % der CD8+ T-Zellen, CD11a in % der CD8-T-Zellen, CD28+ in % der CD8+ T-Zellen, CD57+ in % der CD8- T-Zellen, monozytäre HLA-DR-Expression, Antinukleäre Antikörper (ANA), löslicher Interleukin(IL)-2-Rezeptor (sIL2R), IL-1beta (IL-1b)

## 2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

### 2.5.1 Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die Bestimmung des sCD26 erfolgte nach dem Prinzip des „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA). Die Grundidee dieses Verfahrens besteht darin, dass die zu messende Zielstruktur bzw. das Antigen in der Probe mittels spezifisch zugeschnittener Antikörper gebunden werden kann. Die Antikörper sind auf einer Mikrotiterplatte fixiert, weshalb auch von einem Festphasen-Assay gesprochen wird. Im nächsten Schritt erkennt ein weiterer Antikörper den Komplex aus Antigen und dem ersten Antikörper beziehungsweise eine noch ungebundene Stelle des Antigens. Zur Detektion ist ein Enzym an den zweiten Antikörper gebunden, welches durch Umsatz seines Substrates einen Farbumschlag oder eine Fluoreszenzreaktion auslöst. Die Signalstärke der Messung ist dabei proportional zum gebundenen Antigen. In der Praxis verläuft der beschriebene Bindungsprozess, auch Konjugation, in mehreren Stufen, wobei nach jeder Konjugation ungebundene Antikörper oder Substrate gründlich ausgewaschen werden (Wild, 2013).

### 2.5.2 Bestimmung von sCD26

Für die Bestimmung der sCD26-Konzentration im Serum wurde das Human sCD26 ELISA Kit von Thermo Fisher Scientific® verwendet. Das Serum der Patient\*innen und Kontrollen wurde dabei je auf eine mit gegen humanes sCD26 gerichteten Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Ein zweiter mit Biotin konjugierter Antikörper setzte sich nach Zugabe an die auf der Mikrotiterplatte fixierten sCD26-Moleküle. Nicht gebundene Biotin-konjugierte Antikörper wurden nachfolgend ausgewaschen. Im nächsten Schritt wurde mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin hinzugegeben, welches an Biotin bindet. Nach erneutem Waschen wurde als Substrat der Meerrettichperoxidase Tetramethylbenzidin hinzugefügt (Thermo Fischer Scientific Inc., 2018). Tetramethylbenzidin ist ein sogenanntes Chromogen. Es nimmt im Rahmen der durch Meerrettichperoxidase katalysierten Oxidation zunächst eine blaue und im weiteren Verlauf eine gelbe Farbe an (Josephy et al., 1982). Nach Einstellen einer dunkelblauen Farbe im Assay, wurde Phosphorsäurelösung hinzugegeben, um die Reaktion zu beenden. Photometrisch erfolgte die Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 450nm. Diese ist nach dem oben vorgestellten Prinzip proportional zur Konzentration des sCD26. Mithilfe einer für den Assay erstellten Standardkurve, welche

durch Messung der Absorption bei bekannten Konzentrationen von sCD26 in einer Standardlösung gewonnen wurde, konnte auf die Konzentration von sCD26 im Serum der Patient\*innen beziehungsweise der Kontrollen zurückgeschlossen werden (Thermo Fischer Scientific Inc., 2018).

### 2.5.3 Bestimmung der AAK gegen GPCR

Die Bestimmungen der AAK gegen AdR, AChR, ETA-/ETB-R, AT1-R sowie die PAR 1 und 2 wurden durch die CellTrend GmbH Luckenwalde durchgeführt. Das Grundprinzip des ELISA-Verfahrens wurde auch hier angewendet. Da in diesem Falle jedoch keine Antigene, sondern Antikörper im Serum detektiert werden sollen, unterscheidet sich die Herangehensweise. Die Mikrotiterplatte wird mit dem Antigen beschichtet, gegen welches sich der zu messende Antikörper richtet. Der zur Detektion hinzugegebene Antikörper bindet nun an den Fc-Teil des Serum-Antikörpers (Wild, 2013).

Im verwendeten ELISA-System wurde die Mikrotiterplatte mit vollständigen GPCR-Molekülen beschichtet. Die in der Folge zur Detektion verwendeten Antikörper waren auch hier mit Meerrettichperoxidase für die Chromogenreaktion konjugiert. Für die Erstellung der Standardkurven wurden Test-Sera von Index-Patient\*innen mit bekannter GPCR-AAK-Konzentration verwendet (beispielhaft anhand des Datenblattes zum AT1-R-IgG-ELISA ((CellTrend GmbH, 2018)).

## 2.6 CD26-Expressionsanalysen

Die Expression von CD26 auf der Oberfläche von Lymphozytensubpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die betreffenden Zellen werden hierbei innerhalb einer Hüllflüssigkeit, meist Kochsalzlösung, durch eine Messküvette geleitet. Durch eine zunehmende Verengung der Küvette reihen sich die Einzelzellen im Strom nacheinander ein. Der Hüllstrom wird nun im rechten Winkel an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Am Kreuzungspunkt von Probenstrom und Laserstrahl wird das von jeder Zelle abgelenkte Licht detektiert. Man unterscheidet Seitwärtsstreulicht, auch „side scatter“, welches im rechten Winkel zum Laserstrahl abgelenkt wird, von Vorwärtsstreulicht, auch „forward scatter“, welches nur wenig von der Richtung des Laserstrahls abweicht. Während das Vorwärtsstreulicht ein grobes Maß für die Zellgröße darstellt, hängt das Seitwärtsstreulicht von der Streuung durch intrazelluläre Zellbestandteile ab. Die Erfassung des Streulichtes erfolgt mithilfe sogenannter

„Photomultiplier“, welche dieses in elektrische Signale umwandeln. Zusätzlich können Zellstrukturen mit Fluoreszenzmarkern gefärbt und ihre Expression erfasst werden. Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Lage, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren, die Lichtenergie zu speichern und schließlich in Form längerwelliges Lichtes zu emittieren. Es existieren verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in Absorptions- und Emissionsspektren unterscheiden. Diese können nun an Antikörper gekoppelt werden, welche sich gegen Oberflächenantigene von Leukozyten richten, und so deren Detektion und Charakterisierung möglich machen. Die gemessenen Lichtsignale werden nachfolgend digitalisiert und zur Auswertung dargestellt. Klassischerweise werden dabei Punktdiagramme erzeugt, in welchen jeder einer Zelle entsprechende Messpunkt über die detektierte Lichtintensität zweier Messparameter definiert wird. Im ersten Schritt werden meist die Intensitäten von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht dargestellt. Anhand von in Kontrollmessungen definierten Grenzen können so Zellgruppen bestimmter Größe und Granularität abgegrenzt werden, welche als Populationen bezeichnet werden. Die weitere Analyse kann nun auf die Populationen fokussiert werden, was als „Gating“ bezeichnet wird. Über schrittweisen Einschluss von Fluoreszenzmessungen und die Kombination mehrerer Gates können so Leukozytensubpopulationen und die Expression bestimmter Oberflächenantigene wie CD26 innerhalb dieser charakterisiert werden. Zur Differenzierung werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, welche sich in ihren Emissions- und Exzitationsmaxima unterscheiden (Rothe, 2007).

In der hier erfolgten Analyse wurden die Zellen zunächst mit zwei-prozentigem polyklonalem Immunglobulin behandelt, um zu verhindern, dass Fc-Rezeptoren auf den Zellen die Antikörper unspezifisch binden und so die Ergebnisse verfälschen. Es folgte die Markierung lebendiger und toter Zellen mithilfe des LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit von Thermo Fisher Scientific®. Zur Messung wurden die Zellen nun konsekutiv mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CCR7, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD56, CD19 und schließlich CD26 in Übereinstimmung mit den aktuellen Standards zur Immunphänotypisierung gefärbt (Maecker et al., 2012). Die verwendeten Antikörper und Fluoreszenzmarker gemäß Herstellerangaben sind in **Tabelle 3** dargestellt. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mittels CytoFLEX LX von Beckman Coulter®. Zur Datenanalyse wurde die Software FlowJo 10.0.08 genutzt. Neben dem Anteil CD26-exprimierender Zellen innerhalb der jeweiligen Lymphozytensubpopulation wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) für CD26 bestimmt. Unter der Annahme, dass die Intensität der Fluoreszenzreaktion mit der Zahl

gebundener Antikörper korreliert, ist die MFI ein Maß für die Stärke der zellulären Expression des Zielantigens.

*Tabelle 3: Fluoreszenzmarkierte Antikörper in der Durchflusszytometrie*

Oberflächenantigen	Zielzellen (Maecker et al., 2012)	Fluoreszenzmarker	Antikörper	Emission <sub>max</sub>	Exzitation <sub>max</sub>
CCR7	Charakterisierung von Effektor-T-Zellen	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex-Cyanin-5.5	clone G043H7, Biolegend	690nm (BioLegend Inc., 2021)	482nm (BioLegend Inc., 2021)
CD45RA	Charakterisierung von Memory-T-Zellen	Fluorezeinisothiocyanat	clone HI100, Biolegend	520nm (BioLegend Inc., 2021)	494nm (BioLegend Inc., 2021)
CD3	T-Zellen	Alexa Fluor® 700	clone OKT3, Biolegend	719nm (BioLegend Inc., 2021)	696nm (BioLegend Inc., 2021)
CD4	T-Helferzellen	BD Horizon BV605™	clone RPA-T4, BD Biosciences	605nm (BD Biosciences, 2014)	407nm (BD Biosciences, 2014)
CD8	Zytotoxische T-Zellen	Pacific Blue™	clone SK1, Biolegend	455nm (BioLegend Inc., 2021)	401nm (BioLegend Inc., 2021)
CD56	Natürliche Killerzellen	Allophycocyanin-Cyanin-7	clone HCD56, Biolegend	785nm (BioLegend Inc., 2021)	650nm (BioLegend Inc., 2021)

CD19	B-Zellen	Phycoerythrin-Cyanin-7	clone HIB19, Biolegend	785nm (BioLegend Inc., 2021)	565nm (BioLegend Inc., 2021)
CD26	CD26-Expression	Allophycocyanin	clone BA5b, Biolegend	660nm (BioLegend Inc., 2021)	650nm (BioLegend Inc., 2021)

## 2.7 Statistik

In Vorbereitung wurde die Patient\*innendatenbank der ME/CFS-Ambulanz an der Klinik für medizinische Immunologie um Ergebnisse der Symptomfragebögen und Schellong-Tests sowie der Laboruntersuchungen ergänzt. Zur Datenanalyse und zum Erstellen der Abbildungen wurden die Programme IBM® SPSS® Statistics 22.0, GraphPad Prism 6.0 und R 4.0 verwendet. Ergebnisse basierend auf normalverteilten Populationen wurden als Mittelwert mit Standardabweichung, solche basierend auf nicht-normalverteilten Populationen als Median mit Interquartilsabstand (englisch: interquartile range (IQR)) und Anteilsangaben als absolute Anzahl und relativer prozentualer Anteil angegeben. Vergleichs- und Korrelationsanalysen wurden unter Annahme nicht-normalverteilter Parameter mithilfe nicht-parametrischer Methoden durchgeführt.

Kategorische Parameter wurden mithilfe des Pearson's Chi<sup>2</sup>-Tests zwischen verschiedenen Gruppen verglichen. Zum Vergleich quantitativer Messgrößen zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Rangsummentest verwendet. Um quantitative Parameter zwischen mehr als zwei Gruppen zu vergleichen, wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließender post-hoc Analyse nach Dunn angewendet. Korrelationsanalysen wurden anhand des Spearman-Koeffizienten bewertet. Diese Verfahren sind nicht auf eine Normalverteilung der Messwerte angewiesen. Anstelle der absoluten Messwerte werden für die Berechnung Ränge verwendet. Die Messwerte werden ihrer Größe nach geordnet und mit einem Rang versehen. Dadurch ist nicht mehr die Differenz der Messpunkte entscheidend, sondern ihre Ausprägung in Relation zu den anderen Messpunkten. Extremwerte beeinflussen die Statistik weniger, da sie lediglich als höherer oder niedrigerer Rang erscheinen.

Für alle angewandten statistischen Testverfahren wurde ein p-Wert von <0,05 als signifikant angesehen. Der p-Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, einen sogenannten alpha-Fehler zu begehen, also die wahre Nullhypothese fälschlicherweise zugunsten der

Alternativhypothese abzulehnen. Werden im Rahmen einer Studie viele Tests durchgeführt, so wächst die Wahrscheinlichkeit, dass ein alpha-Fehler auftritt und ein scheinbar signifikantes Ergebnis nur zufällig entsteht (Neyman and Pearson, 1928). Um diesem Problem bei den Korrelationsanalysen zu begegnen, wurde die Falscherkennungsrate, also der Anteil fälschlicherweise zurückgewiesener Nullhypothesen an allen zurückgewiesenen Nullhypothesen, listenweise auf maximal 5% begrenzt. In der ersten vorgestellten Studie von Szklarski et al. wurde dies unter der Annahme positiver und negativer Abhängigkeiten einiger beteiligter Parameter nach dem Ansatz von Benjamini und Yekutieli (BY) durchgeführt (Benjamini and Yekutieli, 2001). In der zweiten vorgestellten Studie von Freitag et al. wurde davon ausgegangen, dass allenfalls positive Abhängigkeiten zwischen Symptomen bestehen, sodass die Methode nach Benjamini und Hochberg (BH) genutzt wurde (Benjamini and Hochberg, 1995). Die Korrektur für multiples Testen wird zuletzt zunehmend kritischer betrachtet, da sie gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit erhöht, korrekt signifikante Ergebnisse zu verwerfen (Althouse, 2016). In den hier vorgestellten Studien wurden daher sowohl korrigierte als auch unkorrigierte Ergebnisse präsentiert.

Zur Veranschaulichung signifikanter Korrelationen mit sCD26 und ihrer Interkorrelationen wurden Netzwerkgraphen auf Basis des Fruchterman-Reingold-Algorithmus mithilfe des „igraph“-Paketes in R erstellt (Csardi, 2006).

Mit den Parametern, welche nach BY-Korrektur weiterhin signifikant mit sCD26 korrelierten, wurde eine multiple Regression durchgeführt, um deren Einfluss auf sCD26 zu quantifizieren. Da für ein Regressionsmodell eine Normalverteilung der Residuen erforderlich ist, wurden die eingeschlossenen Parameter logarithmisch transformiert. Zur Erfolgskontrolle erfolgte eine graphische Darstellung der Residuen und ein sogenannter Q-Q-Plot. Um eine Hebelwirkung von Extremwerten auf das Modell zu evaluieren, wurde der Cook's-Abstand bestimmt.

Für sCD26 wurde evaluiert, inwieweit es als diagnostischer Marker für ME/CFS anwendbar ist. Dabei wurden als Störgrößen Alter und Geschlecht in die Analyse einbezogen. Methodisch erfolgte zunächst die Erstellung einer Receiver-Operating-Characteristic(ROC)-Kurve zur Unterscheidung von ME/CFS-Patient\*innen und Kontrollen auf Basis von Alter und Geschlecht. ROC-Kurven stellen für jeden Messpunkt der zur Unterscheidung zweier Gruppen verwendeten Größe Sensitivität und 1-Spezifität dar. Sind die Messpunkte zwischen den verglichenen Gruppen identisch, entspricht die Kurve einer Winkelhalbierenden. Je stärker die Unterschiede zwischen den Messpunkten



beider Gruppen, desto mehr entfernt sich die Kurve von der Winkelhalbierenden und nähert sich der linken oberen Ecke an. Dieser Zusammenhang zeigt sich auch in einer zunehmenden Fläche unter der ROC-Kurve, auch area under the curve (AUC), mit zunehmender Diskriminierung zwischen den Gruppen. Um herauszufinden, welchen zusätzlichen Beitrag sCD26 zur Diskriminierung zwischen Patient\*innen und Kontrollen leistet, wurde nun eine zweite ROC-Kurve auf Basis von Alter, Geschlecht und sCD26 erstellt. Die AUC-Werte beider ROC-Kurven wurden schließlich gegenübergestellt.

### 3 Kernergebnisse

Nachfolgend werden die Kernergebnisse der im Rahmen dieses Promotionsvorhabens entstandenen Studien präsentiert. Für eine detaillierte Darstellung sei auf die Originalpublikationen verwiesen (Szkarski et al., 2021, Freitag et al., 2021).

3.1 “Delineating the association between soluble CD26 and autoantibodies against G-protein coupled receptors, immunological and cardiovascular parameters identifies distinct patterns in post-infectious vs. non-infection-triggered Myalgic Encephalomyelitis/ Chronic fatigue syndrome” (Szkarski et al., 2021)

#### 3.1.1 Studienpopulation

Es wurden die sCD26-Serumkonzentrationen von 205 Patient\*innen und 98 Kontrollen analysiert. Das mediane Alter der ME/CFS-Kohorte betrug 43 Jahre (IQR: 33-51). Der weibliche Anteil lag bei 71%. In 72% wurde ein infektionsassoziierter Erkrankungsbeginn angegeben, wobei zwei Patient\*innen keine Angaben machten. Das Alter der Kontrollkohorte lag im Median bei 29 Jahren (IQR: 26-38). Die Kontrollen waren zu 50% weiblich (Szkarski et al., 2021).

#### 3.1.2 Kernaussage 1

*sCD26 ist als diagnostischer Marker für ME/CFS ungeeignet.*

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den medianen sCD26-Konzentrationen von Patient\*innen und Kontrollen. Lediglich weibliche Patient\*innen wiesen signifikant niedrigere Serumkonzentration von sCD26 auf als weibliche Kontrollen. Bei Stratifizierung nach Altersgruppen blieben Unterschiede aus. Nach Trennung der Patient\*innenkohorte bezüglich des Erkrankungsbeginns zeigten sich signifikant höhere sCD26-Konzentrationen bei männlichen Patienten mit infektionsassoziertem Beginn. Unter Berücksichtigung des Missverhältnisses von Alter und Geschlechtsanteilen zwischen Patient\*innen und Kontrollen wurden schrittweise zwei ROC-Analysen durchgeführt. Die AUC der ROC-Analyse basierend auf Alter und Geschlecht verbesserte sich nicht signifikant durch Hinzufügen von sCD26 als Unterscheidungskriterium. Dies galt ebenso für in der weiblichen Kohorte durchgeführte ROC-Analysen basierend auf dem Alter beziehungsweise dem Alter und sCD26 als Unterscheidungskriterien (Szkarski et al., 2021)

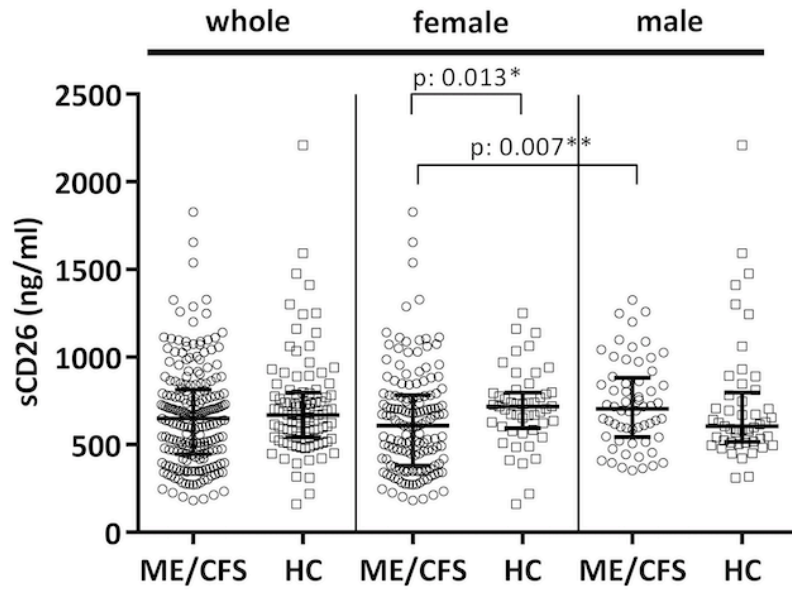


Abbildung 1: sCD26-Konzentration bei ME/CFS-Patient\*innen und Kontrollen stratifiziert nach Geschlecht. Die sCD26-Konzentrationen der einzelnen Patient\*innen und Kontrollen sind als Dot-Plot dargestellt. Die Querlinien in den Dot-Plots stellen Median, unteres und oberes Quartil dar. Weibliche Patientinnen wiesen geringere sCD26-Konzentrationen auf als männliche Patienten und weibliche Kontrollen. (Abbildung 1A aus (Szkłarski et al., 2021))

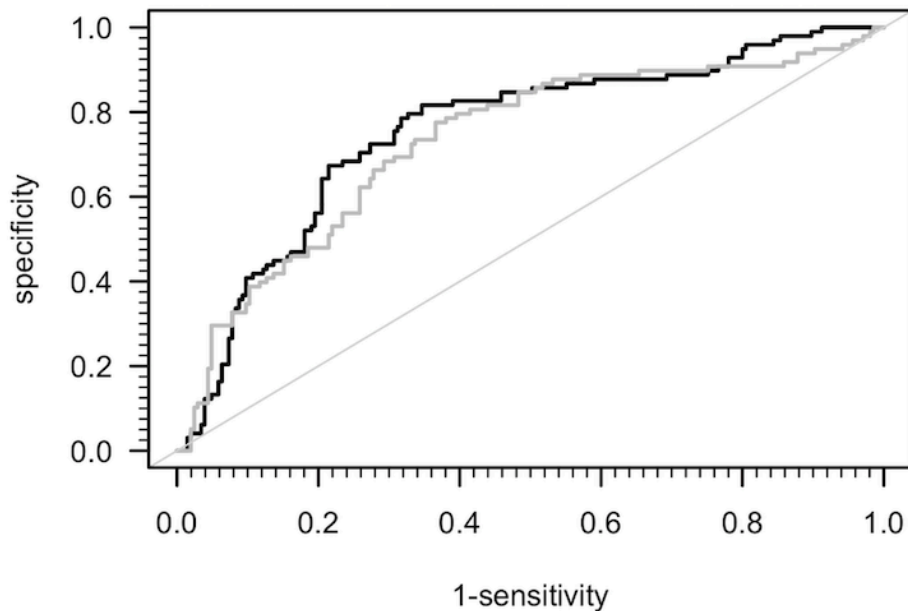


Abbildung 2: ROC-Kurven für die Unterscheidung von ME/CFS-Patient\*innen und Kontrollen anhand von Alter und Geschlecht (graue ROC-Kurve) sowie Alter, Geschlecht und sCD26-Konzentration (schwarze ROC-Kurve). Die sCD26-Konzentration verbesserte die Unterscheidungsfähigkeit des Modells nicht signifikant. (Abbildung 2A aus (Szkłarski et al., 2021))

### 3.1.3 Kernaussage 2

*ME/CFS-Patient\*innen weisen eine vermehrte Anzahl CD26-exprimierender CD4+ T-Zellen auf.*

Die Messung der CD26-Expression auf Immunzellen erfolgte bei 12 ME/CFS Patient\*innen und 12 Kontrollen. Das mediane Alter der Patient\*innen betrug 53 Jahre (IQR: 33-57), das der Kontrollen 34 Jahre (IQR: 29-42). Alle untersuchten Patient\*innen und Kontrollen waren weiblich. Die Anzahl CD26-exprimierender CD4+ T-Zellen bei den Patient\*innen war signifikant höher als bei den Kontrollen, ohne dass jedoch die Expression pro Zelle verändert war (Szklański et al., 2021).

### 3.1.4 Kernaussage 3

*Korrelationsmuster mit sCD26 deuten auf pathomechanistische Unterschiede zwischen Patient\*innen mit und ohne infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn hin.*

Es erfolgte eine umfassende Korrelationsanalyse der sCD26-Konzentrationen mit Ergebnissen der Symptomevaluation und des Schellong-Tests, der laborchemischen Diagnostik sowie AAK gegen alpha- und beta-AdR, muskarinische AChR, AT1-R sowie ETA-R und ETB-R. Bei Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn fanden sich auch nach BY-Korrektur signifikante Korrelationen zwischen sCD26 und dem Anteil HLA-DR-exprimierender CD8+ T-Zellen, LDH, CK, GGT und den Transaminasen ALAT und ASAT sowie inverse Korrelationen mit IL-1b und AAK gegen alpha1-AdR und M3-AChR. Bei Patient\*innen, deren Erkrankungsbeginn nicht infektionsassoziiert war, korrelierte sCD26 invers mit der Herzfrequenz unmittelbar und 5 Minuten nach dem Positionswechsel im Rahmen der Schellong-Untersuchung. Darüber hinaus zeigten sich in dieser Gruppe keine der Korrelationen, welche bei Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn gefunden wurden, und die Korrelationskoeffizienten deuteten nicht selten in die entgegengesetzte Richtung. Weitere Korrelationen fanden sich lediglich vor BY-Korrektur. Für die Gruppe der Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn erfolgte eine multiple Regressionsanalyse mit den signifikant korrelierenden Parametern, um deren Zusammenhang mit sCD26 besser einzuschätzen. Geschlecht und Alter wurden dabei als mögliche Störfaktoren eingeschlossen. Das Ergebnis war ein signifikantes Modell mit einem adjustierten  $R^2$  von 0,325, welches durch bidirektionale stufenweise Regression weiter auf 0,344 verbessert werden konnte (Szklański et al., 2021).

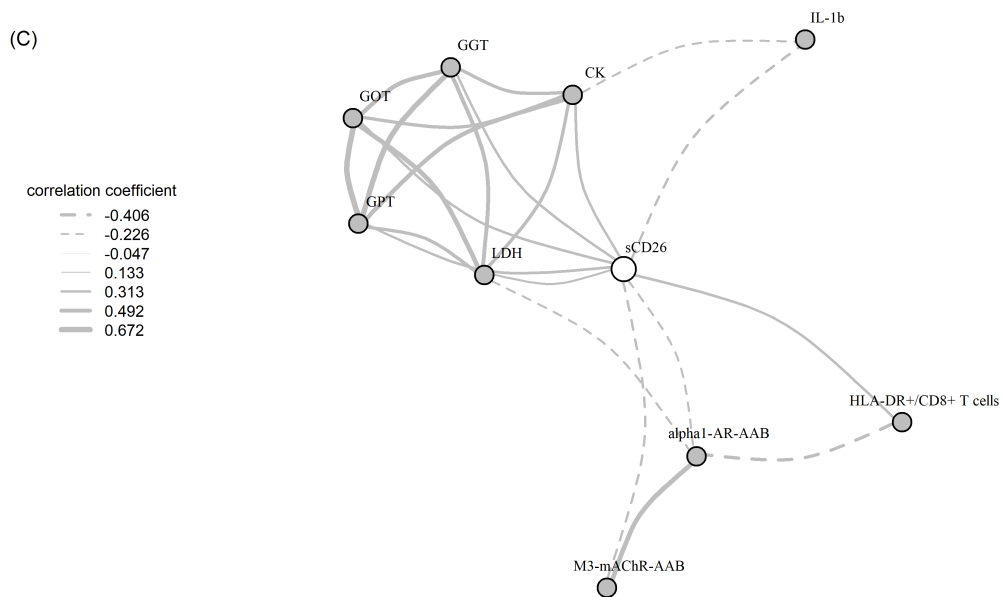
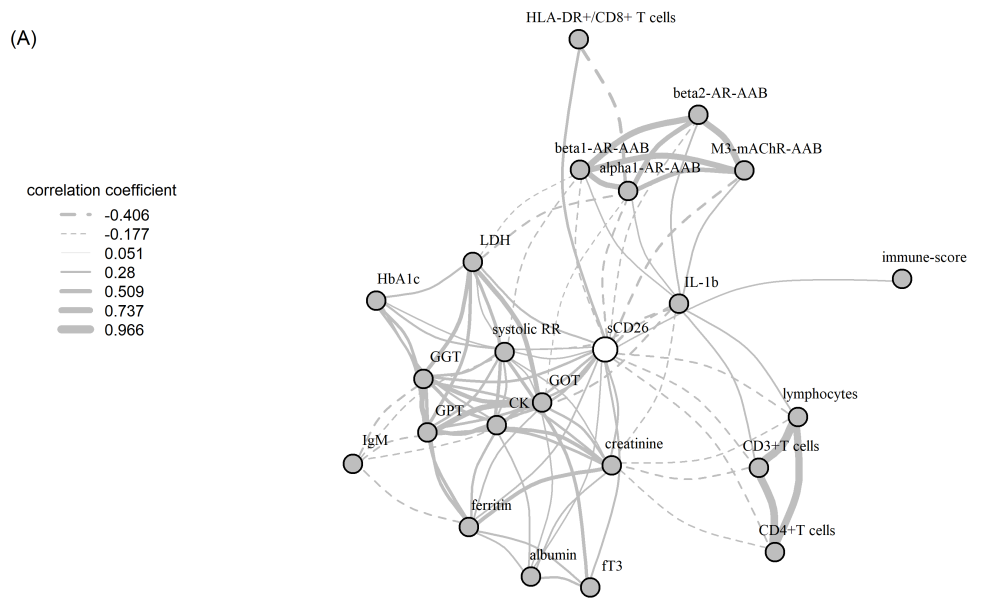


Abbildung 3: Korrelationsnetzwerke zwischen sCD26 und klinischen sowie paraklinischen Parametern. Dargestellt sind Korrelationen bei ME/CFS-Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn vor BY-Korrektur (A), bei Patient\*innen ohne infektionsassoziierten Erkrankungsbeginn vor BY-Korrektur (B) sowie bei Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn nach BY-Korrektur (C). Jede Linie steht für eine signifikante Korrelation mit  $p < 0,05$ . Die Breite der Linien repräsentiert die Größe des Spearman-Korrelationskoeffizienten. Gestrichelte Linien stellen negative, durchgezogene Linien positive Korrelationen dar. (Abbildung 3 aus (Szkłarski et al., 2021))

## 3.2 “Autoantibodies to vasoregulative G-protein coupled receptors correlate with symptom severity, autonomic dysfunction and disability in Myalgic Encephalomyelitis / Chronic Fatigue Syndrome” (Freitag et al., 2021)

### 3.2.1 Studienpopulation

Es wurden die Serumkonzentration von AAK gegen alpha1/2- und beta1/2/3-AdR, M3- und M4-mAChR, AT1-R, ETA-R und ETB-R, sowie PAR1 und PAR2 in einer Kohorte von 116 ME/CFS-Patient\*innen bestimmt. Das mediane Alter lag bei 43 Jahren (IQR: 31-50) und die mediane Dauer der Erkrankung vor dem Zeitpunkt der Analyse bei 4 Jahren (IQR: 2-9). 72% der Patient\*innen waren weiblich. In 74% wurde ein infektionsassoziiertes Erkrankungsbeginn berichtet. Patient\*innen mit einem solchen Erkrankungsbeginn waren im Median 10 Jahre jünger und gaben eine kürzere Dauer der Erkrankung an. Darüber hinaus gab es keine signifikanten Gruppenunterschiede bezüglich der Ergebnisse in den Symptomfragebögen und der AAK-Konzentrationen (Freitag et al., 2021).

### 3.2.2 Kernaussage 1

*AAK/IgG-Quotient dient dem Ausschalten von Störfaktoren.*

Die Konzentrationen der meisten hier analysierten AAK korrelierten mit IgG und alle AAK zeigten eine Korrelation mit mindestens einer IgG-Subgruppe, insbesondere IgG1 und IgG3. Dies deckt sich mit Ergebnissen früherer Analysen und könnte Ausdruck der Zugehörigkeit GPCR-gerichteter AAK zu einem natürlichen Netzwerk von AAK sein (Loebel et al., 2016, Cabral-Marques et al., 2018). Darüber hinaus fanden sich inverse Korrelationen zwischen dem Alter der Patient\*innen und einigen AAK und IgG. Um mögliche Einflüsse des Alters und des Gesamt-IgG auf die AAK-Konzentrationen auszuschalten, berechneten wir Quotienten aus AAK und IgG und nutzen diese in der weiteren Analyse (Freitag et al., 2021).

### 3.2.3 Kernaussage 2

*AAK gegen GPCR korrelieren mit spezifischen klinischen Symptomen in ME/CFS abhängig von der Art des Erkrankungsbeginns.*

Es zeigten sich zahlreiche Korrelationen zwischen den Konzentrationen verschiedener AAK und der Schwere der Symptomatik. Durch Ausschalten des störenden Einflusses des Alters unter Verwendung von AAK/IgG-Quotienten konnten deutlich bessere Ergebnisse mit höheren Korrelationsquotienten erreicht werden.

So korrelierte die Schwere der Fatigue bei Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn mit allen analysierten IgG-Quotienten von AAK gegen alpha- und beta-AdR, mAChR, ETA- und ETB-R, sowie AT1-R. Bis auf beta3-AdR-AAK/IgG korrelierten die genannten AAK/IgG-Quotienten zudem mit der Schwere der Muskelschmerzen. Ebenso korrelierte der auf die körperliche Leistungsfähigkeit bezogene Teil des SF-36 invers mit IgG-Quotienten der AAK gegen alpha2-AdR, beta1/2-AdR und M4-AChR. Die Bell Disability Scale korrelierte invers mit ETA-R-, AT1-R- und alpha1/2-R-AAK/IgG-Quotienten. In beiden zuvor genannten Fragebögen steht ein niedriger Score für schwerere Symptome. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Schwere kognitiver Einschränkungen, welche mit IgG-Quotienten von AAK gegen ETA-R und AT1-R korrelierten. Weiterhin fanden sich Korrelationen mit verschiedenen Teilbereichen des COMPASS-31-Scores zur Erhebung autonomer Dysfunktion. Die Schwere gastrointestinaler Symptome korrelierte mit IgG-Quotienten der AAK gegen alpha1- und 2-AdR, Störungen der Pupillomotorik zeigten Korrelationen mit alpha1-AdR-, beta2/3-AdR-, und M4-AChR-AAK/IgG-Quotienten.

Keine der genannten Korrelationen fand sich in der Gruppe der Patient\*innen ohne infektionsassoziierten Erkrankungsbeginn. Bei diesen Patient\*innen zeigte sich eine inverse Korrelation der Bell Disability Scale mit dem ETB-R-AAK/IgG-Quotienten. Außerdem korrelierten Störungen der Orthostase mit alpha1/2- und beta1/2/3-AdR-AAK/IgG-Quotienten. Für Störungen der Sekretomotorik fand sich eine inverse Korrelation mit dem PAR2-AAK/IgG-Quotienten.

Die genannten Korrelationen traten exklusiv in der jeweiligen Gruppe auf. Für die Korrelationen zwischen dem AT1-R-AAK/IgG-Quotienten und kognitiver Symptomatik sowie AT1-R- und ETA-R-AAK/IgG-Quotienten und der Bell Disability Scale zeigten sich in der Patient\*innengruppe ohne infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn ähnliche Korrelationskoeffizienten wie in der Gruppe mit einem solchen. Hier kann die fehlende

Signifikanz der geringeren Teilnehmerzahl in dieser Gruppe geschuldet sein. In anderen Fällen, beispielsweise im Falle des SF-36-Scores, zeigten sich gegensätzliche Korrelationskoeffizienten. Für IgG-Quotienten der AAK gegen alpha1/2-AdR, M4-AChR und ETA-R fanden sich Korrelationen mit der Länge der Krankengeschichte zum Zeitpunkt der Analyse. Da diese von Patient\*innen ohne infektionsassoziierten Erkrankungsbeginn länger angegeben wurde, kann es einen Einfluss auf die Korrelation zwischen alpha1/2-AdR-AAK/IgG-Quotienten und orthostatischen Symptomen geben. Starke Korrelationen in der Gruppe der Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn blieben auch nach BH-Korrektur bestehen (Freitag et al., 2021).



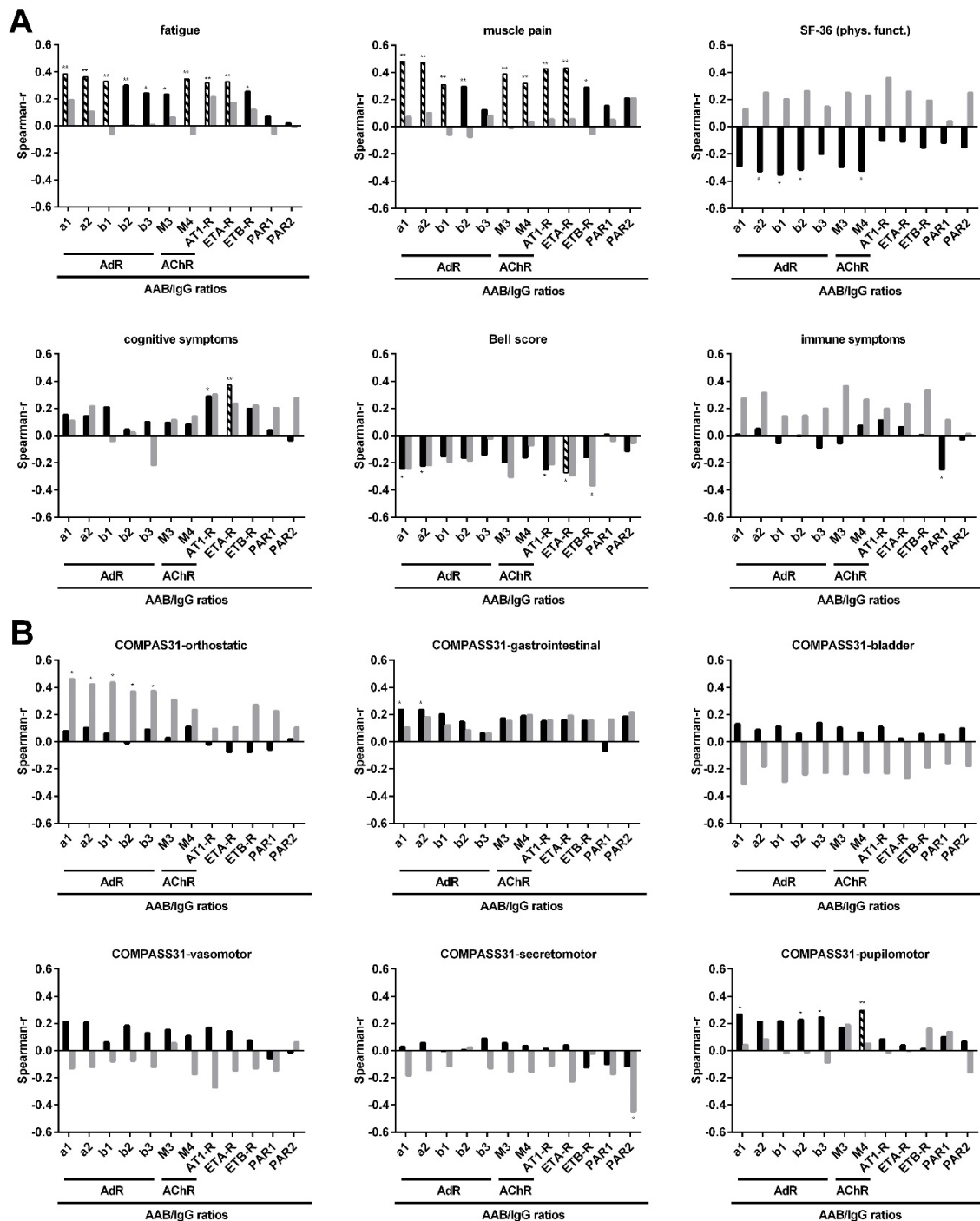


Abbildung 4: Korrelationen zwischen AAB/IgG-Quotienten und Symptomen bei Patient\*innen mit ME/CFS. Die Spearman-Korrelationskoeffizienten bei Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn sind als schwarze Balken dargestellt, die bei Patient\*innen ohne infektionsassoziierten Erkrankungsbeginn als graue Balken. Signifikante Korrelationen vor BH-Korrektur sind mit einem Asterisk gekennzeichnet. Gestreifte Balken zeigen Korrelationen, welche auch nach BH-Korrektur signifikant blieben. Abhängig von der Art des Erkrankungsbeginns fanden sich Korrelationen mit den Kernsymptomen Fatigue, Muskelschmerz, kognitiven und immunologischen Beschwerden, sowie der Bell Disability Scale und einem Teilaspekt des SF-36 (A). Weiterhin korrelieren AAK/IgG-Quotienten mit verschiedenen Subkategorien des COMPASS-31 (B). (Abbildung 1 aus (Freitag et al., 2021))

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieses Promotionsvorhabens war es, die pathophysiologische Bedeutung von sCD26 und AAK gegen GPCR anhand von Korrelationen mit klinischen und laborchemischen Parametern bei ME/CFS näher zu charakterisieren. Unter der Annahme unterschiedlicher pathophysiologischer Mechanismen wurde der Fokus auf die Abgrenzung von Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn gegenüber solchen mit anderweitigen Auslösern gelegt. Des Weiteren sollte sCD26 auf seine diagnostische Relevanz hin evaluiert werden.

sCD26 konnte in dieser Arbeit nicht als diagnostischer Parameter für ME/CFS bestätigt werden. Es zeigten sich jedoch Korrelationen mit verschiedenen klinischen Parametern und Laborwerten sowie deutliche Unterschiede zwischen Patient\*innen mit postinfektiösem und nicht-infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn. Bei Patient\*innen mit nicht-infektionsassoziiertem ME/CFS korrelierte sCD26 invers mit der Herzfrequenz im Rahmen des Schellong-Tests. Patient\*innen innerhalb dieser Gruppe, welche ein komorbides POTS aufwiesen, zeigten zudem geringere sCD26-Serumkonzentrationen. In der Gruppe mit infektionsassoziiertem ME/CFS korrelierte sCD26 mit dem Anteil HLA-DR-exprimierender CD8+ T-Zellen, LDH, CK, GGT und den Transaminasen ALAT und ASAT. Es fanden sich inverse Korrelationen mit IL-1b und AAK gegen alpha1-AdR und M3-AChR (Szkarski et al., 2021). In dieser Gruppe konnten in unserer zweiten Studie auch Korrelationen zwischen zahlreichen GPCR-AAK und der Schwere von Fatigue, Muskelschmerzen und kognitiven Symptomen sowie stärkerer alltagsrelevanter Funktionseinschränkung gezeigt werden. Keine dieser Korrelationen fand sich bei Patient\*innen ohne infektionsassoziierten Erkrankungsbeginn. Hier korrelierten AAK gegen alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren mit der Schwere orthostatischer Symptome (Freitag et al., 2021).

### 4.2 Interpretation der Ergebnisse und Einbettung in den bisherigen

#### Forschungsstand

In der Zusammenschau ergänzen sich viele Ergebnisse der hier vorgestellten Studien und deuten auf Unterschiede in den Pathomechanismen der untersuchten Subgruppen hin, in deren Zentrum AAK gegen GPCR stehen.

Dabei lassen sich die meisten der Korrelationen im Hinblick auf die enzymatischen bzw. rezeptorvermittelten Funktionen der untersuchten Biomarker erklären. sCD26 ist enzymatisch am Abbau des natriuretisch und vasodilatorisch wirksamen Bradykinins beteiligt (Fryer et al., 2008, Mamenko et al., 2015). Es setzt das aktive BNP (1-32) in seine weniger aktive Form BNP (3-32) um (Vanderheyden et al., 2009). Unter DPP4-Inhibition konnte eine Blutdrucksenkung mit vermehrter endothelialer Stickstofffreisetzung beobachtet werden (Mason et al., 2012). Unter der Annahme vermehrter Vasodilatation und verstärkter Natriuresis mit potenzieller Hypovolämie infolge niedriger sCD26-Serumspiegel wäre eine Tachykardie als physiologische Kompensation einer orthostatischen Belastung zu betrachten. Eine zugrundeliegende orthostatische Intoleranz könnte verstärkt werden und ein POTS erst zu voller Ausprägung kommen. Dies würde die inverse Korrelation zwischen sCD26 und der Herzfrequenz bei Patient\*innen mit nicht-infektionsassoziiertem ME/CFS erklären.

AAK gegen GPCR können ihre Zielrezeptoren in unterschiedlicher Weise beeinflussen und so zur physiologischen Homöostase beitragen (Riemekasten et al., 2020). Die Korrelation orthostatischer Belastungssymptome mit erhöhten Spiegeln alpha- und beta-AdR-AAK in dieser Gruppe könnte somit als homöostatische Anpassung an die orthostatische Intoleranz im Rahmen des ME/CFS verstanden werden. Andererseits wären orthostatische Symptome aufgrund pathologisch erhöhter Konzentrationen solcher regulierender AAK gegen AdR und nachfolgend gestörter Blutdruckregulation denkbar.

In beiden vorgestellten Studien zeigten sich bei Patient\*innen mit infektionsassoziiertem ME/CFS grundlegend andere Korrelationsmuster. Viele der Korrelationen zwischen sCD26 und paraklinischen Parametern in dieser Kohorte lassen sich auf die Funktionen von sCD26 und dessen Ursprungsgewebe zurückführen und decken sich mit den Effekten von DPP4-Inhibitoren. So wird CD26 auf Zellen des hepatobiliären Systems und Muskelzellen exprimiert und sCD26 gelangt von diesen in die Zirkulation (Ghorpade et al., 2018, McCaughan et al., 1990, Raschke et al., 2013). Auch die Korrelation mit dem Anteil HLA-DR-exprimierender CD8+ T-Zellen als T-Zellaktivierungsmarker bestätigt deren entscheidenden Beitrag zur sCD26-Serumkonzentration (Casrouge et al., 2018). Auffällig waren die inversen Korrelationen zwischen sCD26 und AAK gegen alpha1-AdR und M3-AChR. Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von alpha1-AdR auf T-Zellen deren Proliferation hemmt (Grisanti et al., 2011). M3-AChR auf T-Zellen wurden mit co-stimulatorischen Effekten in Verbindung gebracht (Fujii and Kawashima, 2000). Die direkte Wirkung der AAK auf die T-Zellaktivierung bei ME/CFS ist derzeit unklar.

Dennoch liefern die Ergebnisse erste Hinweise auf weitere Auswirkungen GPCR-gerichteter AAK bei ME/CFS über die Vasotonus-regulierende Rezeptorfunktion hinaus. Viele der untersuchten GPCR-AAK korrelierten in der Gruppe mit postinfektiösem ME/CFS mit den Kernsymptomen der Erkrankung wie Fatigue, Muskelschmerzen und kognitiver Leistungseinschränkung. Anders als die Symptome einer gestörten Blutdruckregulation erscheinen diese als Folge einer unmittelbaren Wirkung an den Zielrezeptoren zunächst weniger offensichtlich. Unterschiedliche Symptomkorrelationen bei vergleichbaren Serumkonzentrationen der GPCR-AAK in beiden Gruppen deuten darauf hin, dass eine veränderte Funktion der AAK oder ihrer Zielrezeptoren vorliegen könnte. Die möglichen Mechanismen sollen im Folgenden diskutiert werden.

#### 4.2.1 Hinweise auf Autoimmunität bei infektionsassoziiertem ME/CFS

Immunologische Unterschiede zwischen den hier untersuchten Subgruppen wurden auch in anderen Studien beschrieben. Porter et al. haben T-Zellpopulationen bei Patient\*innen mit viral und nicht viral bedingtem ME/CFS verglichen. Neben einem höheren Anteil an CD2+CD26+ T-Zellen bei ME/CFS viraler Genese wurden im Vergleich zur nicht viralen Gruppe mehr naive T<sub>H2</sub>-Zellen gefunden. Die Autor\*innen diskutierten diesen Unterschied als Nachteil im Hinblick auf Autoreaktivität (Porter et al., 2010). Zudem wurden bei Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn Genvarianten nachgewiesen, welche mit einem erhöhten Risiko für Autoimmunität einhergehen (Steiner et al., 2020). Wie eingangs erwähnt, wird Autoimmunität oft durch Infektionskrankheiten begünstigt. In unseren beiden Studien berichteten signifikant mehr Patient\*innen mit infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn eine Häufung von Atemwegsinfekten, definiert als über sechs pro Jahr, als Patient\*innen ohne infektionsassoziierten Erkrankungsbeginn. In der ersten vorgestellten Studie waren dies 66% in der infektionsassoziierten Gruppe gegenüber 30% in der Gruppe ohne infektionsassoziierten Erkrankungsbeginn ( $p < 0,001$ ) (siehe Supplements zu (Szkarski et al., 2021)). In der zweiten Studie waren es 63,5% gegenüber 30% ( $p: 0,002$ ) (nachträglich berechnet auf Basis der Daten von (Freitag et al., 2021)). Die Annahme liegt nahe, dass gehäufte Infekte aufgrund einer Immundysfunktion oder Stress gemeinsam mit einer Prädisposition für Autoimmunität zur Entstehung oder veränderten Funktion von AAK führen können (Faulkner and Smith, 2008, Blomberg et al., 2018).

In früheren Studien zeigten Patient\*innen mit postinfektiösem ME/CFS stärkere grippeartige Symptome, Arthralgien und Symptome autonomer Dysfunktion, darunter

gastrointestinale Symptome (Buchwald et al., 1996, Naess et al., 2010). Umgekehrt wurden Myalgie und grippeartige Symptome zum Zeitpunkt der Diagnose, aber auch eine raschere Entwicklung der Fatigue mit einem infektionsassoziierten Erkrankungsbeginn assoziiert (Naess et al., 2010). Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung GPCR-gerichteter AAK an diesen divergenten klinischen Manifestationen hin.

#### 4.2.2 Mögliche Mechanismen GPCR-gerichteter Autoimmunität

AAK gegen GPCR wurden kürzlich als Teil eines physiologischen Netzwerkes beschrieben, dessen Dysregulation mit der Entstehung von Erkrankungen in Verbindung steht (Cabral-Marques et al., 2018). Es konnte gezeigt werden, dass IgG von ME/CFS-Patient\*innen mit hohen beta2-AdR-AAK-Konzentrationen eine geringere beta2-AdR-Stimulation auslöst als IgG von Kontrollen und Patient\*innen mit normwertigen AAK-Konzentrationen (Hartwig et al., 2020). Sowohl ein verändertes Verhältnis GPCR-gerichteter AAK untereinander als auch eine Funktionsänderung der AAK könnte zu veränderter Rezeptoraktivierung führen.

Zusätzlich könnten Veränderungen auf Seiten der Rezeptoren selbst eine veränderte Wirkung der AAB unterstützen. Bei Patient\*innen mit ME/CFS wurden Hinweise auf einen gesteigerten Sympathikotonus mit erhöhten Noradrenalin-Serumkonzentrationen und eingeschränkter Blutdruckregulation gefunden (Wyller et al., 2008, Frith et al., 2012). Im Kontext der chronischen Herzinsuffizienz wurde die Wirkung anhaltender Stimulation auf beta-AdR bereits ausführlich beschrieben. Kurzfristig kommt es zur Entkopplung, während die Rezeptoren bei anhaltender Stimulation internalisiert und vermindert exprimiert werden (Wallukat, 2002). Stress als Ursache vermehrter adrenerger Stimulation ist sowohl im Rahmen einer Infektion als auch anderer möglicher Auslöser eines ME/CFS, beispielsweise einer Operation, vorstellbar. Kürzlich wurde jedoch auch gezeigt, dass Rhinoviren direkt zu einer Desensibilisierung pulmonaler beta2-AdR bei Asthma-Patient\*innen führen können (Trian et al., 2010). Mechanistisch wurde Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren durch Rhinovirus-RNA mit nachfolgender Prostaglandinproduktion verantwortlich gemacht (Van Ly et al., 2013). Es bleibt offen, ob diese Desensibilisierung langanhaltend und somit relevant für den Pathomechanismus des postviralen ME/CFS ist.

#### 4.2.3 Endotheliale Dysfunktion als mögliche Konsequenz GPCR-gerichteter Autoimmunität

Im Zusammenhang mit den oben genannten Befunden gestörter Vasoregulation bei ME/CFS spielt auch die endotheliale Dysfunktion eine wichtige Rolle. Diese beschreibt einen Zustand herabgesetzter Empfindlichkeit gegenüber vasodilatatorischen Reizen und stellt einen bedeutsamen kardiovaskulären Risikofaktor dar (Vanhoutte et al., 2017). Newton et al. wiesen erstmals eine Störung der makro- und mikrovaskulären endothelialen Funktion bei ME/CFS-Patient\*innen nach (Newton et al., 2012). Auch wir konnten in einer früheren Studie zeigen, dass bei einem Teil der ME/CFS-Patient\*innen eine periphere endotheliale Dysfunktion vorliegt, welche mit schwererer Symptomatik einhergeht. Einige der Studienpatient\*innen erhielten zudem bei erhöhten Konzentrationen von AAK gegen beta2-AdR eine Immunadsorptionstherapie. Bei fünf von sechs dieser Patient\*innen mit initialer endothelialer Dysfunktion zeigte sich nach 12 Monaten eine normale Endothelfunktion (Scherbakov et al., 2020). Wie zuvor beschrieben, konnten wir eine eingeschränkte beta2-AdR-Stimulation durch IgG von ME/CFS-Patient\*innen mit erhöhten beta2-AAK-Spiegeln nachweisen (Hartwig et al., 2020). Es ist denkbar, dass dies zu einem Überwiegen vasokonstriktorischer Effekte und somit endothelialer Dysfunktion beiträgt. Im Tierexperiment konnte zudem eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion durch AAK gegen beta1-AdR gezeigt werden. Immunisierte Ratten zeigten eine deutliche Einschränkung der beta1-AdR-spezifischen Vasorelaxation gegenüber Kontrollen, welche einer verminderten Stimulation der „Endothelial Nitric Oxide Synthase“ (eNOS) zugeschrieben wurde (Abdelkrim et al., 2014). Da bei der Immunadsorption IgG-AAK entfernt werden, ist die Normalisierung der Endothelfunktion infolge der Therapie ein weiterer Hinweis dafür, dass beta-AAK eine Rolle bei der endothelialen Dysfunktion spielen.

Sowohl das Fehlen vasodilatatorischer Effekte durch dysfunktionale AAK als auch die eingeschränkte Wirkung natürlicher Liganden aufgrund solcher sind relevant im Hinblick auf Belastungsreaktionen. Bereits geringe Belastungszustände lösen in der Skelettmuskulatur einen als funktionelle Sympathikolyse bezeichneten Zustand aus. Ein Zusammenspiel aus nervalen Einflüssen und lokalen Mediatoren wirkt der alpha1-adrenerg vermittelten Vasokonstriktion entgegen und stellt so eine adäquate Muskelperfusion sicher. Zum einen führt die sympathische Stimulation selbst zu beta-adrenerg vermittelter Vasodilatation in der Mikrozirkulation, zum anderen lösen lokal freigesetzte Substanzen wie ATP, Bradykinin und Histamin eine Hyperämie aus (Lundvall

and Jarhult, 1976, Thomas, 2015). Ein Schnittpunkt in der gemeinsamen Endstrecke beider Signalwege ist die endotheliale Freisetzung des potenten Vasodilatators Stickstoff durch Stimulation der eNOS (Jayachandran et al., 2001, Hellsten et al., 2012). Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass Endothelzellen humaner Umbilicalvenen nach Kontakt mit Plasma von ME/CFS-Patient\*innen eine geringere Stickstoffproduktion aufwiesen als solche, welche mit Plasma gesunder Spender\*innen behandelt wurden. Die Stickstoffproduktion war sowohl basal als auch in Anwesenheit der eNOS-Aktivatoren Histamin, Bradykinin, Acetylcholin und Insulin vermindert (Bertinat et al., 2022). Sowohl erhöhte eNOS-regulierende micro-Ribonukleinsäuren bei ME/CFS als auch eine verminderte Stimulation infolge dysregulierter AAK könnten diese Befunde erklären (Blauensteiner et al., 2021). Die in der ersten vorgestellten Studie gezeigte inverse Korrelation zwischen sCD26 und alpha1-AdR-AAK könnte in diesem Zusammenhang auch als Kompensationsversuch der verminderten eNOS-Aktivität interpretiert werden. Neben Stickstoff stellen Prostaglandine eine entscheidende Komponente der endothelialen Gefäßregulation dar. Diese werden mittels der Cyclooxygenasen produziert, welche durch ein ähnliches Spektrum lokaler Mediatoren aktiviert werden wie die eNOS. Mehrere Studien konnten zeigen, dass beide Systeme sich in der Regulation des muskulären Gefäßtonus unter Belastung überschneiden. Während die alleinige Inhibition der Cyclooxygenasen beziehungsweise eNOS keinen Einfluss auf belastungsinduzierte Hyperämie im Bein hatte, zeigte sich bei kombinierter Blockade eine deutliche Flussminderung (für eine Übersicht s. (Hellsten et al., 2012)). Vor dem Hintergrund einer beta-adrenergen Dysfunktion sowie einer gestörten eNOS-Aktivität könnte es bei ME/CFS-Patient\*innen in Belastungssituationen zu einem Versagen der funktionellen Sympathikolyse und einer muskulären Minderperfusion kommen. Dies würde die Muskelschmerzen und – schwäche im Rahmen eines ME/CFS erklären. Zusätzlich wäre eine kompensatorische Reaktion mit überschießender Freisetzung lokaler Mediatoren und einer vermehrten Produktion von Prostaglandinen denkbar. Die möglichen Folgen einer solchen Überkompensation haben Scheibenbogen und Wirth in ihrem umfassenden Hypothesenpapier zur Pathogenese von ME/CFS dargelegt. So könnten Prostaglandine und Bradykinin einer renalen RAAS-Aktivierung entgegenwirken und über vermehrte Natrium-Exkretion die Diurese steigern. Die resultierende Hypovolämie und kardiale Vorlastminderung würden gerade in Situationen sportlicher und orthostatischer Belastung eine zerebrale Minderperfusion begünstigen und kognitive Symptome erklären. Zugleich werden ein erhöhter Sympathikotonus und

direkte Effekte lokaler Mediatoren auf das zerebrale Gefäßbett und die Blut-Hirnschranke für eine gestörte Regulation der lokalen Hirndurchblutung verantwortlich gemacht. Da viele der lokalen Vasodilatoren über die Sensibilisierung von Nozizeptoren auch algetische Effekte haben, würde im Rahmen dieser Hypothese auch die belastungsinduzierte Hyperalgesie bei ME/CFS erklärt (Wirth and Scheibenbogen, 2020).

#### 4.2.4 Autoimmunität im Fokus erster Therapieansätze

In den letzten Jahren wurden verschiedene Therapieansätze für ME/CFS evaluiert, welche auf die Depletion von B-Zellen und AAK abzielten. Ausgangspunkt war ein Fallbericht einer ME/CFS-Patientin, welche infolge der zytoreduktiven Therapie eines im Verlauf aufgetretenen Hodgkin-Lymphom eine anhaltende Remission der ME/CFS-Symptomatik zeigte. Fluge et al. schrieben diese dem B-Zell-depletierenden Effekt von Methotrexat zu und initiierten eine erste Pilotstudie zur Untersuchung des mononukleären anti-CD20-Antikörpers Rituximab zur Therapie von ME/CFS. Alle drei Studienpatient\*innen zeigten wiederholte Remissionen infolge der Rituximabinfusionen (Fluge and Mella, 2009). Es folgte eine randomisiert, Placebo-kontrollierte Phase II Studie, in welcher ein signifikant häufigeres Ansprechen in der Rituximab-Gruppe gezeigt wurde, ohne dass jedoch der primäre Endpunkt einer Remission nach drei Monaten erreicht wurde (Fluge et al., 2011). In der anschließenden KTS-2-Studie konnte gezeigt werden, dass eine Kombination aus Rituximab-Induktions- und Erhaltungstherapie die Dauer der Remission bei ähnlichen initialen Ansprechraten verlängert (Fluge et al., 2015). Diese ersten Ergebnisse konnten in einer zuletzt veröffentlichten, umfangreichen Multicenter-Studie jedoch nicht repliziert werden (Fluge et al., 2019).

Ein weiteres Immunsuppressivum, dessen Anwendung bei ME/CFS untersucht wurde, ist Cyclophosphamid. Auch hier gingen erste Pilotversuche auf beobachtete Remissionen bei ME/CFS-Patient\*innen infolge einer Lymphom- und Brustkrebstherapie zurück. Rekeland et al. beobachteten ein Ansprechen bei 22 der 40 Patient\*innen, von denen 15 auch nach vier Jahren noch in Remission waren. Eine randomisiert, Placebo-kontrollierte Multicenterstudie soll folgen (Rekeland et al., 2020).

Bereits in der ersten Phase II Rituximab-Studie nahmen die Autor\*innen an, dass das verzögerte klinische Ansprechen auf die Therapie nach initial rasch beobachteter B-Zelldepletion Folge des verzögerten Abbaus krankheitsunterhaltender AAK war (Fluge et al., 2011). Daraufhin wurden bei einem Teil der Patient\*innen der KTS-2-Studie erhöhte



Spiegel an beta-AdR- und AChR-AAK gefunden. Bei den auf Rituximab ansprechenden Patient\*innen zeigte sich ein signifikanter Abfall der  $\beta$ 2-AdR- und M4-AChR-AAK (Loebel et al., 2016). Diese Ergebnisse waren ausschlaggebend für die erste Pilotstudie zur Anwendung der Immunadsorption, eines Verfahrens zur gezielten Entfernung bestimmter Blutbestandteile, hier IgG, bei ME/CFS. Es zeigte sich infolge der Therapie ein anhaltender Abfall beta1- und beta2-AdR-AAK nach 6 Monaten, sowie eine schnelle Besserung der Symptome bei sieben von zehn Patient\*innen, welche bei drei Patient\*innen über 12 Monate anhielt (Scheibenbogen et al., 2018). Fünf der Patient\*innen erhielten nach zwei Jahren eine erneute Immunadsorption mit modifiziertem Behandlungsprotokoll. Es zeigte sich ein vergleichbares Ansprechen und bei vier Patient\*innen kam es erneut zur Remission (Tolle et al., 2020).

Die Patient\*innen der ersten Immunadsorptionsstudie wurden zudem mittels arterieller Tonometrie untersucht. Bei fünf von sechs Patient\*innen, welche vor der Therapie an einer peripheren endothelialen Dysfunktion litten, zeigte sich nach 12 Monaten eine normale Endothelfunktion (Scherbakov et al., 2020). Sorland et al. evaluierten auch im Rahmen der Cyclophosphamid-Therapiestudie die makro- und mikrovaskuläre Endothelfunktion der ME/CFS-Patient\*innen und verglichen sie mit gesunden Kohorten. Es zeigte sich eine signifikante endotheliale Dysfunktion bei ME/CFS-Patient\*innen vor Therapiebeginn. Eine signifikante Korrelation der Endothelfunktion mit dem Therapieansprechen konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden. Für die mikrovaskuläre Endothelfunktion, gemessen mittels „Post-occlusive reactive hyperemia“, zeigte sich eine leichte, jedoch nicht signifikante Verbesserung bei Patient\*innen, welche auf die Therapie ansprachen (Sorland et al., 2021).

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse unterstützen diese ersten Therapieansätze, indem sie die pathophysiologische Bedeutung von GPCR-AAK stärken.

### 4.3 Stärken und Schwächen der Studien

Eine Limitation beider hier vorgestellter Studien ist, dass die Vergleichsgruppen nicht bezüglich Teilnehmerzahl, Alter und im Falle der ersten vorgestellten Arbeit Geschlechterverteilung angepasst waren. Dies wurde im Rahmen der statistischen Analyse bestmöglich berücksichtigt, ein Einfluss bleibt jedoch weiterhin bestehen.

Um die Konzentrationen der AAK einzuordnen, wäre im Falle der zweiten vorgestellten Studie eine zusätzliche gesunde Kontrollgruppe hilfreich gewesen. Zudem wurden lediglich die AAK-Konzentrationen und nicht deren Funktion in Bezug auf den Rezeptor bestimmt. Wie von Herda et al. ausführlich diskutiert, können AAK sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte ausüben (Herda et al., 2012). Weitere Studien zur Charakterisierung dieser Effekte sind nötig. Auch die Enzymaktivität von sCD26 wurde für die Diskussion basierend auf den Ergebnissen von Durinx et al. angenommen und nicht direkt bestimmt (Durinx et al., 2000).

Darüber hinaus beruht die Einschätzung der Symptomschwere auf den subjektiven Angaben der Patient\*innen. Der COMPASS-31-Fragebogen, der SF-36 sowie die Bell Disability Scale sind in der CFS-Diagnostik bereits weit verbreitet und beinhalten spezifische Frageitems. In zukünftigen Studien könnten neben Fragebögen auch zunehmend objektive Verfahren wie der hier angewandte Schellong-Test, die Messung von Handkraft und Herzratenvariabilität oder die Evaluation peripherer endothelialer Dysfunktion mittels arterieller Tonometrie zum Einsatz kommen (Jakel et al., 2021, Scherbakov et al., 2020, Escorihuela et al., 2020).

Die Einteilung nach infektionsassoziiertem Erkrankungsbeginn basiert auf den Angaben der Patient\*innen und wurde nicht serologisch gesichert. Die Schwierigkeit besteht hierbei häufig darin, dass sich die initiale Infektion unspezifisch oder mit milden Symptomen präsentieren kann und dass definitionsgemäß 6 Monate bis zur Diagnosestellung eines ME/CFS vergehen müssen. Die akute Symptomatik wird daher nicht zwingend serologisch abgeklärt und eine positive Serologie ist im Nachhinein der auslösenden Episode meist nicht zuzuordnen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass vor allem die Schwere der akuten Infektion prädiktiv für die Entwicklung eines postinfektiösen ME/CFS ist (Hickie et al., 2006). Ein Ansatz könnte sein, Studien auf spezifische im Zusammenhang mit ME/CFS beschriebene Erkrankungen wie eine EBV- oder SARS-CoV-2-Infektion zu konzentrieren, deren akute Manifestation serologisch erfasst wurde. In jedem Falle sollte eine präzise Infektionsanamnese erfolgen.

Eine Stärke der hier vorgestellten Studien ist die umfangreiche Evaluation der ME/CFS-Kohorten. Die Diagnosestellung und Einschätzung der Symptomschwere erfolgte anhand anerkannter und standardisierter Kriterien und Fragebögen, welche auch in anderen relevanten Studien zu ME/CFS angewandt wurden. Die Patient\*innen erhielten eine detaillierte Labordiagnostik und die Schellong-Untersuchung erfolgte nach einem klar definiertem Schema. Die ELISA-Messungen wurden mittels etablierter Kits durchgeführt.

Das hier verwendete sCD26-ELISA-Kit zeigte eine mit dem von Fletcher et al. angewandten vergleichbare Sensitivität und Intra-Assay-Reproduzierbarkeit (Fletcher et al., 2010, Thermo Fischer Scientific Inc., 2018). Die Bestimmung der GPCR-AAK wurde auch in vielen der Vergleichsstudien mithilfe der ELISA-Kits der CellTrend GmbH Luckenwalde durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals getrennte Analysen nach der Art des Erkrankungsbeginns im Hinblick auf auslösende Infektionen bei ME/CFS durchgeführt. Zudem konnten zum ersten Mal direkte Korrelationen zwischen GPCR-AAK und spezifischen Symptomen bei ME/CFS gezeigt werden.

#### 4.4 Implikationen für zukünftige Forschung

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studien sprechen dafür, dass die getrennte Analyse von Subgruppen in Hinblick auf den Erkrankungsbeginn auch für zukünftige Studien vielversprechend ist. Neben rein vergleichenden Studien bezüglich bestimmter Biomarker, können Korrelations- und Regressionsanalysen einen Hinweis auf zugrundeliegende pathophysiologische Veränderungen liefern. So deuten die Assoziationen zwischen AAK gegen GPCR und sCD26 darauf hin, dass Veränderungen der AAK-Konzentrationen auch funktionelle Bedeutung über die direkte Rezeptorwirkung hinaus haben. Zum genauen Verständnis dieser Zusammenhänge sind künftig funktionelle Analysen von Bedeutung. Es gilt zu klären, in welcher Weise die hier analysierten AAK gegen GPCR mit ihren Zielrezeptoren interagieren. Auch die Analyse der Enzymaktivität von sCD26 bei ME/CFS-Patient\*innen könnte Aufschlüsse über Folgeeffekte auf dessen Substrate geben.

Die hier gezeigten Korrelationsmuster zwischen AAK und Symptomen in den beiden Subgruppen unterstützen zudem positive Ergebnisse erster Therapiestudien mittels Immunadsorption (Scheibenbogen et al., 2018, Tolle et al., 2020). In weiteren Studien könnte die Art des Erkrankungsbeginns als mögliches Selektionskriterium für Therapien evaluiert werden, welche auf AAK-Depletion abzielen.

Ein weiteres Feld möglicher Therapieansätze ergibt sich aus den Hinweisen auf endotheliale Dysfunktion bei ME/CFS. Wie zuvor diskutiert, könnte ein Überwiegen vasokonstriktorischer Effekte bei beta-adrenerger Dysfunktion und verminderter eNOS-Aktivität zu verminderter muskulärer Perfusion und nachfolgend exzessivem Übertreten vasodilatatorischer und algetischer Mediatoren führen. Das Wiederherstellen

vasodilatatorischer Einflüsse könnte diesen Teufelskreis durchbrechen. Im Tierexperiment konnte die verminderte Stickstoffproduktion infolge beta1-AdR-AAK durch Vorbehandlung mit dem Stickstoffvorläufer L-Arginin wiederhergestellt werden (Abdelkrim et al., 2014). L-Arginin ist als Nahrungsergänzungsmittel verfügbar und ein positiver Effekt auf arteriellen Hypertonus und kardiovaskuläre Erkrankungen konnte in mehreren Studien gezeigt werden (Shiraseb et al., 2022).

Ein weiterer möglicher Ansatz besteht in der Umgehung der eNOS unter direkter Einflussnahme auf nachgeschaltete Mediatoren. Stickstoff aktiviert die zytosolische Guanylatzyklase in Gefäßmuskelzellen, welche Guanosintriphosphat in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umwandelt und so Vasorelaxation vermittelt.

Der Abbau des cGMP erfolgt über Phosphodiesterasen. Während man sich die Inhibition der Phosphodiesterase-5 initial zur Behandlung der erektilen Dysfunktion zunutze machte, fanden sich in den letzten Jahren zunehmend weitere Anwendungsgebiete. Phosphodiesterase-5-Inhibitoren zählen zu den Standardtherapeutika der pulmonalen Hypertonie. Günstige Effekte wurden unter anderem im Rahmen von arterieller Hypertonie, chronischer Niereninsuffizienz und peripherer arterieller Verschlusskrankheit nachgewiesen (Tzoumas et al., 2020).

Neuere Ansätze sind die Guanylatzyklase-Aktivatoren beziehungsweise -Stimulatoren, welche mehr oder weniger Stickstoff-unabhängig zu einer Enzymaktivierung und cGMP-Produktion führen. Klinische Studien untersuchten unter anderem die Anwendung bei pulmonaler Hypertonie und Herzinsuffizienz (Breitenstein et al., 2017).

Die Erwartung günstiger Effekte dieser Therapieansätze gilt unter der Annahme einer vor allem peripheren endothelialen Dysfunktion mit Störung der Mikrozirkulation und Muskelperfusion. ME/CFS-Patient\*innen sind in der Regel jung und weisen nicht das klassische kardiovaskuläre Risikoprofil auf. Ziel ist daher eine verbesserte muskuläre Perfusion, um das Ausschwemmen lokaler Mediatoren zu verhindern. Dabei sollten immer die systemischen Effekte der zuvor genannten Therapeutika bedacht werden, welche Hypotonie und orthostatische Intoleranz verstärken können.

## 5 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend deuten die im Rahmen dieses Promotionsvorhabens erzielten Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei infektionsassoziiertem ME/CFS um eine von ME/CFS anderer Genese pathomechanistisch abgrenzbare Subgruppe handelt. Unsere Daten weisen darauf hin, dass die Schwere der Symptomatik durch AAK gegen GPCR beeinflusst wird und dass diese in potenziell pathologischer Form mit anderen Teilen des Immunsystems interagieren. Interpretiert man diese Ergebnisse im Kontext endothelialer Dysfunktion bei ME/CFS, so lassen sich viele der Kernsymptome als Folge einer veränderten AAK-Rezeptor-Interaktion verstehen. Es gibt Hinweise darauf, dass Veränderungen an AAK oder Zielrezeptoren im Rahmen der auslösenden Infektion entstehen. Diese Erkenntnisse bieten neue Perspektiven für Diagnostik und Therapie.

## 6 Literaturverzeichnis

- ABDELKRIM, M. A., LEONETTI, D., MONTAUDON, E., CHATAGNON, G., GOGNY, M., DESFONTIS, J. C., NOIREAUD, J. & MALLEM, M. Y. 2014. Antibodies against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induce endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries of the Wistar rat. *Int Immunopharmacol*, 19, 308-16.
- ABLASHI, D. V., EASTMAN, H. B., OWEN, C. B., ROMAN, M. M., FRIEDMAN, J., ZABRISKIE, J. B., PETERSON, D. L., PEARSON, G. R. & WHITMAN, J. E. 2000. Frequent HHV-6 reactivation in multiple sclerosis (MS) and chronic fatigue syndrome (CFS) patients. *J Clin Virol*, 16, 179-91.
- ALTHOUSE, A. D. 2016. Adjust for Multiple Comparisons? It's Not That Simple. *Ann Thorac Surg*, 101, 1644-5.
- AUGSTEIN, P., NASELLI, G., LOUDOVARIS, T., HAWTHORNE, W. J., CAMPBELL, P., BANDALA-SANCHEZ, E., ROGERS, K., HEINKE, P., THOMAS, H. E., KAY, T. W. & HARRISON, L. C. 2015. Localization of dipeptidyl peptidase-4 (CD26) to human pancreatic ducts and islet alpha cells. *Diabetes Res Clin Pract*, 110, 291-300.
- AYRES, J. G., FLINT, N., SMITH, E. G., TUNNICLIFFE, W. S., FLETCHER, T. J., HAMMOND, K., WARD, D. & MARMION, B. P. 1998. Post-infection fatigue syndrome following Q fever. *QJM*, 91, 105-23.
- BAKKEN, I. J., TVEITO, K., GUNNES, N., GHADERI, S., STOLTENBERG, C., TROGSTAD, L., HABERG, S. E. & MAGNUS, P. 2014. Two age peaks in the incidence of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: a population-based registry study from Norway 2008-2012. *BMC Med*, 12, 167.
- BD BIOSCIENCES. 2014. *Technical Data Sheet: BV605 Mouse Anti-Human CD4* [Online]. BD Biosciences. Available: <https://www.bdbiosciences.com/content/bdb/paths/generate-tds-document.us.562659.pdf> [Accessed 25.08 2021].
- BECKER, M. O., KILL, A., KUTSCHE, M., GUENTHER, J., ROSE, A., TABELING, C., WITZENRATH, M., KUHL, A. A., HEIDECHE, H., GHOFRANI, H. A., TIEDE, H., SCHERMULY, R. T., NICKEL, N., HOEPER, M. M., LUKITSCH, I., GOLLASCH, M., KUEBLER, W. M., BOCK, S., BURMESTER, G. R., DRAGUN, D. & RIEMECASTEN, G. 2014. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 190, 808-17.
- BELL, D. S. 1995. *The Doctor's Guide to Chronic Fatigue Syndrome: Understanding, Treating and Living with CFIDS.*, Reading, MA, Addison-Wesley Publishing Company.
- BENJAMINI, Y. & HOCHBERG, Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology*, 57, 289-300.
- BENJAMINI, Y. & YEKUTIELI, D. 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics*, 29, 1165-1188.
- BENY, J. L., NGUYEN, M. N., MARINO, M. & MATSUI, M. 2008. Muscarinic receptor knockout mice confirm involvement of M3 receptor in endothelium-dependent vasodilatation in mouse arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 51, 505-12.
- BERTINAT, R., VILLALOBOS-LABRA, R., HOFMANN, L., BLAUENSTEINER, J., SEPULVEDA, N. & WESTERMEIER, F. 2022. Decreased NO production in endothelial cells exposed to plasma from ME/CFS patients. *Vascul Pharmacol*, 143, 106953.
- BIOLEGEND INC. 2021. *Multicolor Staining Guide* [Online]. San Diego: BioLegend Inc. Available: <https://www.biolegend.com/en-us/multicolor-staining> [Accessed 25.08. 2021].

- BLAUENSTEINER, J., BERTINAT, R., LEON, L. E., RIEDERER, M., SEPULVEDA, N. & WESTERMEIER, F. 2021. Altered endothelial dysfunction-related miRs in plasma from ME/CFS patients. *Sci Rep*, 11, 10604.
- BLOMBERG, J., GOTTFRIES, C. G., ELFAITOURI, A., RIZWAN, M. & ROSEN, A. 2018. Infection Elicited Autoimmunity and Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: An Explanatory Model. *Front Immunol*, 9, 229.
- BREITENSTEIN, S., ROESSIG, L., SANDNER, P. & LEWIS, K. S. 2017. Novel sGC Stimulators and sGC Activators for the Treatment of Heart Failure. *Handb Exp Pharmacol*, 243, 225-247.
- BUCHWALD, D., UMALI, J., PEARLMAN, T., KITH, P., ASHLEY, R. & WENER, M. 1996. Postinfectious chronic fatigue: a distinct syndrome? *Clin Infect Dis*, 23, 385-7.
- BUHLING, F., JUNKER, U., REINHOLD, D., NEUBERT, K., JAGER, L. & ANSORGE, S. 1995. Functional role of CD26 on human B lymphocytes. *Immunol Lett*, 45, 47-51.
- BYNKE, A. J., P; GOTTFRIES, CF; HEIDECKE, H; SCHEIBENBOGEN, C; BERGQUIST, J 2020. Autoantibodies to beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in Myalgic Encephalomyelitis (ME) patients – A validation study in plasma and cerebrospinal fluid from two Swedish cohorts. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*.
- CABRAL-MARQUES, O., MARQUES, A., GIIL, L. M., DE VITO, R., RADEMACHER, J., GUNTHER, J., LANGE, T., HUMRICH, J. Y., KLAPA, S., SCHINKE, S., SCHIMKE, L. F., MARSCHNER, G., PITANN, S., ADLER, S., DECHEND, R., MULLER, D. N., BRAICU, I., SEHOULI, J., SCHULZE-FORSTER, K., TRIPPEL, T., SCHEIBENBOGEN, C., STAFF, A., MERTENS, P. R., LOBEL, M., MASTROIANNI, J., PLATTFAUT, C., GIESELER, F., DRAGUN, D., ENGELHARDT, B. E., FERNANDEZ-CABEZUDO, M. J., OCHS, H. D., AL-RAMADI, B. K., LAMPRECHT, P., MUELLER, A., HEIDECKE, H. & RIEMEKASTEN, G. 2018. GPCR-specific autoantibody signatures are associated with physiological and pathological immune homeostasis. *Nat Commun*, 9, 5224.
- CARRUTHERS, B. M., JAIN, A. K., DE MEIRLEIR, K. L., PETERSON, D. L., KLIMAS, N. G., LERNER, A. M., BESTED, A. C., FLOR-HENRY, P., JOSHI, P., POWLES, A. C. P., SHERKEY, J. A. & VAN DE SANDE, M. I. 2003. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Journal of Chronic Fatigue Syndrome*, 11, 7-115.
- CASROUGE, A., SAUER, A. V., BARREIRA DA SILVA, R., TEJERA-ALHAMBRA, M., SANCHEZ-RAMON, S., ICAREB, CANCRINI, C., INGERSOLL, M. A., AIUTI, A. & ALBERT, M. L. 2018. Lymphocytes are a major source of circulating soluble dipeptidyl peptidase 4. *Clin Exp Immunol*, 194, 166-179.
- CELLA, M. & CHALDER, T. 2010. Measuring fatigue in clinical and community settings. *J Psychosom Res*, 69, 17-22.
- CELLTREND GMBH. 2018. *EIA for Quantitative Determination of anti-Angiotensin II Receptor 1 (AT1)-Antibodies* [Online]. Luckenwalde: CellTrend GmbH. Available: <https://www.celltrend.de/wp-content/uploads/2020/02/AT1R-IgG-Produktinfo-engl.-2018-08.pdf> [Accessed 25.08 2021].
- CHALDER, T., BERELOWITZ, G., PAWLIKOWSKA, T., WATTS, L., WESSELY, S., WRIGHT, D. & WALLACE, E. P. 1993. Development of a fatigue scale. *J Psychosom Res*, 37, 147-53.
- CHRUSCINSKI, A., BREDE, M. E., MEINEL, L., LOHSE, M. J., KOBILKA, B. K. & HEIN, L. 2001. Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol*, 60, 955-62.
- CHU, L., VALENCIA, I. J., GARVERT, D. W. & MONTOYA, J. G. 2019. Onset Patterns and Course of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Front Pediatr*, 7, 12.

- COLLIN, S. M., CRAWLEY, E., MAY, M. T., STERNE, J. A., HOLLINGWORTH, W. & DATABASE, U. C. M. N. O. 2011. The impact of CFS/ME on employment and productivity in the UK: a cross-sectional study based on the CFS/ME national outcomes database. *BMC Health Serv Res*, 11, 217.
- CORDERO, O. J., SALGADO, F. J., MERA-VARELA, A. & NOGUEIRA, M. 2001. Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 21, 69-74.
- CSARDI, G. N., T 2006. The igraph software package for complex network research. *InterJournal, Complex Systems, Complex Systems*.
- CURIEL, R., PEREZ-GONZALEZ, J., BRITO, N., ZERPA, R., TELLEZ, D., CABRERA, J., CURIEL, C. & CUBEDDU, L. 1989. Positive inotropic effects mediated by alpha 1 adrenoceptors in intact human subjects. *J Cardiovasc Pharmacol*, 14, 603-15.
- DRAGUN, D., MULLER, D. N., BRASEN, J. H., FRITSCH, L., NIEMINEN-KELHA, M., DECHEND, R., KINTSCHER, U., RUDOLPH, B., HOEBEKE, J., ECKERT, D., MAZAK, I., PLEHM, R., SCHONEMANN, C., UNGER, T., BUDDE, K., NEUMAYER, H. H., LUFT, F. C. & WALLUKAT, G. 2005. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*, 352, 558-69.
- DUBOIS, R. E., SEELEY, J. K., BRUS, I., SAKAMOTO, K., BALLOW, M., HARADA, S., BECHTOLD, T. A., PEARSON, G. & PURTILO, D. T. 1984. Chronic mononucleosis syndrome. *South Med J*, 77, 1376-82.
- DUKA, I., GAVRAS, I., JOHNS, C., HANDY, D. E. & GAVRAS, H. 2000. Role of the postsynaptic alpha(2)-adrenergic receptor subtypes in catecholamine-induced vasoconstriction. *Gen Pharmacol*, 34, 101-6.
- DURINX, C., LAMBEIR, A. M., BOSMANS, E., FALMAGNE, J. B., BERGHMANS, R., HAEMERS, A., SCHARPE, S. & DE MEESTER, I. 2000. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem*, 267, 5608-13.
- ELLINGSEN, T., HORNING, N., MOLLER, B. K., HJELM-POULSEN, J. & STENGAARD-PEDERSEN, K. 2007. In active chronic rheumatoid arthritis, dipeptidyl peptidase IV density is increased on monocytes and CD4(+) T lymphocytes. *Scand J Immunol*, 66, 451-7.
- ENOUZ, S., CARRIE, L., MERKLER, D., BEVAN, M. J. & ZEHN, D. 2012. Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *J Exp Med*, 209, 1769-79.
- ESCORIHUELA, R. M., CAPDEVILA, L., CASTRO, J. R., ZARAGOZA, M. C., MAUREL, S., ALEGRE, J. & CASTRO-MARRERO, J. 2020. Reduced heart rate variability predicts fatigue severity in individuals with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *J Transl Med*, 18, 4.
- FAULKNER, S. & SMITH, A. 2008. A longitudinal study of the relationship between psychological distress and recurrence of upper respiratory tract infections in chronic fatigue syndrome. *Br J Health Psychol*, 13, 177-86.
- FENOUILLET, E., VIGOUROUX, A., STEINBERG, J. G., CHAGVARDIEFF, A., RETORNAZ, F., GUIEU, R. & JAMMES, Y. 2016. Association of biomarkers with health-related quality of life and history of stressors in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients. *J Transl Med*, 14, 251.
- FLETCHER, M. A., ZENG, X. R., MAHER, K., LEVIS, S., HURWITZ, B., ANTONI, M., BRODERICK, G. & KLIMAS, N. G. 2010. Biomarkers in chronic fatigue syndrome: evaluation of natural killer cell function and dipeptidyl peptidase IV/CD26. *PLoS One*, 5, e10817.



- FLUGE, O., BRULAND, O., RISA, K., STORSTEIN, A., KRISTOFFERSEN, E. K., SAPKOTA, D., NAESS, H., DAHL, O., NYLAND, H. & MELLA, O. 2011. Benefit from B-lymphocyte depletion using the anti-CD20 antibody rituximab in chronic fatigue syndrome. A double-blind and placebo-controlled study. *PLoS One*, 6, e26358.
- FLUGE, O. & MELLA, O. 2009. Clinical impact of B-cell depletion with the anti-CD20 antibody rituximab in chronic fatigue syndrome: a preliminary case series. *BMC Neurol*, 9, 28.
- FLUGE, O., REKELAND, I. G., LIEN, K., THURMER, H., BORCHGREVINK, P. C., SCHAFER, C., SORLAND, K., ASSMUS, J., KTORIDOU-VALEN, I., HERDER, I., GOTAAS, M. E., KVAMMEN, O., BARANOWSKA, K. A., BOHNEN, L., MARTINSEN, S. S., LONAR, A. E., SOLVANG, A. H., GYA, A. E. S., BRULAND, O., RISA, K., ALME, K., DAHL, O. & MELLA, O. 2019. B-Lymphocyte Depletion in Patients With Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann Intern Med*, 170, 585-593.
- FLUGE, O., RISA, K., LUNDE, S., ALME, K., REKELAND, I. G., SAPKOTA, D., KRISTOFFERSEN, E. K., SORLAND, K., BRULAND, O., DAHL, O. & MELLA, O. 2015. B-Lymphocyte Depletion in Myalgic Encephalopathy/ Chronic Fatigue Syndrome. An Open-Label Phase II Study with Rituximab Maintenance Treatment. *PLoS One*, 10, e0129898.
- FREDRIKSSON, R., LAGERSTROM, M. C., LUNDIN, L. G. & SCHIOTH, H. B. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 63, 1256-72.
- FREITAG, H., SZKLARSKI, M., LORENZ, S., SOTZNY, F., BAUER, S., PHILIPPE, A., KEDOR, C., GRABOWSKI, P., LANGE, T., RIEMEKASTEN, G., HEIDECKE, H. & SCHEIBENBOGEN, C. 2021. Autoantibodies to Vasoregulative G-Protein-Coupled Receptors Correlate with Symptom Severity, Autonomic Dysfunction and Disability in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *J Clin Med*, 10, 3675.
- FRITH, J., ZALEWSKI, P., KLAWE, J. J., PAIRMAN, J., BITNER, A., TAFIL-KLAWE, M. & NEWTON, J. L. 2012. Impaired blood pressure variability in chronic fatigue syndrome--a potential biomarker. *QJM*, 105, 831-8.
- FRYER, R. M., SEGRETI, J., BANFOR, P. N., WIDOMSKI, D. L., BACKES, B. J., LIN, C. W., BALLARON, S. J., COX, B. F., TREVILLYAN, J. M., REINHART, G. A. & VON GELDERN, T. W. 2008. Effect of bradykinin metabolism inhibitors on evoked hypotension in rats: rank efficacy of enzymes associated with bradykinin-mediated angioedema. *Br J Pharmacol*, 153, 947-55.
- FU, M. L., HERLITZ, H., SCHULZE, W., WALLUKAT, G., MICKE, P., EFTEKHARI, P., SJOGREN, K. G., HJALMARSON, A., MULLER-ESTERL, W. & HOEBEKE, J. 2000. Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension. *J Hypertens*, 18, 945-53.
- FU, M. L., HERLITZ, H., WALLUKAT, G., HILME, E., HEDNER, T., HOEBEKE, J. & HJALMARSON, A. 1994. Functional autoimmune epitope on alpha 1-adrenergic receptors in patients with malignant hypertension. *Lancet*, 344, 1660-3.
- FUJII, H., SATO, W., KIMURA, Y., MATSUDA, H., OTA, M., MAIKUSA, N., SUZUKI, F., AMANO, K., SHIN, I., YAMAMURA, T., MORI, H. & SATO, N. 2020. Altered Structural Brain Networks Related to Adrenergic/Muscarinic Receptor Autoantibodies in Chronic Fatigue Syndrome. *J Neuroimaging*.
- FUJII, T. & KAWASHIMA, K. 2000. Calcium signaling and c-Fos gene expression via M3 muscarinic acetylcholine receptors in human T- and B-cells. *Jpn J Pharmacol*, 84, 124-32.

- FUJINAMI, R. S. & OLDSTONE, M. B. 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science*, 230, 1043-5.
- FUKUDA, K., STRAUS, S. E., HICKIE, I., SHARPE, M. C., DOBBINS, J. G. & KOMAROFF, A. 1994. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group. *Ann Intern Med*, 121, 953-9.
- GAUTHIER, C., TAVERNIER, G., CHARPENTIER, F., LANGIN, D. & LE MAREC, H. 1996. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest*, 98, 556-62.
- GHORPADE, D. S., OZCAN, L., ZHENG, Z., NICOLORO, S. M., SHEN, Y., CHEN, E., BLUHER, M., CZECH, M. P. & TABAS, I. 2018. Hepatocyte-secreted DPP4 in obesity promotes adipose inflammation and insulin resistance. *Nature*, 555, 673-677.
- GILMAN, A. G. 1995. Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep*, 15, 65-97.
- GRABOWSKI, P. & SCHEIBENBOGEN, C. 2020. Abschnitt 4: Chronisches Fatigue-Syndrom. In: SUTTORP, N., MÖCKEL, M., SIEGMUND, B. & DIETEL, M. (eds.) *Harrisons Innere Medizin*. 20. Auflage ed.: ABW Verlag.
- GRISANTI, L. A., PEREZ, D. M. & PORTER, J. E. 2011. Modulation of immune cell function by alpha(1)-adrenergic receptor activation. *Curr Top Membr*, 67, 113-38.
- GUDMUNSDOTTIR, I. J., MEGSON, I. L., KELL, J. S., LUDLAM, C. A., FOX, K. A., WEBB, D. J. & NEWBY, D. E. 2006. Direct vascular effects of protease-activated receptor type 1 agonism in vivo in humans. *Circulation*, 114, 1625-32.
- GUENTHER, S., LOEBEL, M., MOOSLECHNER, A. A., KNOPS, M., HANITSCH, L. G., GRABOWSKI, P., WITTKKE, K., MEISEL, C., UNTERWALDER, N., VOLK, H. D. & SCHEIBENBOGEN, C. 2015. Frequent IgG subclass and mannose binding lectin deficiency in patients with chronic fatigue syndrome. *Hum Immunol*, 76, 729-35.
- GUNNING, W. T., 3RD, KVALE, H., KRAMER, P. M., KARABIN, B. L. & GRUBB, B. P. 2019. Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome Is Associated With Elevated G-Protein Coupled Receptor Autoantibodies. *J Am Heart Assoc*, 8, e013602.
- GUO, L., LI, M., CHEN, Y., WANG, Q., TIAN, Z., PAN, S., ZENG, X. & YE, S. 2015. Anti-Endothelin Receptor Type A Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Arthritis Rheumatol*, 67, 2394-402.
- HARTWIG, J., SOTZNY, F., BAUER, S., HEIDECHE, H., RIEMEKASTEN, G., DRAGUN, D., MEISEL, C., DAMES, C., GRABOWSKI, P. & SCHEIBENBOGEN, C. 2020. Research article IgG stimulated  $\beta_2$  adrenergic receptor activation is attenuated in patients with ME/CFS. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 100047.
- HEINS, J., WELKER, P., SCHÖNLEIN, C., BORN, I., HARTRODT, B., NEUBERT, K., TSURU, D. & BARTH, A. 1988. Mechanism of proline-specific proteinases: (I) Substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV from pig kidney and proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Biochim Biophys Acta*, 954, 161-9.
- HELLSTEN, Y., NYBERG, M., JENSEN, L. G. & MORTENSEN, S. P. 2012. Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *J Physiol*, 590, 6297-305.
- HERDA, L. R., FELIX, S. B. & BOEGE, F. 2012. Drug-like actions of autoantibodies against receptors of the autonomous nervous system and their impact on human heart function. *Br J Pharmacol*, 166, 847-57.
- HICKIE, I., DAVENPORT, T., WAKEFIELD, D., VOLLMER-CONNA, U., CAMERON, B., VERNON, S. D., REEVES, W. C., LLOYD, A. & DUBBO INFECTION OUTCOMES STUDY, G. 2006. Post-

- infective and chronic fatigue syndromes precipitated by viral and non-viral pathogens: prospective cohort study. *BMJ*, 333, 575.
- HOOPER, N. M., KARRAN, E. H. & TURNER, A. J. 1997. Membrane protein secretases. *Biochem J*, 321 ( Pt 2), 265-79.
- IKEDA, T., KUMAGAI, E., IWATA, S. & YAMAKAWA, A. 2013. Soluble CD26/Dipeptidyl Peptidase IV Enhances the Transcription of IL-6 and TNF-alpha in THP-1 Cells and Monocytes. *PLoS One*, 8, e66520.
- IKUSHIMA, H., MUNAKATA, Y., IWATA, S., OHNUMA, K., KOBAYASHI, S., DANG, N. H. & MORIMOTO, C. 2002. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances transendothelial migration via its interaction with mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Cell Immunol*, 215, 106-10.
- IWAKI-EGAWA, S., WATANABE, Y., KIKUYA, Y. & FUJIMOTO, Y. 1998. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem*, 124, 428-33.
- JAKEL, B., KEDOR, C., GRABOWSKI, P., WITTKKE, K., THIEL, S., SCHERBAKOV, N., DOEHNER, W., SCHEIBENBOGEN, C. & FREITAG, H. 2021. Hand grip strength and fatigability: correlation with clinical parameters and diagnostic suitability in ME/CFS. *J Transl Med*, 19, 159.
- JAYACHANDRAN, M., HAYASHI, T., SUMI, D., THAKUR, N. K., KANO, H., IGNARRO, L. J. & IGUCHI, A. 2001. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase through beta(2)-adrenergic receptor--the role of a beta-blocker with NO-releasing action. *Biochem Biophys Res Commun*, 280, 589-94.
- JOSEPHY, P. D., ELING, T. & MASON, R. P. 1982. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *J Biol Chem*, 257, 3669-75.
- KAUMANN, A. J., SANDERS, L., LYNHAM, J. A., BARTEL, S., KUSCHEL, M., KARCZEWSKI, P. & KRAUSE, E. G. 1996. Beta 2-adrenoceptor activation by zinterol causes protein phosphorylation, contractile effects and relaxant effects through a cAMP pathway in human atrium. *Mol Cell Biochem*, 163-164, 113-23.
- KEDOR, C., FREITAG, H., MEYER-ARNDT, L., WITTKKE, K., ZOLLER, T., STEINBEIS, F., HAFFKE, M., RUDOLF, G., HEIDECKER, B., VOLK, H., SKURK, C., PAUL, F., BELLMANN-STROBL, J. & SCHEIBENBOGEN, C. 2021. Chronic COVID-19 Syndrome and Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS) following the first pandemic wave in Germany – a first analysis of a prospective observational study. *medRxiv*, 2021.02.06.21249256.
- KELLER, B. A., PRYOR, J. L. & GILOTEAUX, L. 2014. Inability of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients to reproduce VO(2)peak indicates functional impairment. *J Transl Med*, 12, 104.
- KERR, J. R., BRACEWELL, J., LAING, I., MATTEY, D. L., BERNSTEIN, R. M., BRUCE, I. N. & TYRRELL, D. A. 2002. Chronic fatigue syndrome and arthralgia following parvovirus B19 infection. *J Rheumatol*, 29, 595-602.
- KHOURY, S. J., GUTTMANN, C. R., ORAV, E. J., KIKINIS, R., JOLESZ, F. A. & WEINER, H. L. 2000. Changes in activated T cells in the blood correlate with disease activity in multiple sclerosis. *Arch Neurol*, 57, 1183-9.
- KITAGAWA, N., HAMAGUCHI, M., MAJIMA, S., FUKUDA, T., KIMURA, T., HASHIMOTO, Y., TANAKA, M., YAMAZAKI, M., NAKAMURA, N. & FUKUI, M. 2018. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors have adverse effects for the proliferation of human T cells. *J Clin Biochem Nutr*, 63, 106-112.

- KLIMAS, N. G., SALVATO, F. R., MORGAN, R. & FLETCHER, M. A. 1990. Immunologic abnormalities in chronic fatigue syndrome. *J Clin Microbiol*, 28, 1403-10.
- KOBAYASHI, H., HOSONO, O., MIMORI, T., KAWASAKI, H., DANG, N. H., TANAKA, H. & MORIMOTO, C. 2002. Reduction of serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 29, 1858-66.
- KOVALENKO, N. Y., MATSIEVSKII, D. D. & RESHETNYAK, V. K. 2014. Effect of selective blockade of M4 cholinergic receptors by tropicamide on blood supply in brain, splanchnic azygous organs, and hindlimbs in intact rats. *Bull Exp Biol Med*, 156, 740-2.
- KRAKAUER, M., SORENSEN, P. S. & SELLEBJERG, F. 2006. CD4(+) memory T cells with high CD26 surface expression are enriched for Th1 markers and correlate with clinical severity of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 181, 157-64.
- LAMBEIR, A. M., PROOST, P., DURINX, C., BAL, G., SENTEN, K., AUGUSTYNS, K., SCHARPE, S., VAN DAMME, J. & DE MEESTER, I. 2001. Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family. *J Biol Chem*, 276, 29839-45.
- LANGER, S. Z. 1974. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol*, 23, 1793-800.
- LETTAU, M., DIETZ, M., VOLLMERS, S., ARMBRUST, F., PETERS, C., DANG, T. M., CHITADZE, G., KABELITZ, D. & JANSSEN, O. 2019. Degranulation of human cytotoxic lymphocytes is a major source of proteolytically active soluble CD26/DPP4. *Cell Mol Life Sci*.
- LOEBEL, M., GRABOWSKI, P., HEIDECHE, H., BAUER, S., HANITSCH, L. G., WITTKER, K., MEISEL, C., REINKE, P., VOLK, H. D., FLUGE, O., MELLA, O. & SCHEIBENBOGEN, C. 2016. Antibodies to beta adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Brain Behav Immun*, 52, 32-39.
- LOJDA, Z. 1979. Studies on dipeptidyl(amino)peptidase IV (glycyl-proline naphthylamidase). II. Blood vessels. *Histochemistry*, 59, 153-66.
- LUNDVALL, J. & JARHULT, J. 1976. Beta adrenergic dilator component of the sympathetic vascular response in skeletal muscle. Influence on the micro-circulation and on transcapillary exchange. *Acta Physiol Scand*, 96, 180-92.
- MAECKER, H. T., MCCOY, J. P. & NUSSENBLATT, R. 2012. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*, 12, 191-200.
- MAMENKO, M., ZAIKA, O., BOUKELMOUNE, N., MADDEN, E. & POCHYNYUK, O. 2015. Control of ENaC-mediated sodium reabsorption in the distal nephron by Bradykinin. *Vitam Horm*, 98, 137-54.
- MASON, R. P., JACOB, R. F., KUBANT, R., CISZEWSKI, A., CORBALAN, J. J. & MALINSKI, T. 2012. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition with saxagliptin enhanced nitric oxide release and reduced blood pressure and sICAM-1 levels in hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 60, 467-73.
- MATSUBARA, J., SUGIYAMA, S., SUGAMURA, K., NAKAMURA, T., FUJIWARA, Y., AKIYAMA, E., KUROKAWA, H., NOZAKI, T., OHBA, K., KONISHI, M., MAEDA, H., IZUMIYA, Y., KAIKITA, K., SUMIDA, H., JINNOUCHI, H., MATSUI, K., KIM-MITSUYAMA, S., TAKEYA, M. & OGAWA, H. 2012. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Am Coll Cardiol*, 59, 265-76.
- MCCAUGHAN, G. W., WICKSON, J. E., CRESWICK, P. F. & GORRELL, M. D. 1990. Identification of the bile canalicular cell surface molecule GP110 as the ectopeptidase dipeptidyl

- peptidase IV: an analysis by tissue distribution, purification and N-terminal amino acid sequence. *Hepatology*, 11, 534-44.
- MENTLEIN, R., GALLWITZ, B. & SCHMIDT, W. E. 1993. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem*, 214, 829-35.
- MENTZEL, S., DIJKMAN, H. B., VAN SON, J. P., KOENE, R. A. & ASSMANN, K. J. 1996. Organ distribution of aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV in normal mice. *J Histochem Cytochem*, 44, 445-61.
- MILLER, S. D., VANDERLUGT, C. L., BEGOLKA, W. S., PAO, W., YAUCH, R. L., NEVILLE, K. L., KATZ-LEVY, Y., CARRIZOSA, A. & KIM, B. S. 1997. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med*, 3, 1133-6.
- NACUL, L., AUTHIER, F. J., SCHEIBENBOGEN, C., LORUSSO, L., HELLAND, I. B., MARTIN, J. A., SIRBU, C. A., MENGSHOEL, A. M., POLO, O., BEHREND, U., NIELSEN, H., GRABOWSKI, P., SEKULIC, S., SEPULVEDA, N., ESTEVEZ-LOPEZ, F., ZALEWSKI, P., PHEBY, D. F. H., CASTROMARRERO, J., SAKKAS, G. K., CAPELLI, E., BRUNDSDLUND, I., CULLINAN, J., KRUMINA, A., BERGQUIST, J., MUROVSKA, M., VERMUELEN, R. C. W. & LACERDA, E. M. 2021. European Network on Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (EUROMENE): Expert Consensus on the Diagnosis, Service Provision, and Care of People with ME/CFS in Europe. *Medicina (Kaunas)*, 57.
- NACUL, L., DE BARROS, B., KINGDON, C. C., CLIFF, J. M., CLARK, T. G., MUDIE, K., DOCKRELL, H. M. & LACERDA, E. M. 2019. Evidence of Clinical Pathology Abnormalities in People with Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS) from an Analytic Cross-Sectional Study. *Diagnostics (Basel)*, 9.
- NAESS, H., SUNDAL, E., MYHR, K. M. & NYLAND, H. I. 2010. Postinfectious and chronic fatigue syndromes: clinical experience from a tertiary-referral centre in Norway. *In Vivo*, 24, 185-8.
- NARGIS, T., KUMAR, K., GHOSH, A. R., SHARMA, A., RUDRA, D., SEN, D., CHAKRABARTI, S., MUKHOPADHYAY, S., GANGULY, D. & CHAKRABARTI, P. 2017. KLK5 induces shedding of DPP4 from circulatory Th17 cells in type 2 diabetes. *Mol Metab*, 6, 1529-1539.
- NEWTON, D. J., KENNEDY, G., CHAN, K. K., LANG, C. C., BELCH, J. J. & KHAN, F. 2012. Large and small artery endothelial dysfunction in chronic fatigue syndrome. *Int J Cardiol*, 154, 335-6.
- NEYMAN, J. & PEARSON, E. S. 1928. On the use and interpretation of certain test criteria for purposes of statistical inference. Part II. *Biometrika*, 20a, 263-294.
- NGUYEN DINH CAT, A. & TOUYZ, R. M. 2011. Cell Signaling of Angiotensin II on Vascular Tone: Novel Mechanisms. *Current Hypertension Reports*, 13, 122-128.
- OHNUMA, K., MUNAKATA, Y., ISHII, T., IWATA, S., KOBAYASHI, S., HOSONO, O., KAWASAKI, H., DANG, N. H. & MORIMOTO, C. 2001. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV induces T cell proliferation through CD86 up-regulation on APCs. *J Immunol*, 167, 6745-55.
- OHNUMA, K., UCHIYAMA, M., YAMOCHI, T., NISHIBASHI, K., HOSONO, O., TAKAHASHI, N., KINA, S., TANAKA, H., LIN, X., DANG, N. H. & MORIMOTO, C. 2007. Caveolin-1 triggers T-cell activation via CD26 in association with CARMA1. *J Biol Chem*, 282, 10117-31.
- OHNUMA, K., YAMOCHI, T., UCHIYAMA, M., NISHIBASHI, K., IWATA, S., HOSONO, O., KAWASAKI, H., TANAKA, H., DANG, N. H. & MORIMOTO, C. 2005. CD26 mediates dissociation of Tollip and IRAK-1 from caveolin-1 and induces upregulation of CD86 on antigen-presenting cells. *Mol Cell Biol*, 25, 7743-57.

- OHNUMA, K., YAMOCHI, T., UCHIYAMA, M., NISHIBASHI, K., YOSHIKAWA, N., SHIMIZU, N., IWATA, S., TANAKA, H., DANG, N. H. & MORIMOTO, C. 2004. CD26 up-regulates expression of CD86 on antigen-presenting cells by means of caveolin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14186-91.
- OLIVEIRA, B. C., MARQUES, V. B., BRUN, B. F., DE OLIVEIRA, E. S. H. M., FREITAS SOARES MELO, S., OLIVEIRA, E. M., DOS SANTOS, L. & BARAUNA, V. G. 2019. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition prevents vascular dysfunction induced by beta-adrenergic hyperactivity. *Biomed Pharmacother*, 113, 108733.
- PARKER, J. D., NEWTON, G. E., LANDZBERG, J. S., FLORAS, J. S. & COLUCCI, W. S. 1995. Functional significance of presynaptic alpha-adrenergic receptors in failing and nonfailing human left ventricle. *Circulation*, 92, 1793-800.
- PONICKE, K., VOGELSANG, M., HEINROTH, M., BECKER, K., ZOLK, O., BOHM, M., ZERKOWSKI, H. R. & BRODDE, O. E. 1998. Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart. *Circulation*, 97, 744-51.
- PORTER, N., LERCH, A., JASON, L. A., SORENSON, M., FLETCHER, M. A. & HERRINGTON, J. 2010. A Comparison of Immune Functionality in Viral versus Non-Viral CFS Subtypes. *J Behav Neurosci Res*, 8, 1-8.
- RADU, B. M., OSCULATI, A. M. M., SUKU, E., BANCIU, A., TSENOV, G., MERIGO, F., DI CHIO, M., BANCIU, D. D., TOGNOLI, C., KACER, P., GIORGETTI, A., RADU, M., BERTINI, G. & FABENE, P. F. 2017. All muscarinic acetylcholine receptors (M1-M5) are expressed in murine brain microvascular endothelium. *Sci Rep*, 7, 5083.
- RASCHKE, S., ECKARDT, K., BJORKLUND HOLVEN, K., JENSEN, J. & ECKEL, J. 2013. Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells. *PLoS One*, 8, e62008.
- REKELAND, I. G., FOSSA, A., LANDE, A., KTORIDOU-VALEN, I., SORLAND, K., HOLSEN, M., TRONSTAD, K. J., RISA, K., ALME, K., VIKEN, M. K., LIE, B. A., DAHL, O., MELLA, O. & FLUGE, O. 2020. Intravenous Cyclophosphamide in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. An Open-Label Phase II Study. *Front Med (Lausanne)*, 7, 162.
- RICHTER, B., BANDEIRA-ECHTLER, E., BERGERHOFF, K. & LERCH, C. 2008. Emerging role of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag*, 4, 753-68.
- RIEMEKASTEN, G., PETERSEN, F. & HEIDECKE, H. 2020. What Makes Antibodies Against G Protein-Coupled Receptors so Special? A Novel Concept to Understand Chronic Diseases. *Front Immunol*, 11, 564526.
- ROHRBORN, D., ECKEL, J. & SELL, H. 2014. Shedding of dipeptidyl peptidase 4 is mediated by metalloproteases and up-regulated by hypoxia in human adipocytes and smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 588, 3870-7.
- ROTHER, G. 2007. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: SACK, U., TÁRNOK, A. & ROTHER, G. (eds.) *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger.
- RYBERG, A. T., SELBERG, H., SOUKUP, O., GRADIN, K. & TOBIN, G. 2008. Cholinergic submandibular effects and muscarinic receptor expression in blood vessels of the rat. *Arch Oral Biol*, 53, 605-16.
- SCHEIBENBOGEN, C., FREITAG, H., BLANCO, J., CAPELLI, E., LACERDA, E., AUTHIER, J., MEEUS, M., CASTRO MARRERO, J., NORA-KRUKLE, Z., OLTRA, E., STRAND, E. B., SHIKOVA, E., SEKULIC, S. & MUROVSKA, M. 2017. The European ME/CFS Biomarker Landscape project: an initiative of the European network EUROMENE. *J Transl Med*, 15, 162.

- SCHEIBENBOGEN, C., LOEBEL, M., FREITAG, H., KRUEGER, A., BAUER, S., ANTELMANN, M., DOEHNER, W., SCHERBAKOV, N., HEIDECKE, H., REINKE, P., VOLK, H. D. & GRABOWSKI, P. 2018. Immunoabsorption to remove ss2 adrenergic receptor antibodies in Chronic Fatigue Syndrome CFS/ME. *PLoS One*, 13, e0193672.
- SCHERBAKOV, N., SZKLARSKI, M., HARTWIG, J., SOTZNY, F., LORENZ, S., MEYER, A., GRABOWSKI, P., DOEHNER, W. & SCHEIBENBOGEN, C. 2020. Peripheral endothelial dysfunction in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *ESC Heart Fail*, 7, 1064-1071.
- SCHONERMARCK, U., CSERNOK, E., TRABANDT, A., HANSEN, H. & GROSS, W. L. 2000. Circulating cytokines and soluble CD23, CD26 and CD30 in ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatol*, 18, 457-63.
- SCHROEDER, H. W., JR. & CAVACINI, L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S41-52.
- SHIRASEB, F., ASBAGHI, O., BAGHERI, R., WONG, A., FIGUEROA, A. & MIRZAEI, K. 2022. Effect of L-Arginine Supplementation on Blood Pressure in Adults: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Adv Nutr*, 13, 1226-1242.
- SLETTEN, D. M., SUAREZ, G. A., LOW, P. A., MANDREKAR, J. & SINGER, W. 2012. COMPASS 31: a refined and abbreviated Composite Autonomic Symptom Score. *Mayo Clin Proc*, 87, 1196-201.
- SORLAND, K., SANDVIK, M. K., REKELAND, I. G., RIBU, L., SMASTUEN, M. C., MELLA, O. & FLUGE, O. 2021. Reduced Endothelial Function in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome-Results From Open-Label Cyclophosphamide Intervention Study. *Front Med (Lausanne)*, 8, 642710.
- STEINER, S., BECKER, S. C., HARTWIG, J., SOTZNY, F., LORENZ, S., BAUER, S., LOBEL, M., STITTRICH, A. B., GRABOWSKI, P. & SCHEIBENBOGEN, C. 2020. Autoimmunity-Related Risk Variants in PTPN22 and CTLA4 Are Associated With ME/CFS With Infectious Onset. *Front Immunol*, 11, 578.
- STEINFATH, M., LAVICKY, J., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H., DORING, V. & KALMAR, P. 1992. Regional distribution of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the failing and nonfailing human heart. *Eur J Clin Pharmacol*, 42, 607-11.
- SZKLARSKI, M., FREITAG, H., LORENZ, S., BECKER, S. C., SOTZNY, F., BAUER, S., HARTWIG, J., HEIDECKE, H., WITTKE, K., KEDOR, C., HANITSCH, L. G., GRABOWSKI, P., SEPULVEDA, N. & SCHEIBENBOGEN, C. 2021. Delineating the Association Between Soluble CD26 and Autoantibodies Against G-Protein Coupled Receptors, Immunological and Cardiovascular Parameters Identifies Distinct Patterns in Post-Infectious vs. Non-Infection-Triggered Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Front Immunol*, 12, 644548.
- TANAKA, S., KURATSUNE, H., HIDAKA, Y., HAKARIYA, Y., TATSUMI, K. I., TAKANO, T., KANAKURA, Y. & AMINO, N. 2003. Autoantibodies against muscarinic cholinergic receptor in chronic fatigue syndrome. *Int J Mol Med*, 12, 225-30.
- TANAKA, T., CAMERINI, D., SEED, B., TORIMOTO, Y., DANG, N. H., KAMEOKA, J., DAHLBERG, H. N., SCHLOSSMAN, S. F. & MORIMOTO, C. 1992. Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. *J Immunol*, 149, 481-6.
- TANAKA, T., DUKE-COHAN, J. S., KAMEOKA, J., YARON, A., LEE, I., SCHLOSSMAN, S. F. & MORIMOTO, C. 1994. Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3082-6.

- TEJERA-ALHAMBRA, M., CASROUGE, A., DE ANDRES, C., RAMOS-MEDINA, R., ALONSO, B., VEGA, J., ALBERT, M. L. & SANCHEZ-RAMON, S. 2014. Low DPP4 expression and activity in multiple sclerosis. *Clin Immunol*, 150, 170-83.
- TENNANT, G. M., WADSWORTH, R. M. & KENNEDY, S. 2008. PAR-2 mediates increased inflammatory cell adhesion and neointima formation following vascular injury in the mouse. *Atherosclerosis*, 198, 57-64.
- THERMO FISCHER SCIENTIFIC INC. 2018. *Human sCD26 ELISA Kit* [Online]. Vienna: Bender MedSystems GmbH Available: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016609\\_235\\_Hu\\_sCD26ELISA\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016609_235_Hu_sCD26ELISA_UG.pdf) [Accessed 25.08.2021].
- THOMAS, G. D. 2015. Functional sympatholysis in hypertension. *Auton Neurosci*, 188, 64-8.
- TOGNETTO, M., D'ANDREA, M. R., TREVISANI, M., GUERRINI, R., SALVADORI, S., SPISANI, L., DANIELE, C., ANDRADE-GORDON, P., GEPETTI, P. & HARRISON, S. 2003. Proteinase-activated receptor-1 (PAR-1) activation contracts the isolated human renal artery in vitro. *Br J Pharmacol*, 139, 21-7.
- TOLLE, M., FREITAG, H., ANTELMANN, M., HARTWIG, J., SCHUCHARDT, M., VAN DER GIET, M., ECKARDT, K. U., GRABOWSKI, P. & SCHEIBENBOGEN, C. 2020. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Efficacy of Repeat Immunoabsorption. *J Clin Med*, 9.
- TOMAS, C., FINKELMEYER, A., HODGSON, T., MACLACHLAN, L., MACGOWAN, G. A., BLAMIRE, A. M. & NEWTON, J. L. 2017. Elevated brain natriuretic peptide levels in chronic fatigue syndrome associate with cardiac dysfunction: a case control study. *Open Heart*, 4, e000697.
- TOUGH, D. F., BORROW, P. & SPRENT, J. 1996. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science*, 272, 1947-50.
- TRIAN, T., MOIR, L. M., GE, Q., BURGESS, J. K., KUO, C., KING, N. J., REDDEL, H. K., BLACK, J. L., OLIVER, B. G. & MCPARLAND, B. E. 2010. Rhinovirus-induced exacerbations of asthma: How is the  $\beta_2$ -adrenoceptor implicated? *Am J Respir Cell Mol Biol*, 43, 227-33.
- TROCHU, J. N., LEBLAIS, V., RAUTUREAU, Y., BEVERELLI, F., LE MAREC, H., BERDEAUX, A. & GAUTHIER, C. 1999. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol*, 128, 69-76.
- TZOUMAS, N., FARRAH, T. E., DHAUN, N. & WEBB, D. J. 2020. Established and emerging therapeutic uses of PDE type 5 inhibitors in cardiovascular disease. *Br J Pharmacol*, 177, 5467-5488.
- VALDEZ, A. R., HANCOCK, E. E., ADEBAYO, S., KIERNICKI, D. J., PROSKAUER, D., ATTEWELL, J. R., BATEMAN, L., DEMARIA, A., JR., LAPP, C. W., ROWE, P. C. & PROSKAUER, C. 2018. Estimating Prevalence, Demographics, and Costs of ME/CFS Using Large Scale Medical Claims Data and Machine Learning. *Front Pediatr*, 6, 412.
- VAN CAMPEN, C., VERHEUGT, F. W. A., ROWE, P. C. & VISSER, F. C. 2020. Cerebral blood flow is reduced in ME/CFS during head-up tilt testing even in the absence of hypotension or tachycardia: A quantitative, controlled study using Doppler echography. *Clin Neurophysiol Pract*, 5, 50-58.
- VAN LY, D., FAIZ, A., JENKINS, C., CROSSETT, B., BLACK, J. L., MCPARLAND, B., BURGESS, J. K. & OLIVER, B. G. 2013. Characterising the mechanism of airway smooth muscle  $\beta_2$  adrenoceptor desensitization by rhinovirus infected bronchial epithelial cells. *PLoS One*, 8, e56058.



- VANDERHEYDEN, M., BARTUNEK, J., GOETHALS, M., VERSTREKEN, S., LAMBEIR, A. M., DE MEESTER, I. & SCHARPE, S. 2009. Dipeptidyl-peptidase IV and B-type natriuretic peptide. From bench to bedside. *Clin Chem Lab Med*, 47, 248-52.
- VANHOUTTE, P. M., SHIMOKAWA, H., FELETOU, M. & TANG, E. H. 2017. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)*, 219, 22-96.
- VERHAAR, M. C., STRACHAN, F. E., NEWBY, D. E., CRUDEN, N. L., KOOMANS, H. A., RABELINK, T. J. & WEBB, D. J. 1998. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation*, 97, 752-6.
- VU, T. K., HUNG, D. T., WHEATON, V. I. & COUGHLIN, S. R. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64, 1057-68.
- WALLUKAT, G. 2002. The beta-adrenergic receptors. *Herz*, 27, 683-90.
- WALLUKAT, G., HOMUTH, V., FISCHER, T., LINDSCHAU, C., HORSTKAMP, B., JUPNER, A., BAUR, E., NISSEN, E., VETTER, K., NEICHEL, D., DUDENHAUSEN, J. W., HALLER, H. & LUFT, F. C. 1999. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest*, 103, 945-52.
- WALLUKAT, G., MORWINSKI, M., KOWAL, K., FORSTER, A., BOEWER, V. & WOLLENBERGER, A. 1991. Autoantibodies against the beta-adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: beta-adrenergic agonism without desensitization. *Eur Heart J*, 12 Suppl D, 178-81.
- WANG, H., SHI, H., LU, Y., YANG, B. & WANG, Z. 1999. Pilocarpine modulates the cellular electrical properties of mammalian hearts by activating a cardiac M3 receptor and a K<sup>+</sup> current. *Br J Pharmacol*, 126, 1725-34.
- WARDEMANN, H., YURASOV, S., SCHAEFER, A., YOUNG, J. W., MEFFRE, E. & NUSSENZWEIG, M. C. 2003. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*, 301, 1374-7.
- WARE, J. E., JR. & SHERBOURNE, C. D. 1992. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care*, 30, 473-83.
- WILD, D. 2013. Immunoassay for Beginners. In: WILD, D. (ed.) *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and related techniques*. 4th ed. Oxford, UK: Elsevier Ltd.
- WIRTH, K. & SCHEIBENBOGEN, C. 2020. A Unifying Hypothesis of the Pathophysiology of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS): Recognitions from the finding of autoantibodies against  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *Autoimmun Rev*, 19, 102527.
- WONG, P. T., WONG, C. K., TAM, L. S., LI, E. K., CHEN, D. P. & LAM, C. W. 2009. Decreased expression of T lymphocyte co-stimulatory molecule CD26 on invariant natural killer T cells in systemic lupus erythematosus. *Immunol Invest*, 38, 350-64.
- WYLLER, V. B., SAUL, J. P., WALLOE, L. & THAULOW, E. 2008. Sympathetic cardiovascular control during orthostatic stress and isometric exercise in adolescent chronic fatigue syndrome. *Eur J Appl Physiol*, 102, 623-32.
- YAMAMOTO, S., OUCHI, Y., NAKATSUKA, D., TAHARA, T., MIZUNO, K., TAJIMA, S., ONOE, H., YOSHIKAWA, E., TSUKADA, H., IWASE, M., YAMAGUTI, K., KURATSUNE, H. & WATANABE, Y. 2012. Reduction of [<sup>11</sup>C](+)-3-MPB binding in brain of chronic fatigue syndrome with serum autoantibody against muscarinic cholinergic receptor. *PLoS One*, 7, e51515.

- YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., GOTO, K. & MASAKI, T. 1988. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *J Hypertens Suppl*, 6, S188-91.
- YU, D. M., SLAITINI, L., GYSBERS, V., RIEKHOFF, A. G., KAHNE, T., KNOTT, H. M., DE MEESTER, I., ABBOTT, C. A., MCCAUGHAN, G. W. & GORRELL, M. D. 2011. Soluble CD26 / dipeptidyl peptidase IV enhances human lymphocyte proliferation in vitro independent of dipeptidyl peptidase enzyme activity and adenosine deaminase binding. *Scand J Immunol*, 73, 102-11.

## 7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marvin Szklarski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung von Subgruppen der Myalgischen Enzephalomyelitis/ des Chronischen Fatigue Syndroms basierend auf Erkrankungsbeginn, Symptomen und Biomarkern“ (Englisch: „Characterization of subgroups in Myalgic Encephalomyelitis/ Chronic Fatigue Syndrome based on onset trigger, symptoms and biomarkers“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 8 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Marvin Szklarski hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

SZKLARSKI, M., FREITAG, H., LORENZ, S., BECKER, S. C., SOTZNY, F., BAUER, S., HARTWIG, J., HEIDECHE, H., WITTKE, K., KEDOR, C., HANITSCH, L. G., GRABOWSKI, P., SEPULVEDA, N. & SCHEIBENBOGEN, C. 2021. Delineating the Association Between Soluble CD26 and Autoantibodies Against G-Protein Coupled Receptors, Immunological and Cardiovascular Parameters Identifies Distinct Patterns in Post-Infectious vs. Non-Infection-Triggered Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Front Immunol*, 12, 644548.

Beitrag im Einzelnen:

Mitwirkung an Durchführung der Schellong-Tests, Auswertung der Ergebnisse von Symptomfragebögen und Schellong-Tests, Zusammentragen aller Daten und Erstellen einer Patient\*innendatenbank, statistische Auswertung (ROC-Analysen unter Mitwirkung von Co-Autor Nuno Sepúlveda, Regressionsanalysen unter Mitwirkung von Co-Autor Sebastian Lorenz), Erstellen der Abbildungen 1A-E, S3 sowie aller Tabellen, Mitwirkung an Abbildungen 2-4, Verfassen des initialen Manuskriptes, Einarbeitung der Rückmeldungen der Co-Autor\*innen gemeinsam mit Letzt-Autorin Carmen Scheibenbogen, Betreuung des Review-Prozesses gegenüber dem Journal.

Publikation 2:

FREITAG, H.†, SZKLARSKI, M.†, LORENZ, S., SOTZNY, F., BAUER, S., PHILIPPE, A., KEDOR, C., GRABOWSKI, P., LANGE, T., RIEMEKASTEN, G., HEIDECHE, H. & SCHEIBENBOGEN, C. 2021. Autoantibodies to Vasoregulative G-Protein-Coupled Receptors Correlate with Symptom Severity, Autonomic Dysfunction and Disability in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *J Clin Med*, 10, 3675.

† Die Autor\*innen teilen sich die Erstautorenschaft.

Beitrag im Einzelnen:

Mitwirkung an Konzeption der Arbeit, Auswertung von Ergebnissen der Symptomfragebögen, Zusammentragen aller Daten und Erstellen einer Patient\*innendatenbank, statistische Auswertung, Erstellen aller Abbildungen und Tabellen, Verfassen des initialen Manuskriptes gemeinsam mit Co-Autorinnen Carmen Scheibenbogen und Helma Freitag, Mitwirkung an Einarbeitung der Rückmeldungen der Co-Autor\*innen.

---

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden

## 9 Publikationen im Rahmen dieser Dissertation

8.1 SZKLARSKI, M., FREITAG, H., LORENZ, S., BECKER, S. C., SOTZNY, F., BAUER, S., HARTWIG, J., HEIDECHE, H., WITTKE, K., KEDOR, C., HANITSCH, L. G., GRABOWSKI, P., SEPULVEDA, N. & SCHEIBENBOGEN, C. 2021. Delineating the Association Between Soluble CD26 and Autoantibodies Against G-Protein Coupled Receptors, Immunological and Cardiovascular Parameters Identifies Distinct Patterns in Post-Infectious vs. Non-Infection-Triggered Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Front Immunol*, 12, 644548.

## 9.1.1 Auszug aus der Journal Summary List (ISi Web of KnowledgeSM): Immunology (2019)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"Immunology"** Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 158 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY	42,168	40.358	0.068470
2	IMMUNITY	54,819	22.553	0.124040
3	NATURE IMMUNOLOGY	44,709	20.479	0.081870
4	Annual Review of Immunology	17,080	19.900	0.019310
5	Lancet HIV	3,301	14.813	0.018090
6	IMMUNOLOGICAL REVIEWS	15,973	13.939	0.026690
7	Science Immunology	2,516	13.440	0.015070
8	TRENDS IN IMMUNOLOGY	13,037	13.422	0.025020
9	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE	63,562	11.743	0.067350
10	JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY	52,417	10.228	0.077410
11	Journal for ImmunoTherapy of Cancer	4,557	9.913	0.016030
12	SEMINARS IN IMMUNOLOGY	5,345	9.186	0.010250
13	Cancer Immunology Research	6,969	8.728	0.026440
14	ALLERGY	18,217	8.706	0.024340
15	Cellular & Molecular Immunology	4,604	8.484	0.010020
16	CLINICAL INFECTIOUS DISEASES	66,656	8.313	0.123760
17	AUTOIMMUNITY REVIEWS	9,902	7.767	0.018300
18	Journal of Allergy and Clinical Immunology-In Practice	5,946	7.574	0.018100
19	Seminars in Immunopathology	3,734	7.480	0.006690
20	CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY	9,628	7.290	0.016900
21	JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY	5,262	6.780	0.007610

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
22	Mucosal Immunology	7,191	6.726	0.021240
23	JOURNAL OF AUTOIMMUNITY	7,159	6.658	0.014180
24	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	16,285	6.633	0.028560
25	Clinical & Translational Immunology	1,082	6.464	0.003890
26	CLINICAL REVIEWS IN ALLERGY & IMMUNOLOGY	3,317	6.437	0.005910
27	EMERGING INFECTIOUS DISEASES	30,705	6.259	0.055920
28	Oncolmmunology	10,116	5.869	0.029410
29	Journal of Neuroinflammation	13,709	5.793	0.025870
30	Emerging Microbes & Infections	2,956	5.776	0.009740
31	npj Vaccines	596	5.699	0.002400
32	Journal of the International AIDS Society	4,956	5.553	0.018220
33	Virulence	4,334	5.542	0.009420
34	CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY	8,390	5.442	0.011550
35	Advances in Immunology	2,357	5.359	0.003740
36	BIODRUGS	1,803	5.313	0.002980
37	EXERCISE IMMUNOLOGY REVIEW	784	5.300	0.000770
38	Frontiers in Immunology	45,626	5.085	0.133080
39	JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES	45,480	5.022	0.074340
40	IMMUNOLOGY	11,269	5.016	0.012590
41	ANNALS OF ALLERGY ASTHMA & IMMUNOLOGY	8,213	4.969	0.011830
42	Journal of Inflammation Research	859	4.953	0.001990
43	Journal of Innate Immunity	2,239	4.932	0.003930

Selected JCR Year: 2019; Selected Categories: "IMMUNOLOGY"



## OPEN ACCESS

**Edited by:**

Marie-Agnes Dragon-Durey,  
Université Paris Descartes, France

**Reviewed by:**

Artur Fedorowski,  
Lund University, Sweden  
Cheryl Rockwell,  
Michigan State University,  
United States

**\*Correspondence:**

Marvin Szklarski  
marvin.szklarski@charite.de

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Autoimmune and  
Autoinflammatory Disorders,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 22 December 2020

**Accepted:** 17 March 2021

**Published:** 06 April 2021

**Citation:**

Szklarski M, Freitag H, Lorenz S,  
Becker SC, Sotzny F, Bauer S,  
Hartwig J, Heidecke H, Wittke K,  
Kedor C, Hanitsch LG, Grabowski P,  
Sepúlveda N and Scheibenbogen C  
(2021) Delineating the Association  
Between Soluble CD26 and  
Autoantibodies Against G-Protein  
Coupled Receptors, Immunological  
and Cardiovascular Parameters  
Identifies Distinct Patterns in  
Post-Infectious vs. Non-Infection-  
Triggered Myalgic Encephalomyelitis/  
Chronic Fatigue Syndrome.  
*Front. Immunol.* 12:644548.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.644548

# Delineating the Association Between Soluble CD26 and Autoantibodies Against G-Protein Coupled Receptors, Immunological and Cardiovascular Parameters Identifies Distinct Patterns in Post-Infectious vs. Non-Infection-Triggered Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome

Marvin Szklarski<sup>1\*</sup>, Helma Freitag<sup>1</sup>, Sebastian Lorenz<sup>1</sup>, Sonya C. Becker<sup>1</sup>, Franziska Sotzny<sup>1</sup>, Sandra Bauer<sup>1</sup>, Jelka Hartwig<sup>1</sup>, Harald Heidecke<sup>2</sup>, Kirsten Wittke<sup>1</sup>, Claudia Kedor<sup>1</sup>, Leif G. Hanitsch<sup>1</sup>, Patricia Grabowski<sup>1</sup>, Nuno Sepúlveda<sup>1</sup> and Carmen Scheibenbogen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Medical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany, <sup>2</sup> CellTrend, Luckenwalde, Germany

Soluble cluster of differentiation 26 (sCD26) has a wide range of enzymatic functions affecting immunological, metabolic and vascular regulation. Diminished sCD26 concentrations have been reported in various autoimmune diseases and also in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic fatigue syndrome (ME/CFS). Here we re-evaluate sCD26 as a diagnostic marker and perform a comprehensive correlation analysis of sCD26 concentrations with clinical and paraclinical parameters in ME/CFS patients. Though this study did find significantly lower concentrations of sCD26 only in the female cohort and could not confirm diagnostic suitability, results from correlation analyses provide striking pathomechanistic insights. In patients with infection-triggered onset, the associations of low sCD26 with elevated autoantibodies (AAB) against alpha1 adrenergic (AR) and M3 muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) point to a pathomechanism of infection-triggered autoimmune-mediated vascular and immunological dysregulation. sCD26 concentrations in infection-triggered ME/CFS were found to be associated with activated T cells, liver enzymes, creatin kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) and inversely with Interleukin-1 beta (IL-1b). Most associations are in line with the known effects of sCD26/DPP-4 inhibition. Remarkably, in non-infection-triggered ME/CFS lower sCD26 in patients with higher heart rate after orthostatic challenge and postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS) suggest an association with orthostatic regulation. These findings provide evidence that the key



enzyme sCD26 is linked to immunological alterations in infection-triggered ME/CFS and delineate a different pathomechanism in the non-infectious ME/CFS subset.

**Keywords:** ME/CFS, chronic fatigue syndrome, CD26, DPP-4, autoantibodies

## INTRODUCTION

Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) is an acquired and complex chronic disease affecting multiple physical functions. Diagnosis according to Canadian Consensus Criteria includes post exertional malaise (PEM), an exacerbation of symptoms and prolonged period of recovery inadequate to the triggering activity. Further, signs of neurological and autonomous impairment, sleep disturbance, pain, cognitive, gastrointestinal and immunological symptoms are persistent in patients (1). With an estimated prevalence of 0.86 % it goes along with considerable long-term impacts on personal life and health care system (2).

The pathomechanism of ME/CFS is unresolved yet, but there is ample evidence for an autoimmune process involved (3). ME/CFS onset is following an infection in approximately two thirds of patients (4). Various pathogens can trigger ME/CFS with Epstein-Barr virus (EBV) best studied (5). Autoantibodies (AAB) against nuclear and membrane structures as well as neurotransmitter receptors including muscarinic cholinergic receptor M3/M4-antibodies (M3-mAChR/M4-mAChR) and beta-1 and -2-adrenergic receptor (beta1-AR/beta2-AR) have been described in patients with ME/CFS (3, 6–8). These antibodies belong to a network of natural antibodies against adrenergic, cholinergic and other G-protein coupled receptors (GPCR) which were shown to be dysregulated and dysfunctional in various autoimmune diseases (9). Supporting these findings, there is comorbidity of ME/CFS with other autoimmune-associated diseases including Hashimoto's thyroiditis, Sjogren's

syndrome and inflammatory bowel syndrome (10, 11). Autoimmunity-related risk variants in protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (*PTPN22*) and cytotoxic T lymphocyte associated protein 4 (*CTLA4*) genes were found to be associated with infection-triggered ME/CFS in a recent study (12). There is no clear evidence that proinflammatory cytokines play a role (13).

Cluster of differentiation 26 (CD26), also known as dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4), is a serine protease with a wide range of enzymatic and non-enzymatic functions affecting immune cell activation, vasomotor adaptation and metabolic regulation. CD26 is expressed on the surface of many cells including immune cells. Shedding results in a soluble form consisting of the extracellular part (14). Lymphocytes are considered as the main source of soluble CD26 (sCD26) and release large amounts of pre-stored proteolytically active sCD26 upon activation (15, 16). Cellular CD26 expression on T cells is upregulated upon activation and facilitates T cell co-stimulation, activation and proliferation (17, 18). In line with this, DPP-4 inhibitors were shown to attenuate T cell proliferation (19).

Diminished concentrations of sCD26 were found in various autoimmune diseases including rheumatoid arthritis, Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides and inflammatory bowel disease and were shown to correlate negatively with disease activity and inflammatory markers (20–22). In a subset of ME/CFS patients diminished concentrations of sCD26 were reported as well and suggested to be suitable as diagnostic biomarker (23). Two other studies analyzed CD26 surface expression on lymphocytes in ME/CFS. One found higher numbers of CD26+ CD4+ T cells in postviral vs non-viral onset ME/CFS patients (24). In the other study quality of life correlated with CD26 expression level (25).

In this study we seek to re-evaluate the suitability of sCD26 as a diagnostic marker in ME/CFS patients. Due to the dysregulation of sCD26 in autoimmunity and ME/CFS, further elucidating its association with clinical and laboratory parameters may help to understand its role in ME/CFS. To achieve this, we herein performed a correlation analysis of sCD26 with various clinical and paraclinical parameters to gain further insight into the potential role of sCD26 in ME/CFS.

## METHODS

### Human Blood Samples

Patients were diagnosed at the outpatient clinic for immunodeficiencies at the Institute for Medical Immunology at the Charité Universitätsmedizin Berlin. Diagnosis of ME/CFS was based on 2003 Canadian Consensus Criteria and exclusion of other medical or neurological diseases which may cause

**Abbreviations:** AAB, Autoantibodies; ACE, Angiotensin converting enzyme; Alpha1/2-AR, Alpha 1/2 adrenergic receptor; ALT, Alanine aminotransferase, also known as Glutamate-Pyruvate-Transaminase (GPT); ANCA-associated vasculitides, Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides; AST, Aspartate aminotransferase, also known as Glutamate-Oxaloacid-Transaminase (GOT); AT1-R, Angiotensin-II-receptor type 1; Beta1/2/3-AR, Beta 1/2/3 adrenergic receptor; BY, Benjamini-Yekutieli; CD26, cluster of differentiation 26; CI, Confidence interval; CK, Creatin kinase; COMPASS 31, Composite Autonomic Symptom Score 31; CTLA4, Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4; DPP-4, Dipeptidyl peptidase 4; EBV, Epstein-Barr virus; ETA-R/ETBR, Endothelin receptor A/B; fT3, Free triiodothyronine; GGT – Gamma-Glutamyl-Transferase; GLP-1, Glucagon-like-peptide 1; GOT, Glutamate-Oxaloacid-Transaminase, also known as Aspartate aminotransferase (AST); GPT, Glutamate-Pyruvate-Transaminase, also known as Alanine aminotransferase (ALT); GPCR, G-protein coupled receptor; HbA1c, Glycated hemoglobin; HC, Healthy controls; IBS, Irritable bowel syndrome; IgA, Immunoglobulin A; IgM, Immunoglobulin M; IL-1b, Interleukin-1 beta; IQR, Interquartile range; LPS, Lipopolysaccharide; LDH, Lactate dehydrogenase; M3/4-mAChR, Muscarinic acetylcholine receptor 3/4; ME/CFS, Myalgic Encephalomyelitis/Chronic fatigue syndrome; MFI, Median Fluorescence Intensity; n, Number; PBMC, Peripheral blood mononuclear cell; POTS, Postural orthostatic tachycardia syndrome; PTPN22, Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22; RAAS, Renin-angiotensin-aldosterone system; ROC, Receiver operating characteristic; SD, Standard deviation; SF-36, Short Form Health Survey 36; TNF, Tumor necrosis factor.

fatigue. The disease onset with an infection was recorded by patients' medical history. Healthy controls (HC) were recruited from staff and did not suffer from a disease relevantly impairing their health and physical function. However, neither clinical nor laboratory assessment was performed for controls. The study was approved by the Ethics Committee of Charité Universitätsmedizin Berlin in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All patients and HC gave informed consent.

### sCD26, Autoantibodies (AAB) and Laboratory Assessment

sCD26 was determined in serum using Human CD26 Platinum ELISA (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Alpha1/2 adrenergic receptor (Alpha1-AR/alpha2-AR)-AAB, beta1-AR-/beta2-AR/beta3-AR-AAB, M3-mAChR-/M4-mAChR-AAB as well as Angiotensin-II-receptor type 1 (AT1-R)-AAB and Endothelin receptor A and B (ETA-R/ETB-R)-AAB were determined using ELISA technology by CellTrend GmbH (Luckenwalde, Germany). Routine laboratory values were determined at the Charité diagnostics laboratory (Labor Berlin GmbH, Berlin, Germany). Interleukin 1 (IL-1b) levels were determined in whole blood samples after 4 hours stimulation with lipopolysaccharide (LPS).

### CD26 Surface Expression on Immune Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy subjects were isolated from heparinized whole blood by density gradient centrifugation and  $1 \times 10^6$  PBMCs were stained with viable and dead cells LIVE/DEAD™ Fixable Aqua dead cell stain kit (Life Technologies) for 15 min followed by an extracellular staining. First CCR7 PerCp Cy 5.5 was stained (clone G043H7, Biolegend) for 15 min at 37 °C followed by CD3 AF700 (clone OKT3, Biolegend), CD4 BV605 (clone RPA-T4, BD Biosciences), CD8 PB (clone SK1, Biolegend), CD45 RA FITC (clone HI100, Biolegend), CD56 APC-Cy7 (clone HCD56, Biolegend), CD19 PE-Cy7 (clone HIB19, Biolegend), CD26 APC (clone BA5b, Biolegend) for 15 min at 4°C. Non-specific binding of Fc-receptors was blocked by 2% polyclonal IgG (Flebogamma). CD26 surface expression was measured with CytoFLEX LX (Beckman Coulter) and data was analyzed with FlowJo software 10.0.08. Gating strategies are shown in the **Supplementary Information**.

### Questionnaires for Symptom Assessments

The presence and severity of symptoms in patients with ME/CFS was assessed using a questionnaire based on the 2003 Canadian Consensus Criteria (1, 26). The cardinal symptoms of fatigue, muscle pain, immune symptoms (mean of the 3 symptoms painful lymph nodes, sore throat and flu-like symptoms) and cognitive impairment (mean of the 3 symptoms memory disturbance, concentration ability and mental tiredness) were scored between 1 (no symptoms) and 10 (severest symptoms) by the patients. Symptoms of autonomic dysfunction were assessed by the Composite Autonomic Symptom Score 31 (COMPASS 31) (27). In addition, disability was examined by Bell score focusing on the level of restriction in daily functioning (28) and fatigue using Chalder Fatigue Score (29). Physical activity level of daily life was assessed by Short Form Health Survey (SF-36) (30).

### Statistical Analysis

Statistical data analyses were done using IBM SPSS Statistics 22.0, GraphPad Prism 6.0 and R 4.0. All data were summarized as median with interquartile range (IQR), mean with standard deviation (SD) or number (n) with percentage as appropriate. Comparisons of quantitative parameters between a pair of groups were performed using Mann-Whitney-U rank-sum-test. For comparison of quantitative parameters between age groups Kruskal-Wallis-test with Dunn's post-hoc analysis was used. Categorical parameters were compared between subgroups applying Chi<sup>2</sup>-test. For evaluation of sCD26 as a diagnostic marker the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve was estimated. Correlation analysis was performed using nonparametric Spearman coefficient. Due to multiple testing Benjamini-Yekutieli (BY) correction was applied for each kind of correlated data aiming to control a false discovery rate of 5% while considering possible dependence among parameters. Adjusted p-values <0.05 were considered to provide evidence for a statistically significant result. Significant correlations with sCD26 and their intercorrelations were depicted as network graphs. The network graphs were developed by using Fruchterman-Reingold algorithm from "igraph" package (31). This algorithm was specifically chosen because modeled forces tend to center most frequently used vertices (dots) while less frequent ones are at the outside (Force-directed graph). Bi-directional stepwise multiple regression analysis was performed after log-transformation of data in order to improve criteria of normally distributed residuals. Age and sex were included as possible confounders.

**TABLE 1** | Cohort characteristics and sCD26 concentrations.

	ME/CFS patients			healthy controls (HC)		
	Whole cohort (n: 205)	Female (n: 145)	Male(n: 60)	Whole cohort (n: 98)	Female (n: 49)	Male (n: 49)
sCD26 (ng/ml)	648 (IQR: 447-814)	610 (IQR: 382-782)	706 (IQR: 544-882)	670 (IQR: 543-797)	718 (IQR: 594-798)	605 (IQR: 516-796)
age (a)	43 (IQR: 32.5-50.5)	44 (IQR: 33-51)	40.5 (IQR: 30.25-49.75)	29 (IQR: 26-38)	31 (IQR: 27-38)	27 (IQR: 25-37)
infection-triggered onset	n: 146 (71.9%)	n: 105 (72.9%)	n: 41 (69.5%)	—	—	—

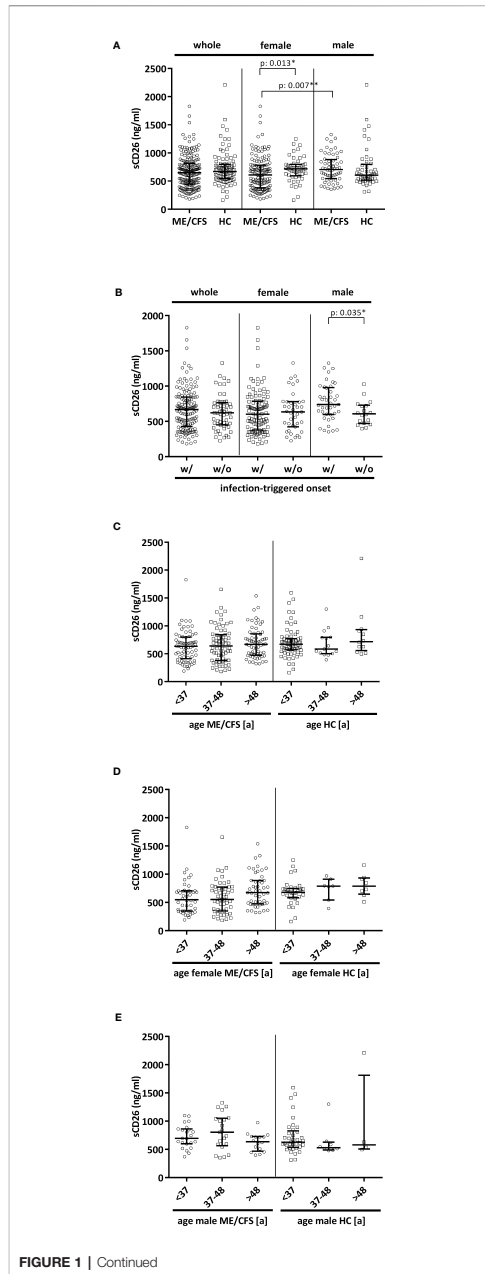


FIGURE 1 | Continued

**FIGURE 1 |** sCD26 in ME/CFS and HC stratified according to sex, disease onset and age. **(A)** ELISA-detected sCD26 serum concentrations in ME/CFS vs. HC and stratified according to sex depicted as boxplots. sCD26 concentrations in sex-groups were compared using Mann-Whitney-U rank-sum test (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ). Whole cohort: ME/CFS (n=205): 648 ng/ml (IQR: 447-814) vs. HC (n=98): 670 ng/ml (IQR: 543-797); female cohort: fME/CFS (n=145): 610 ng/ml (IQR: 382-782) vs. fHC (n=49): 718 ng/ml (IQR: 594-798); male cohort: mME/CFS (n=60): 706 ng/ml (IQR: 544-882) vs. mHC (n=49): 605 ng/ml (IQR: 516-796). **(B)** ELISA-detected sCD26 serum concentrations stratified according to disease onset in whole, female and male ME/CFS cohort depicted as boxplots. sCD26 concentrations in onset-groups were compared using Mann-Whitney-U rank-sum test (\* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ). Whole cohort: inf ME/CFS (n=146): 667 ng/ml (IQR: 427-845) vs. non-inf ME/CFS (n=57): 621 ng/ml (IQR: 450-766); female cohort: inf. fME/CFS (n=105): 603 ng/ml (IQR: 377-786) vs. non-inf fME/CFS (n=39): 634 ng/ml (IQR: 422-779); male cohort: inf mME/CFS (n=41): 740 ng/ml (IQR: 597-980) vs. non-inf mME/CFS (n=18): 608 ng/ml (IQR: 471-728). **(C)** ELISA-detected sCD26 serum concentrations age-stratified in ME/CFS and HC. Young age (n=69) was defined as age  $< 34\%$  percentile ( $< 37a$ ), middle age (n=71) as age  $34\%$  percentile –  $66\%$  percentile (37a-48a) and older age (n=65) as age  $> 66\%$  percentile ( $> 48a$ ) within the cohort of ME/CFS. The same age groups were applied on the HC cohort. sCD26 concentrations were 634 ng/ml (IQR: 411-799) in young age ME/CFS, 640 ng/ml (IQR: 380-843) in middle age ME/CFS and 667 ng/ml (IQR: 474-858) in older age ME/CFS. In young age HC (n=71) sCD26 concentrations were 670 ng/ml (IQR: 572-770), in middle age HC (n= 15) 585 ng/ml (IQR: 503-796) and in older age HC (n=12) 718 ng/ml (IQR: 558-934). Kruskal-Wallis-test to compare groups was not significant ( $p = 0.357$ ). **(D)** ELISA-detected sCD26 serum concentrations age-stratified in female ME/CFS and HC. Age groups were defined in accordance with **Figure 1C**. Thereby sCD26 concentrations were 549 ng/ml (IQR: 347-705) in young age female ME/CFS (n=46), 553 ng/ml (IQR: 348-771) in middle age female ME/CFS (n=50) and 675 ng/ml (IQR: 474-889) in older age female ME/CFS (n=49). In young female HC (n=34) sCD26 concentrations were 680 ng/ml (IQR: 583-747), in middle age female HC (n=7) 789 ng/ml (IQR: 543-910) and in older age female HC (n=8) 789 ng/ml (IQR: 647-934). Kruskal-Wallis-test was significant at  $p = 0.009$ , however, there were no significant differences between subgroups after post-hoc analyses. **(E)** ELISA-detected sCD26 serum concentrations age-stratified in male ME/CFS and HC. Age groups were defined in accordance with **(C)**. Thereby sCD26 concentrations were 695 ng/ml (IQR: 599-861) in young age male ME/CFS (n=23), 803 ng/ml (IQR: 567-1051) in middle age male ME/CFS (n=21) and 635 ng/ml (IQR: 469-727) in older age male ME/CFS (n=16). In young male HC (n=37) sCD26 concentrations were 626 ng/ml (IQR: 534-829), in middle age male HC (n=8) 530 ng/ml (IQR: 488-628) and in older age male HC (n=4) 581 ng/ml (IQR: 507-1813). Kruskal-Wallis-test to compare groups was not significant ( $p = 0.326$ ).

**RESULTS**

**Patient Cohort**

Concentrations of sCD26 were analyzed in 205 patients with ME/CFS and 98 HC. Median age of patients was 43 (IQR: 33-51) years. 71% of the patients were female and an infection-triggered onset of the disease was reported in 72%. Two patients did not provide information concerning disease onset. Median disease onset was 4 (IQR: 2-9) years before reporting to the clinic. HC were younger than ME/CFS patients by a medium of 14 years (29a (IQR: 26-38)) and 50% were women (**Table 1**). This mismatch was considered in analyses.

Several patients reported comorbidities. 43% of patients suffered from allergies, while 34% reported food intolerances and 66% suffered from symptoms of an irritable bowel syndrome (IBS). Hashimoto's thyroiditis was present in 11% of the patients,

fibromyalgia in 10%. 16% of patients suffered from postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS) (for comorbidities see **Supplementary Table S1**).

### sCD26 Concentrations in Patients and HC

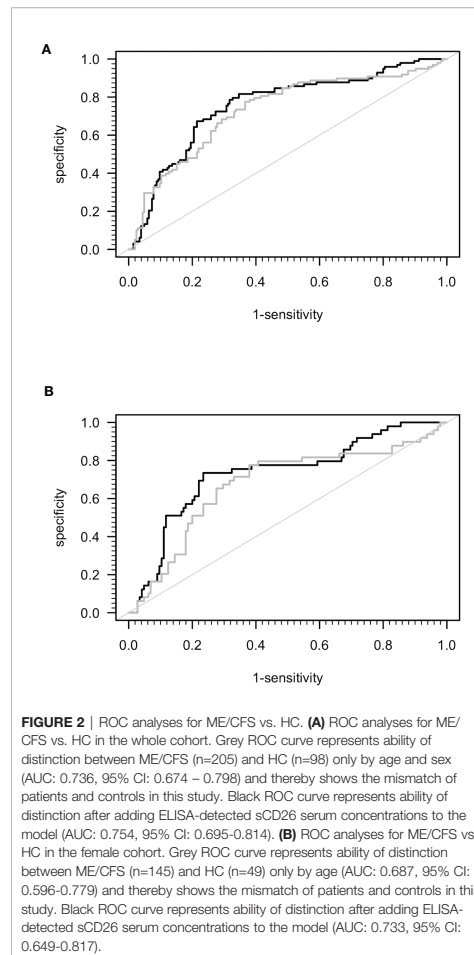
Overall median sCD26 in ME/CFS patients was 648 ng/ml (IQR: 447-814) and not different from HC with 670 ng/ml (IQR: 543-797). When we stratified our cohort into male and female, sCD26 concentrations were significantly lower in female ME/CFS patients as compared to males ( $p = 0.007$ ). No difference between sexes was found in HC. Taking this into regard we performed comparisons with HC separately for each sex. Concentrations of sCD26 were significantly lower in female patients than in female HC ( $p = 0.013$ ), whereas no difference between male patients and HC was found (**Figure 1A**). When stratifying for type of onset sCD26 concentrations were significantly higher in male patients with infection-triggered ME/CFS compared patients without infectious-triggered onset of disease ( $p = 0.035$ ). Soluble CD26 concentrations did not differ between onset subgroups in female patients (**Figure 1B**). No differences in sCD26 concentrations were seen when patients and HC were divided according to three major age groups (**Figure 1C**). When analyzing age groups of ME/CFS and HC within sexes, overall Kruskal-Wallis test was significant ( $p = 0.009$ ) in the female group, but none of the differences between age groups remained significant in post-hoc analyses (**Figure 1D**). No significant differences were found in the male group (Kruskal-Wallis  $p = 0.326$ ; **Figure 1E**).

A previous study suggested that sCD26 is a potential diagnostic biomarker for ME/CFS (23). Taking into consideration the mismatch of age and sex between ME/CFS patients and HC in this study, we performed ROC-analyses (**Figure 2**). The area under ROC curve (AUC) of the model of only sex and age for distinguishing ME/CFS from HC (AUC: 0.736, 95% confidence interval (CI): 0.674 – 0.798) did not improve significantly after adding sCD26 (AUC: 0.754, 95% CI: 0.695-0.814) (**Figure 2A**). A similar result was found when aiming to distinguish female patients from female HC by only age (AUC: 0.687, 95% CI: 0.596-0.779) as well as age and sCD26 (AUC: 0.733, 95% CI: 0.649-0.817) (**Figure 2B**). In this study, sCD26 did thereby not demonstrate sufficient diagnostic value.

### Correlation of sCD26 With Clinical Parameters

In order to evaluate effects and interactions of sCD26, we performed correlation analyses with clinical as well as paraclinical parameters. Since deviation in sCD26 concentrations from HC was only seen in female patients, we focused on this group. Patients were stratified according to infection-triggered or non-infection-triggered onset due to the assumed difference in pathomechanism (**Table 2A** shows the significant correlations, all data is shown in **Supplementary Tables S2A–D**).

In female patients with infection-triggered ME/CFS sCD26 correlated with the severity of immune-associated symptoms ( $r = 0.241$ ;  $p = 0.019$ ) and showed an inverse correlation with heart rate



**FIGURE 2** | ROC analyses for ME/CFS vs. HC. **(A)** ROC analyses for ME/CFS vs. HC in the whole cohort. Grey ROC curve represents ability of distinction between ME/CFS ( $n=205$ ) and HC ( $n=98$ ) only by age and sex (AUC: 0.736, 95% CI: 0.674 – 0.798) and thereby shows the mismatch of patients and controls in this study. Black ROC curve represents ability of distinction after adding ELISA-detected sCD26 serum concentrations to the model (AUC: 0.754, 95% CI: 0.695-0.814). **(B)** ROC analyses for ME/CFS vs. HC in the female cohort. Grey ROC curve represents ability of distinction between ME/CFS ( $n=145$ ) and HC ( $n=49$ ) only by age (AUC: 0.687, 95% CI: 0.596-0.779) and thereby shows the mismatch of patients and controls in this study. Black ROC curve represents ability of distinction after adding ELISA-detected sCD26 serum concentrations to the model (AUC: 0.733, 95% CI: 0.649-0.817).

increase during orthostatic challenge ( $-0.211$ ;  $p = 0.041$ ). In patients without infection-triggered onset lower sCD26 concentrations were associated with POTS ( $p = 0.021$ ). In line with this, sCD26 inversely correlated with heart rate in sitting ( $r = -0.445$ ;  $p = 0.007$ ) and standing posture after 0 ( $-0.566$ ;  $p < 0.001$ ), 2 ( $-0.433$ ;  $p = 0.008$ ), 5 ( $-0.558$ ;  $p < 0.001$ ) and 10 ( $-0.501$ ;  $p = 0.025$ ) minutes of orthostatic challenge.

We did not find sCD26 to correlate with patient's symptoms after adjusting for multiple testing. In patients without infection-triggered onset inverse correlations of sCD26 concentrations with heart rate after 0 and 5 minutes of orthostatic challenge remained significant.

**TABLE 2A** | Parameters significantly correlating with sCD26 in female patients (onset stratified).

Parameter	Female ME/CFS cohort (n=145)		Female patients with infection-triggered onset (n=105)		Female patients without infection-triggered onset (n=39)	
	n	Spearman's r; p	n	Spearman's r; p	n	Spearman's r; p
Laboratory assessment:						
IL1b	120	r: -0.171; p: 0.062	83	r: -0.309; p: 0.005*	37	r: 0.095; p: 0.576
ACE	120	r: 0.218; p: 0.017*	83	r: 0.177; p: 0.109	37	r: 0.302; p: 0.069
Lymphocytes	131	r: -0.218; p: 0.013*	92	r: -0.249; p: 0.017*	38	r: -0.153; p: 0.358
Monocytes	131	r: -0.181; p: 0.039*	92	r: -0.170; p: 0.105	38	r: -0.178; p: 0.285
CD3+ T cells	131	r: -0.214; p: 0.014*	92	r: -0.207; p: 0.048*	38	r: -0.202; p: 0.223
CD4+ T cells	131	r: -0.231; p: 0.008*	92	r: -0.221; p: 0.034*	38	r: -0.268; p: 0.104
CD4+CD8+ T cells	131	r: 0.230; p: 0.008*	92	r: 0.270; p: 0.009*	38	r: 0.127; p: 0.448
HLA-DR/CD8+ T cells	122	r: 0.312; p: <0.001*	85	r: 0.299; p: 0.005*	37	r: 0.297; p: 0.074
CD11a+/CD8+ T cells	120	r: 0.221; p: 0.015*	83	r: 0.179; p: 0.105	37	r: 0.320; p: 0.054
IgA	143	r: -0.112; p: 0.181	103	r: 0.007; p: 0.947	39	r: -0.366; p: 0.022*
LDH	143	r: 0.121; p: 0.149	103	r: 0.228; p: 0.020*	39	r: -0.149; p: 0.364
CK	138	r: 0.268; p: 0.001*	100	r: 0.329; p: 0.001*	38	r: 0.116; p: 0.487
GPT	143	r: 0.197; p: 0.018*	103	r: 0.271; p: 0.006*	39	r: 0.044; p: 0.792
GOT	143	r: 0.112; p: 0.182	103	r: 0.252; p: 0.010*	39	r: -0.223; p: 0.172
GGT	143	r: 0.170; p: 0.042*	103	r: 0.203; p: 0.040*	39	r: 0.041; p: 0.805
Phosphate	136	r: 0.067; p: 0.441	99	r: -0.054; p: 0.597	37	r: 0.353; p: 0.032*
alpha1-AR-AAB	141	r: -0.183; p: 0.030*	102	r: -0.286; p: 0.004*	38	r: 0.023; p: 0.889
M3-mAChR-AAB	144	r: -0.231; p: 0.005*	105	r: -0.303; p: 0.002*	38	r: -0.045; p: 0.787
Schellong examination:						
heart rate seated	132	r: -0.078; p: 0.373	95	r: 0.056; p: 0.589	36	r: -0.445; p: 0.007*
heart rate standing 0min	130	r: -0.200; p: 0.023*	94	r: -0.065; p: 0.535	35	r: -0.566; p: <0.001*
heart rate after 2min	129	r: -0.186; p: 0.035*	92	r: -0.063; p: 0.549	36	r: -0.433; p: 0.008*
heart rate after 5min	128	r: -0.197; p: 0.026*	91	r: -0.023; p: 0.826	36	r: -0.558; p: <0.001*
heart rate after 10min	82	r: -0.161; p: 0.148	62	r: -0.048; p: 0.713	19	r: -0.501; p: 0.025*
changes in heart rate from seated to standing	130	r: -0.231; p: 0.008*	94	r: -0.211; p: 0.041*	35	r: -0.203; p: 0.243
Clinical questionnaires:						
immune score	129	r: 0.141; p: 0.110	94	r: 0.241; p: 0.019*	34	r: -0.051; p: 0.776

\*significant p <0.05.

**TABLE 2B** | Parameters significantly correlating with sCD26 in male patients (onset stratified).

Parameter	Male ME/CFS cohort (n=60)		Male patients with infection-triggered onset (n=41)		Male patients without infection-triggered onset (n=18)	
	n	Spearman's r; p	n	Spearman's r; p	n	Spearman's r; p
Laboratory assessment:						
ACE	47	r: -0.180; p: 0.225	32	r: -0.369; p: 0.038*	14	r: 0.209; p: 0.474
HLA-DR/CD8+ T-cells	50	r: 0.359; p: 0.010*	35	r: 0.377; p: 0.026*	14	r: 0.108; p: 0.713
LDH	58	r: 0.317; p: 0.015*	39	r: 0.369; p: 0.021*	18	r: 0.063; p: 0.804
HbA1c	55	r: 0.142; p: 0.301	37	r: 0.360; p: 0.029*	17	r: 0.065; p: 0.804
GPT	59	r: 0.354; p: 0.006*	40	r: 0.357; p: 0.024*	18	r: 0.327; p: 0.186
GOT	59	r: 0.367; p: 0.004*	40	r: 0.385; p: 0.014*	18	r: 0.265; p: 0.287
GGT	59	r: 0.259; p: 0.047*	40	r: 0.355; p: 0.024*	18	r: 0.044; p: 0.861
Potassium	57	r: -0.232; p: 0.079	39	r: -0.071; p: 0.663	17	r: -0.582; p: 0.014*
Thyroid peroxidase -AAB	35	r: -0.054; p: 0.759	22	r: 0.202; p: 0.368	13	r: -0.657; p: 0.020*
beta1-AR-AAB	59	r: -0.143; p: 0.280	40	r: -0.331; p: 0.037*	18	r: 0.273; p: 0.272
Schellong examination:						
heart rate seated	50	r: 0.314; p: 0.027*	34	r: 0.290; p: 0.096	15	r: 0.185; p: 0.510
heart rate after 5min	49	r: 0.251; p: 0.082	33	r: 0.368; p: 0.035*	15	r: -0.055; p: 0.845
RR (dia) seated	49	r: 0.280; p: 0.051	33	r: 0.348; p: 0.047*	15	r: 0.174; p: 0.536
RR (sys) standing 0min	49	r: 0.288; p: 0.045*	33	r: 0.306; p: 0.083	15	r: 0.267; p: 0.337
RR (dia) standing 0min	49	r: 0.370; p: 0.009*	33	r: 0.352; p: 0.045*	15	r: 0.262; p: 0.346
RR (sys) after 2min	49	r: 0.339; p: 0.017*	33	r: 0.354; p: 0.043*	15	r: 0.252; p: 0.364
RR (dia) after 2min	49	r: 0.445; p: 0.001*	33	r: 0.452; p: 0.008*	15	r: 0.259; p: 0.351
RR (sys) after 5min	49	r: 0.355; p: 0.012*	33	r: 0.406; p: 0.019*	15	r: 0.305; p: 0.269
RR (dia) after 5min	49	r: 0.382; p: 0.007*	33	r: 0.424; p: 0.014*	15	r: 0.282; p: 0.308
RR (sys) after 10min	33	r: 0.430; p: 0.012*	23	r: 0.463; p: 0.026*	9	r: -0.068; p: 0.862
RR (dia) after 10min	33	r: 0.612; p: <0.001*	23	r: 0.570; p: 0.004*	9	r: 0.528; p: 0.144
changes in heart rate from seated to standing	50	r: -0.281; p: 0.048*	34	r: -0.244; p: 0.165	15	r: -0.182; p: 0.515
changes in RR (sys) from seated to standing	49	r: 0.132; p: 0.365	33	r: 0.030; p: 0.868	15	r: 0.529; p: 0.043*
Clinical questionnaires:						
overall disease severity	51	r: -0.335; p: 0.016*	36	r: -0.360; p: 0.031*	14	r: -0.122; p: 0.679

\*significant p <0.05.

**TABLE 2C** | Parameters significantly correlating with sCD26 in the whole ME/CFS cohort (onset stratified).

Parameter	Whole ME/CFS cohort (n=205)		Patients with infection-triggered onset (n=146)		Patients without infection-triggered onset (n=57)	
	n	Spearman's r; p	n	Spearman's r; p	n	Spearman's r; p
Laboratory assessment:						
IL-1b	170	r: -0.182; p: 0.018*	118	r: -0.297; p: 0.001*	51	r: 0.107; p: 0.454
Ferritin	203	r: 0.144; p: 0.041*	144	r: 0.229; p: 0.006*	57	r: -0.056; p: 0.680
ACE	167	r: 0.121; p: 0.119	115	r: 0.041; p: 0.660	51	r: 0.307; p: 0.028*
lymphocytes	183	r: -0.168; p: 0.023*	129	r: -0.221; p: 0.012*	52	r: -0.065; p: 0.647
CD19+ B cells	182	r: 0.001; p: 0.986	129	r: -0.090; p: 0.312	52	r: 0.301; p: 0.030*
CD3+ T cells	183	r: -0.180; p: 0.015*	129	r: -0.215; p: 0.004*	52	r: -0.104; p: 0.464
CD4+ T cells	183	r: -0.207; p: 0.005*	129	r: -0.227; p: 0.010*	52	r: -0.196; p: 0.164
CD4+CD8+ T cells	183	r: 0.153; p: 0.039*	129	r: 0.139; p: 0.116	52	r: 0.208; p: 0.139
HLA-DR/CD8+ T-cells	172	r: 0.316; p: <0.001*	120	r: 0.345; p: <0.001*	51	r: 0.244; p: 0.085
IgA	203	r: <0.001; p: 0.996	144	r: 0.138; p: 0.098	57	r: -0.285; p: 0.032*
IgM	203	r: -0.093; p: 0.186	144	r: -0.179; p: 0.031*	57	r: 0.145; p: 0.282
LDH	201	r: 0.173; p: 0.014*	142	r: 0.272; p: 0.001*	57	r: -0.088; p: 0.510
CK	195	r: 0.258; p: <0.001*	139	r: 0.353; p: <0.001*	55	r: 0.051; p: 0.712
HbA1c	189	r: 0.114; p: 0.120	133	r: 0.183; p: 0.035*	55	r: -0.010; p: 0.943
GPT	202	r: 0.273; p: <0.001*	143	r: 0.349; p: <0.001*	57	r: 0.109; p: 0.418
GOT	202	r: 0.221; p: 0.002*	143	r: 0.336; p: <0.001*	57	r: -0.037; p: 0.787
GGT	202	r: 0.262; p: <0.001*	143	r: 0.326; p: <0.001*	57	r: 0.061; p: 0.650
Albumin	189	r: 0.121; p: 0.096	133	r: 0.197; p: 0.023*	55	r: -0.155; p: 0.259
Creatinine	205	r: 0.247; p: <0.001*	146	r: 0.252; p: 0.002*	57	r: 0.228; p: 0.089
Phosphate	193	r: -0.003; p: 0.968	138	r: -0.116; p: 0.175	54	r: 0.321; p: 0.018*
ft3	103	r: 0.206; p: 0.037*	68	r: 0.275; p: 0.023*	33	r: 0.007; p: 0.958
alpha1-AR-AAB	200	r: -0.172; p: 0.015*	142	r: -0.270; p: 0.001*	56	r: 0.067; p: 0.624
beta1-AR-AAB	202	r: -0.155; p: 0.027*	143	r: -0.201; p: 0.016*	57	r: 0.015; p: 0.913
beta2-AR-AAB	204	r: -0.111; p: 0.113	145	r: -0.198; p: 0.017*	57	r: 0.156; p: 0.245
M3-mAChR-AAB	203	r: -0.210; p: 0.003*	145	r: -0.304; p: <0.001*	56	r: 0.021; p: 0.879
Schellong examination:						
heart rate seated	182	r: -0.030; p: 0.685	129	r: 0.066; p: 0.459	51	r: -0.291; p: 0.038*
heart rate standing 0min	180	r: -0.148; p: 0.048*	128	r: -0.041; p: 0.646	50	r: -0.438; p: 0.001*
heart rate after 2min	179	r: -0.103; p: 0.171	126	r: 0.001; p: 0.993	51	r: -0.366; p: 0.008*
heart rate after 5min	177	r: -0.106; p: 0.162	124	r: 0.053; p: 0.559	51	r: -0.450; p: 0.001*
heart rate after 10min	115	r: -0.126; p: 0.181	85	r: -0.015; p: 0.894	29	r: -0.420; p: 0.023*
RR (sys) seated	180	r: 0.159; p: 0.034*	127	r: 0.204; p: 0.022*	51	r: 0.052; p: 0.717
RR (sys) standing 0min	178	r: 0.185; p: 0.014*	126	r: 0.209; p: 0.019*	50	r: 0.181; p: 0.208
RR (sys) after 2min	176	r: 0.210; p: 0.005*	123	r: 0.272; p: 0.002*	51	r: 0.091; p: 0.525
RR (sys) after 5min	177	r: 0.225; p: 0.003*	124	r: 0.282; p: 0.002*	51	r: 0.119; p: 0.404
RR (dia) after 5min	177	r: 0.189; p: 0.012*	124	r: 0.245; p: 0.006*	51	r: 0.059; p: 0.679
changes in heart rate from seated to standing	180	r: -0.226; p: 0.002*	128	r: -0.203; p: 0.022*	50	r: -0.256; p: 0.073
changes in RR (sys) from seated to standing	178	r: 0.073; p: 0.333	126	r: -0.009; p: 0.920	50	r: 0.289; p: 0.042*
Clinical questionnaires:						
immune score	187	r: 0.115; p: 0.116	133	r: 0.197; p: 0.023*	52	r: -0.022; p: 0.878

\*significant p <0.05.

### Correlation of sCD26 With Immunological and Laboratory Parameters

Several correlations with immunological laboratory parameters were found in female infection-triggered ME/CFS. Soluble CD26 correlated with the percentage of CD8+ T cells expressing activation marker HLA-DR+ (r: 0.299; p: 0.005) and the number of CD4+CD8+ T cells (r: 0.270; p: 0.009), while inversely correlating with lymphocytes (r: -0.249; p: 0.017), CD3+ (r: -0.207; p: 0.048) and CD4+ (r: -0.221; p: 0.034) T cells and LPS-stimulated IL-1b (r: -0.309; p: 0.005). Furthermore, sCD26 correlated with levels of the enzymes lactate dehydrogenase (LDH) (r: 0.228; p: 0.020), creatin kinase (CK) (r: 0.329; p: 0.001), Glutamate-Pyruvate-Transaminase (GPT)/ Alanine aminotransferase (ALT) (r: 0.271; p: 0.006), Glutamate-

Oxaloacid-Transaminase (GOT)/Aspartate aminotransferase (AST) (r: 0.252; p: 0.010) and Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) (r: 0.203; p: 0.040). An inverse correlation was seen between sCD26 and levels of AAB against alpha1-AR (r: -0.286; p: 0.004) and M3-mAChR (r: -0.303; p: 0.002) (Table 2A).

In contrast, in patients without infection-triggered onset none of the above-mentioned correlations were seen and Spearman's r even suggested an inverse relationship for some parameters. Soluble CD26 correlated only with phosphate (r: 0.353; p: 0.032) and inversely with Immunoglobulin A (IgA) levels (-0.366; p: 0.022) in this subgroup.

After applying BY-correction none of the correlations with laboratory parameters stayed significant. Interestingly, we

**TABLE 3** | Parameters significantly correlating with sCD26 in the whole ME/CFS cohort after BY-correction (onset stratified).

Parameter	Whole ME/CFS cohort (n=205)		Patients with infection-triggered onset (n=146)		Patients without infection-triggered onset (n=57)	
	n	Spearman's r; BY-corrected p	n	Spearman's r; BY-corrected p	n	Spearman's r; BY-corrected p
Laboratory assessment:						
IL-1b	170	r: -0.182; p: 0.396	118	r: -0.297; p: 0.035*	51	r: 0.107; p: >0.999
HLA-DR/CD8+ T-cells	172	r: 0.316; p: 0.007*	120	r: 0.345; p: 0.006*	51	r: 0.244; p: >0.999
LDH	201	r: 0.173; p: 0.366	142	r: 0.272; p: 0.035*	57	r: -0.088; p: >0.999
CK	195	r: 0.258; p: 0.019*	139	r: 0.353; p: 0.003*	55	r: 0.051; p: >0.999
GPT	202	r: 0.273; p: 0.012*	143	r: 0.349; p: 0.003*	57	r: 0.109; p: >0.999
GOT	202	r: 0.221; p: 0.072	143	r: 0.336; p: 0.004*	57	r: -0.037; p: >0.999
GGT	202	r: 0.262; p: 0.015*	143	r: 0.326; p: 0.005*	57	r: 0.061; p: >0.999
Creatinine	205	r: 0.247; p: 0.019*	146	r: 0.252; p: 0.059	57	r: 0.228; p: >0.999
alpha1-AR-AAB	200	r: -0.172; p: 0.366	142	r: -0.270; p: 0.035*	56	r: 0.067; p: >0.999
M3-mAChR-AAB	203	r: -0.210; p: 0.100	145	r: -0.304; p: 0.009*	56	r: 0.021; p: >0.999
Schellong examination:						
heart rate standing 0min	180	r: -0.148; p: 0.428	128	r: -0.041; p: >0.999	50	r: -0.438; p: 0.046*
heart rate after 5min	177	r: -0.106; p: 0.875	124	r: 0.053; p: >0.999	51	r: -0.450; p: 0.046*

\* significant p <0.05; all p-values BY-corrected.

observed similar correlation patterns in male patients (Table 2B, all data shown in Supplementary Tables S3A–D) as well as the whole ME/CFS cohort (Table 2C, all data shown in Supplementary Tables S4A–C). This particularly applies to inverse r-values for correlations between sCD26 and AAB. In the whole ME/CFS cohort most correlations with sCD26 stayed significant after BY-correction likely due to higher numbers (Table 3).

Significant correlations between sCD26 and laboratory parameters and their intercorrelations were visualized in a network graph (Figure 3). In patients with infection-triggered onset we observed strong intercorrelations between markers of organ function and damage GPT, GOT, GGT, LDH and CK as well as AAB. Further, analyses revealed inverse correlations of HLA-DR+ expressing CD8+ T cells and LDH with alpha1-AR-AAB. CK correlated inversely with IL-1b.

### Regression Analyses for sCD26

Based on significant correlations after BY-correction (Table 3) we performed a multiple regression analysis for sCD26 in order to quantify the strength of the associations. Since correlation analyses showed considerable differences between onset groups, we focused on patients with infection-triggered ME/CFS. Sex and age were included as possible confounders. The model was significant (p: <0.001) with an adjusted R<sup>2</sup> of 0.325. Bi-directional stepwise regression resulted in the best fitting model (adjusted R<sup>2</sup>: 0.344; p: <0.001) consisting of the parameters shown in Table 4. In Figure 4 predicted log (sCD26) values are plotted against real ones (consult Supplementary Figures S1A–C) for additional diagnostic plots concerning this linear regression analysis).

### CD26 Expression on Immune Cells

In a cohort of HC (n: 12) and ME/CFS (n: 12) patients we analyzed immune cells for their CD26 surface expression. Median age of ME/CFS patients analyzed was 53 years (IQR: 33–57), median age of HC 34 years (IQR: 29–42). All subjects

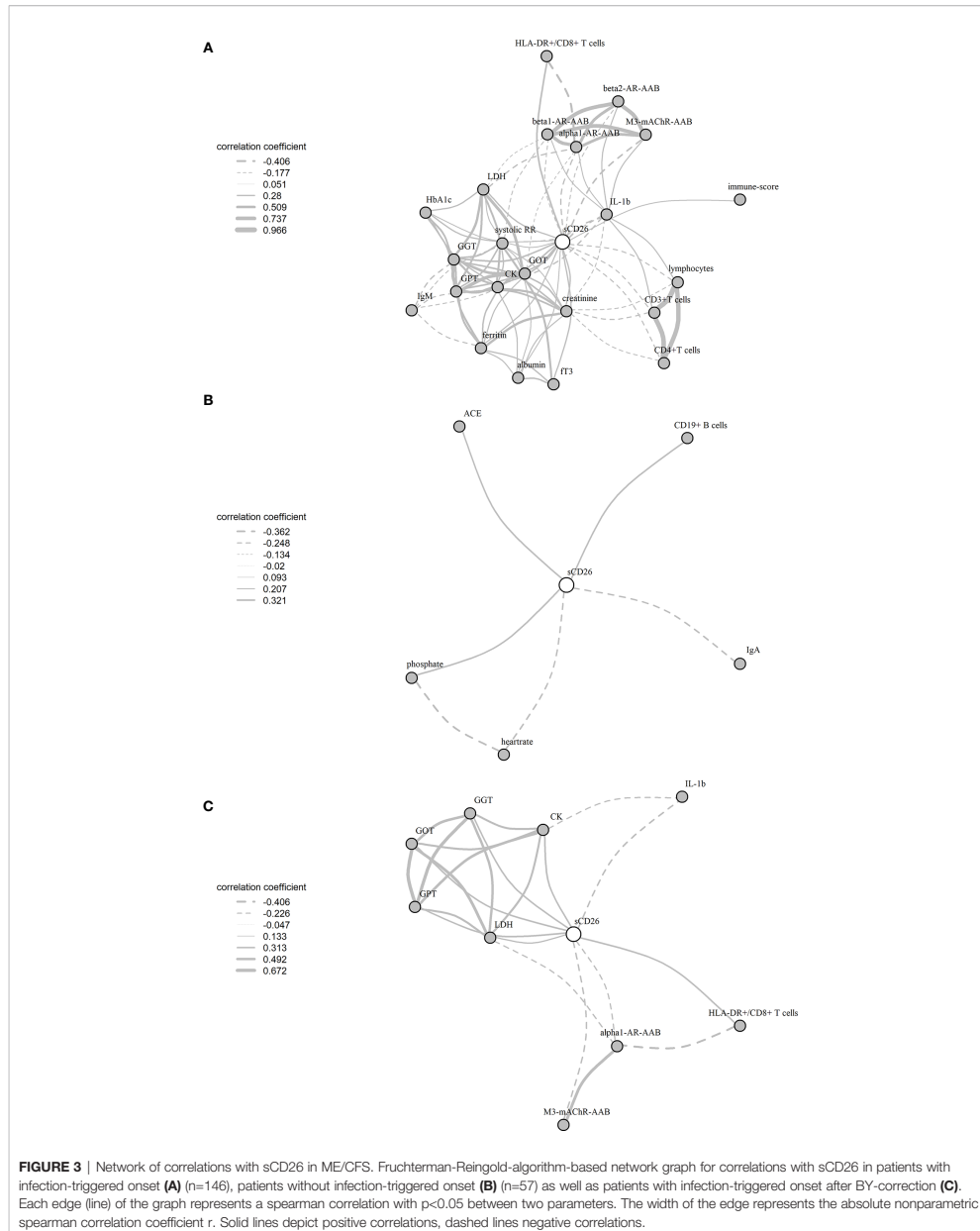
analyzed were female. We observed significantly increased frequencies of CD26 expressing CD4+ T cells (p: 0.018), but no difference in the expression level of CD26 (Median Fluorescence Intensity (MFI)) per cell (Figure 5, gating strategy in Supplementary Figure S2).

## DISCUSSION

In this study we re-validated sCD26 in the context of ME/CFS. Though we could not confirm its diagnostic suitability, results from correlation analyses provide some striking pathomechanistic insights.

Our study is partially in accordance with a previous study comparing 73 patients with ME/CFS with 122 HC showing diminished concentrations of sCD26 (23). We found lower concentrations of sCD26 only in female ME/CFS patients as compared to female HC. ROC analysis in our study could not replicate diagnostic suitability of sCD26. Further, in line with our findings of increased frequencies of CD26 expressing CD4+ T cells, Fletcher *et al* found an elevated number of T and NK cells expressing CD26 in ME/CFS. The CD26 expression level per cell was not enhanced in ME/CFS in our study and Fletcher *et al* even found a decrease in CD26 expression level on T cells and NK cells. The underlying mechanism of reduced sCD26 in various autoimmune diseases is still not resolved. A recent study showed that sCD26/DPP-4 is stored in T cells in secretory granules together with granzymes and perforin. Upon stimulation degranulation leads to a massive release of proteolytically active sCD26/DPP-4 (16). In line with this, serum concentration of sCD26 were shown to depend on the activation state of T cells (15).

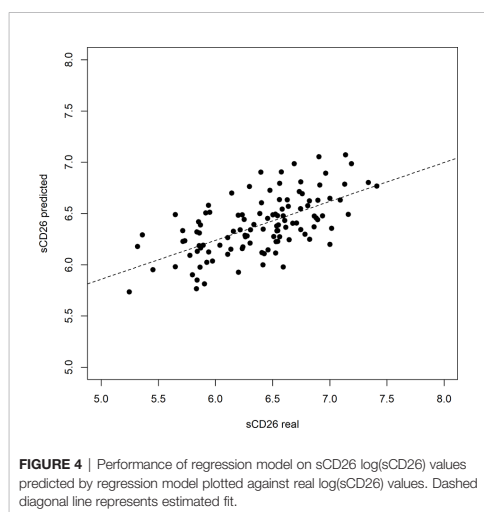
Further, we found higher levels of sCD26 in male patients with postinfectious onset compared to noninfectious onset. In a previous study, Porter *et al* provided evidence for a different regulation of CD26 among onset subsets as they found higher





**TABLE 4** | Model-coefficients after stepwise multiple regression on sCD26 in infection-triggered ME/CFS.

	Estimate	Standard Error	t value	p
(Intercept)	6.569	0.572	11.484	<0.001*
GPT	0.246	0.089	2.757	0.007*
GGT	0.123	0.081	1.511	0.134
HLA-DR+/CD8+ T cells	0.221	0.047	4.757	<0.001*
M3-mAChR-AAB	-0.166	0.084	-1.977	0.051
IL-1b	-0.120	0.052	-2.295	0.024*
age	-0.251	0.123	-2.040	0.044*

\*significant  $p < 0.05$ .

numbers of CD26+CD4+ T cells in postviral vs. non-viral onset ME/CFS patients (24). As we analyzed CD26 expression only in a small subgroup we could not compare subgroups.

When performing correlation analyses, we observed that concentrations of sCD26 are associated with immunological and cardiovascular parameters as well as liver enzymes and CK in ME/CFS. Remarkably, most associations were only observed in patients with infection-triggered disease. Of the correlations that stayed significant after BY-correction, one of the most striking findings of our study is the inverse correlation of alpha1-AR- and M3-mAChR-AAB with sCD26 in infection-triggered ME/CFS, but not in patients with non-infection-triggered onset. We and others found elevated beta1/2-AR- and M3-mAChR-AAB in a subset of ME/CFS patients (6). Higher levels of autoantibodies to alpha1-AR and M3-mAChR were found in patients with both orthostatic hypotension and POTS, too (32, 33). In our study we observed an inverse correlation between alpha1-AR-AAB and percentage of HLA-DR+CD8+ T-cells. It was shown that T cells also express

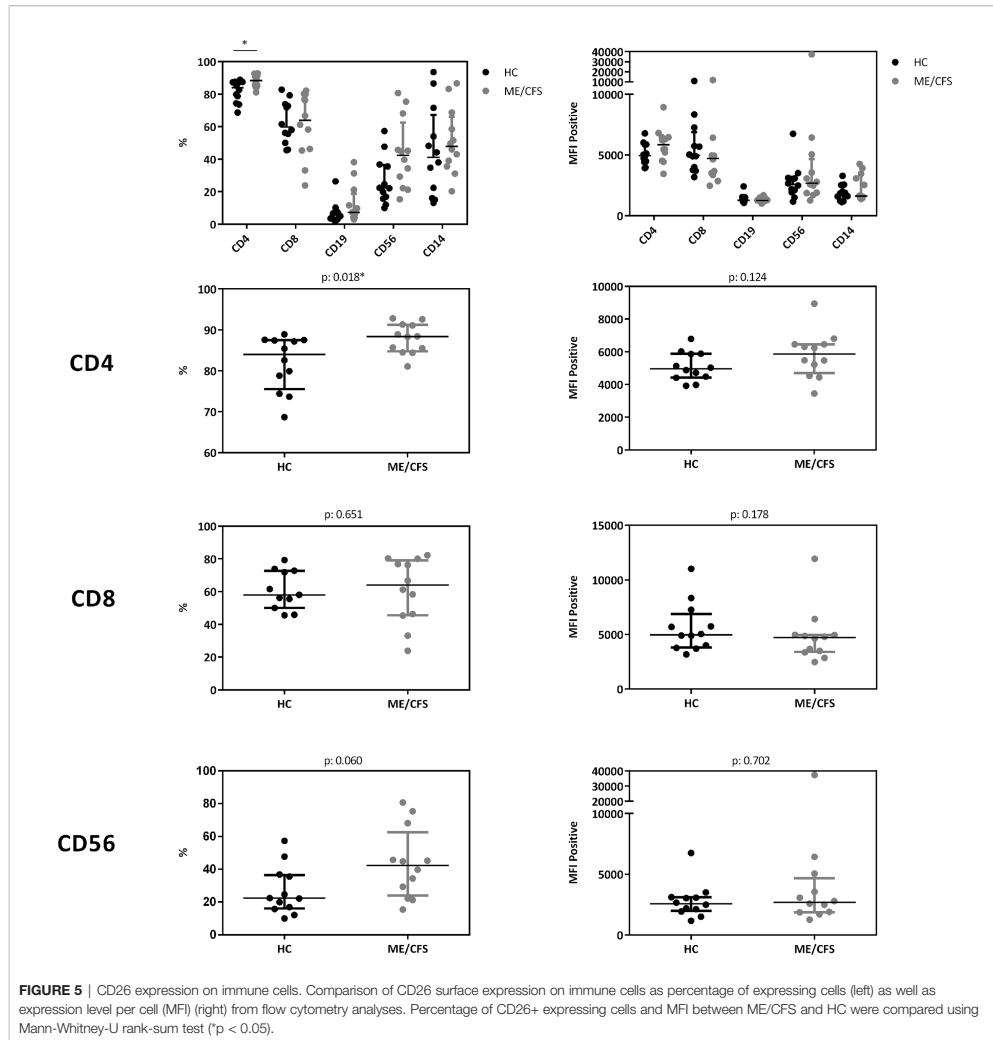
alpha1-AR which mediates inhibition of T cell proliferation (34). Thus, it is tempting to speculate that higher alpha1-AR-AAB are associated with inhibition of activation of T cells although it is not known if alpha1-AR-AAB can activate the receptor. In line with the finding that activated T cells are a major source of sCD26 (15, 16) it is plausible that lower percentages of HLA-DR+ in CD8+ T-cells are directly associated with lower sCD26.

IL-1 release was found to be associated inversely with sCD26. A direct enzymatic degradation of IL-1 by sCD26 remains controversial (35). We could observe in a recent study beta2-AR-AAB to inhibit LPS-induced tumor necrosis factor (TNF) release, and their inhibitory function was impaired in ME/CFS with higher beta2-AR-AAB (36). This may be an explanation for an association of beta2-AR-AAB with IL-1 release observed before BY-correction in patients with infection-triggered onset. However, we found no correlation of sCD26 with TNF release, which may be related to the fact that these cytokines are differentially regulated in monocytes and macrophages.

Further, we found a strong association of GOT, GPT and GGT with sCD26 in line with the well-known association of DPP-4 with liver and adipose tissue inflammation and its expression on bile ducts (37–40). As CD26 plays an important role in blood glucose level regulation by cleaving Glucagon-like-peptide 1 (GLP-1) (41), CD26/DPP-4 inhibitors are widely used in the treatment of diabetes mellitus (42). In line with our findings, DPP-4 inhibitors improve liver dysfunction in type 2 diabetes mellitus (43). Correlations between sCD26 and CK match reports of sCD26 being shed from muscles as a myokine (44). In line with findings by Nacul *et al.* low sCD26 levels in ME/CFS might to some extent be linked to physical inactivity and impaired muscle energy metabolism associated with PEM (45). A correlation of sCD26 with LDH could be explained through its release by liver cells as well as the above discussed reduction of oxidative stress observed as a result of DPP-4 inhibition.

We observed correlations of sCD26 concentrations with blood pressure in patients with infection-triggered onset, which, however, did not remain after BY-correction. Remarkably, in patients with non-infection-triggered onset the inverse correlation of sCD26 with heart rate upon orthostatic challenge remained. Patients from this group who suffered from POTS had significantly lower sCD26 concentrations, too. Low blood volume has been described in POTS and linked to disturbance in renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) (46, 47). We found a correlation of sCD26 with ACE in this group before BY-correction. The observed associations in this group may point to an impaired orthostatic regulation enhancing preexisting disturbances caused by POTS.

As 95% of the serum DPP-4 activity originates from sCD26 we tried to provide a mechanistic explanation of the association of sCD26 with immunological, cardiovascular and liver parameters in patients based on the known effect of DPP-4 inhibition observed in various studies (14). A hypothesized model of the regulation and role of sCD26 in patients with ME/CFS is depicted in the **Supplementary Figure S3**.



**FIGURE 5** | CD26 expression on immune cells. Comparison of CD26 surface expression on immune cells as percentage of expressing cells (left) as well as expression level per cell (MFI) (right) from flow cytometry analyses. Percentage of CD26+ expressing cells and MFI between ME/CFS and HC were compared using Mann-Whitney-U rank-sum test (\* $p < 0.05$ ).

**LIMITATIONS AND STRENGTHS**

Our study has several limitations. The ME/CFS cohort and the HC group were not well matched for age and sex, but this was considered in our analyses. Many associations we discuss are based on the effect of DPP-4 inhibitors. We did not analyze the DPP-4 activity of sCD26. However, Durinx *et al.* showed, that serum dipeptidyl peptidase activity originates mostly from sCD26 (14). In SLE concentrations of sCD26 closely correlated with

DPP-4 activity (48). Further, we do not know the contribution of cellular CD26 to the overall DPP-4 activity. Our concept has to be considered hypothetical and needs confirmation in further patient cohorts and experimental studies.

The strength of our study is that we provide evidence that the key enzyme sCD26 is linked to immunological and cardiovascular disturbances in ME/CFS. The associations of sCD26 with autoantibodies provide further evidence for the autoimmune pathomechanism of infection-triggered ME/CFS

and the delineation of ME/CFS subgroups (12). These findings may help to elucidate heterogeneity of patient's symptoms and biomarkers found in most studies on ME/CFS (49).

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics Committee of Charité Universitätsmedizin Berlin (EA2/038/14 and EA2/067/20). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MS, HF, FS, and JH performed the research. MS, SL, and NS participated in data analysis. CK, PG, KW, and LH contributed with patient material. CS designed the research project. MS and CS wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was supported by a grant from the Weidenhammer-Zöbele Foundation. MS received a scholarship from the Lost Voices Foundation. We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and the Open Access Publication Fund of Charité-Universitätsmedizin Berlin.

## REFERENCES

- Carruthers BM, Jain AK, De Meirleir KL, Peterson DL, Klimas NG, Lerner AM, et al. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *J Chronic Fatigue Syndr* (2003) 11(1):7–115. doi: 10.1300/J092v11n01\_02
- Valdez AR, Hancock EE, Adebayo S, Kiernicki DJ, Proskauer D, Attewell JR, et al. Estimating Prevalence, Demographics, and Costs of ME/CFS Using Large Scale Medical Claims Data and Machine Learning. *Front Pediatr* (2018) 6:412. doi: 10.3389/fped.2018.00412
- Sotzny F, Blanco J, Capelli E, Castro-Marrero J, Steiner S, Murovska M, et al. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome - Evidence for an autoimmune disease. *Autoimmun Rev* (2018) 17(6):601–9. doi: 10.1016/j.jautrev.2018.01.009
- Chu L, Valencia IJ, Garvert DW, Montoya JG. Onset Patterns and Course of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Front Pediatr* (2019) 7:12. doi: 10.3389/fped.2019.00012
- Rasa S, Nora-Krukke Z, Henning N, Eliassen E, Shikova E, Harrer T, et al. Chronic viral infections in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue

## ACKNOWLEDGMENTS

The support in patient care and data management by Silvia Thiel is acknowledged. Further, we thank all patients who trustfully donated the blood samples and agreed to participate in this research project.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.644548/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure S1(A), S1(B), S1(C)** | Residual plot, Q-Q plot and Cook's distance for multiple regression.

**Supplementary Figure S2** | MFI-gating strategy.

**Supplementary Figure S3** | Hypothesized model of the regulation and role of sCD26 in ME/CFS.

**Supplementary Table S1** | Characteristics and co-morbidities.

**Supplementary Table S2(A-D)** | Correlations of sCD26 with cohort characteristics, laboratory assessments, Schellong examination results and clinical questionnaire outcome in female patients.

**Supplementary Table S3(A-D)** | Correlations of sCD26 with cohort characteristics, laboratory assessments, Schellong examination results and clinical questionnaire outcome in male patients.

**Supplementary Table S4(A-C)** | Correlations of sCD26 with laboratory assessments, Schellong examination results and clinical questionnaire outcome in all patients.

**Supplementary Data Sheet 1** | Assessment of ME/CFS patients (age, sex, comorbidities, sCD26 concentrations, laboratory and symptom assessment, results from orthostatic challenge).

**Supplementary Data Sheet 2** | Assessment of HC (age, sex, sCD26 concentrations).

**Supplementary Data Sheet 3** | Assessment of sCD26 expression on immune cells in ME/CFS and HC (percentages of CD26 expressing cells, MFI).

syndrome (ME/CFS). *J Transl Med* (2018) 16(1):268. doi: 10.1186/s12967-018-1644-y

- Loebel M, Grabowski P, Heidecke H, Bauer S, Hanitsch LG, Wittke K, et al. Antibodies to beta adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Brain Behav Immun* (2016) 52:32–9. doi: 10.1016/j.bbi.2015.09.013
- Fujii H, Sato W, Kimura Y, Matsuda H, Ota M, Maikusa N, et al. Altered Structural Brain Networks Related to Adrenergic/Muscarinic Receptor Autoantibodies in Chronic Fatigue Syndrome. *J Neuroimaging* (2020) 30(6):822–7. doi: 10.1111/jon.12751
- Bynke A, Julin P, Gottfries CG, Heidecke H, Scheibenbogen C, Bergquist J. Autoantibodies to beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in Myalgic Encephalomyelitis (ME) patients – A validation study in plasma and cerebrospinal fluid from two Swedish cohorts. *Brain Behav Immun - Health* (2020) 7:100107. doi: 10.1016/j.bbih.2020.100107
- Cabral-Marques O, Marques A, Gill LM, De Vito R, Rademacher J, Gunther J, et al. GPCR-specific autoantibody signatures are associated with physiological and pathological immune homeostasis. *Nat Commun* (2018) 9(1):5224. doi: 10.1038/s41467-018-07598-9

10. Castro-Marrero J, Faro M, Aliste L, Saez-Francas N, Calvo N, Martinez-Martinez A, et al. Comorbidity in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Psychosomatics* (2017) 58(5):533–43. doi: 10.1016/j.psych.2017.04.010
11. Tsai SY, Chen HJ, Lio CF, Kuo CF, Kao AC, Wang WS, et al. Increased risk of chronic fatigue syndrome in patients with inflammatory bowel disease: a population-based retrospective cohort study. *J Transl Med* (2019) 17(1):55. doi: 10.1186/s12967-019-1797-3
12. Steiner S, Becker SC, Hartwig J, Sotzny F, Lorenz S, Bauer S, et al. Autoimmunity-Related Risk Variants in PTPN22 and CTLA4 Are Associated With ME/CFS With Infectious Onset. *Front Immunol* (2020) 11:578. doi: 10.3389/fimmu.2020.00578
13. VanElzakker MB, Brumfield SA, Lara Mejia PS. Neuroinflammation and Cytokines in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS): A Critical Review of Research Methods. *Front Neurol* (2018) 9:1033. doi: 10.3389/fneur.2018.01033
14. Durinx C, Lambier AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A, et al. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem* (2000) 267(17):5608–13. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01634.x
15. Casrouge A, Sauer AV, Barreira da Silva R, Tejera-Alhambra M, Sanchez-Ramon S, Icare B, et al. Lymphocytes are a major source of circulating soluble dipeptidyl peptidase 4. *Clin Exp Immunol* (2018) 194(2):166–79. doi: 10.1111/cei.13163
16. Lettau M, Dietz M, Vollmers S, Armbrust F, Peters C, Dang TM, et al. Degranulation of human cytotoxic lymphocytes is a major source of proteolytically active soluble CD26/DPP4. *Cell Mol Life Sci* (2019) 77(4):751–64. doi: 10.1007/s00018-019-03207-0
17. Tanaka T, Duke-Cohan JS, Kameoka J, Yaron A, Lee I, Schlossman SF, et al. Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1994) 91(8):3082–6. doi: 10.1073/pnas.91.8.3082
18. Ohnuma K, Uchiyama M, Yamochi T, Nishibashi K, Hosono O, Takahashi N, et al. Caveolin-1 triggers T-cell activation via CD26 in association with CARMA1. *J Biol Chem* (2007) 282(13):10117–31. doi: 10.1074/jbc.M609157200
19. Kitagawa N, Hamaguchi M, Majima S, Fukuda T, Kimura T, Hashimoto Y, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors have adverse effects for the proliferation of human T cells. *J Clin Biochem Nutr* (2018) 63(2):106–12. doi: 10.3164/jcbn.17-64
20. Cordero OJ, Salgado FJ, Mera-Varela A, Nogueira M. Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* (2001) 21(2):69–74. doi: 10.1007/s002960100134
21. Hildebrandt M, Rose M, Ruter J, Salama A, Monnikes H, Klapp BF, et al. (DP IV, CD26) in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* (2001) 36(10):1067–72. doi: 10.1080/003655201750422675
22. Schonermarck U, Csernok E, Trabandt A, Hansen H, Gross WL. Circulating cytokines and soluble CD23, CD26 and CD30 in ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatol* (2000) 18(4):457–63.
23. Fletcher MA, Zeng XR, Maher K, Levis S, Hurwitz B, Antoni M, et al. Biomarkers in chronic fatigue syndrome: evaluation of natural killer cell function and dipeptidyl peptidase IV/CD26. *PLoS One* (2010) 5(5):e10817. doi: 10.1371/journal.pone.0010817
24. Porter N, Lerch A, Jason LA, Sorenson M, Fletcher MA, Herrington J. A Comparison of Immune Functionality in Viral versus Non-Viral CFS Subtypes. *J Behav Neurosci Res* (2010) 8(2):1–8.
25. Fenouillet E, Vigouroux A, Steinberg JG, Chagvardieff A, Retornaz F, Guieu R, et al. Association of biomarkers with health-related quality of life and history of stressors in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients. *J Transl Med* (2016) 14:251. doi: 10.1186/s12967-016-1010-x
26. Fluge O, Risa K, Lunde S, Alme K, Rekeland IG, Sapkota D, et al. B-Lymphocyte Depletion in Myalgic Encephalopathy/Chronic Fatigue Syndrome: An Open-Label Phase II Study with Rituximab Maintenance Treatment. *PLoS One* (2015) 10(7):e0129898. doi: 10.1371/journal.pone.0129898
27. Sletten DM, Suarez GA, Low PA, Mandrekar J, Singer W. COMPASS 31: a refined and abbreviated Composite Autonomic Symptom Score. *Mayo Clin Proc* (2012) 87(12):1196–201. doi: 10.1016/j.mayocp.2012.10.013
28. Bell DS. *The Doctor's Guide to Chronic Fatigue Syndrome: Understanding, Treating and Living with CFIDS*. Boston: Da Capo Lifelong Books (1995).
29. Cella M, Chalder T. Measuring fatigue in clinical and community settings. *J Psychosom Res* (2010) 69(1):17–22. doi: 10.1016/j.jpsychores.2009.10.007
30. Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care* (1992) 30(6):473–83. doi: 10.1097/00005650-199206000-00002
31. Csardi GN T. The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Syst* (2006) 1695(5):1–9. Complex Systems.
32. Yu X, Stavakis S, Hill MA, Huang S, Reim S, Li H, et al. Autoantibody activation of beta-adrenergic and muscarinic receptors contributes to an "autoimmune" orthostatic hypotension. *J Am Soc Hypertens* (2012) 6(1):40–7. doi: 10.1016/j.jash.2011.10.003
33. Gunning WT, Kvale H, Kramer PM, Karabin BL, Grubb BP. Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome Is Associated With Elevated G-Protein Coupled Receptor Autoantibodies. *J Am Heart Assoc* (2019) 8(18):e013602. doi: 10.1161/JAHA.119.013602
34. Grisanti LA, Perez DM, Porter JE. Modulation of immune cell function by alpha(1)-adrenergic receptor activation. *Curr Top Membr* (2011) 67:113–38. doi: 10.1016/B978-0-12-384921-2.00006-9
35. Hoffmann T, Faust J, Neubert K, Ansorge S. Dipeptidyl peptidase IV. (CD 26) and aminopeptidase N (CD 13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS Lett* (1993) 336(1):61–4. doi: 10.1016/0014-5793(93)81609-4
36. Hartwig J, Sotzny F, Bauer S, Heidecke H, Riemekasten G, Dragun D, et al. Research article IgG stimulated  $\beta$ 2 adrenergic receptor activation is attenuated in patients with ME/CFS. *Brain Behav Immun - Health* (2020) 3:100047. doi: 10.1016/j.bbhih.2020.100047
37. Varin EM, Mulvihill EE, Beaudry JL, Pujadas G, Fuchs S, Tanti JF, et al. Circulating Levels of Soluble Dipeptidyl Peptidase-4 Are Dissociated from Inflammation and Induced by Enzymatic DPP4 Inhibition. *Cell Metab* (2019) 29(2):320–34 e5. doi: 10.1016/j.cmet.2018.10.001
38. Ghorpade DS, Ozcan L, Zheng Z, Nicoloso SM, Shen Y, Chen E, et al. Hepatocyte-secreted DPP4 in obesity promotes adipose inflammation and insulin resistance. *Nature* (2018) 555(7698):673–7. doi: 10.1038/nature26138
39. Hino M, Nagatsu T, Kakumu S, Okuyama S, Yoshii Y, Nagatsu I. Glycylprolyl beta-naphthylamidase activity in human serum. *Clin Chim Acta* (1975) 62(1):5–11. doi: 10.1016/0009-8981(75)90273-9
40. McCaughan GW, Wickson JE, Creswick PF, Gorrell MD. Identification of the bile canalicular cell surface molecule GP110 as the ectopeptidase dipeptidyl peptidase IV: an analysis by tissue distribution, purification and N-terminal amino acid sequence. *Hepatology* (1990) 11(4):534–44. doi: 10.1002/hep.1840110403
41. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* (1993) 214(3):829–35. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17986.x
42. Richter B, Bandeira-Echtler E, Bergerhoff K, Lerch C. Emerging role of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag* (2008) 4(4):753–68. doi: 10.2147/vhrm.s1707
43. Kanazawa I, Tanaka K, Sugimoto T. DPP-4 inhibitors improve liver dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Monit* (2014) 20:1662–7. doi: 10.12659/MSM.890989
44. Raschke S, Eckardt K, Bjorklund Holven K, Jensen J, Eckel J. Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells. *PLoS One* (2013) 8(4):e62008. doi: 10.1371/journal.pone.0062008
45. Nacul L, de Barros B, Kingdon CC, Cliff JM, Clark TG, Mudie K, et al. Evidence of Clinical Pathology Abnormalities in People with Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS) from an Analytic Cross-Sectional Study. *Diagn (Basel)* (2019) 9(2):41. doi: 10.3390/diagnostics9020041

46. Fu Q, Vangundy TB, Galbreath MM, Shibata S, Jain M, Hastings JL, et al. Cardiac origins of the postural orthostatic tachycardia syndrome. *J Am Coll Cardiol* (2010) 55(25):2858–68. doi: 10.1016/j.jacc.2010.02.043
47. Raj SR, Biaggioni I, Yamhure PC, Black BK, Paranjape SY, Byrne DW, et al. Renin-aldosterone paradox and perturbed blood volume regulation underlying postural tachycardia syndrome. *Circulation* (2005) 111(13):1574–82. doi: 10.1161/01.CIR.0000160356.97313.5D
48. Kobayashi H, Hosono O, Mimori T, Kawasaki H, Dang NH, Tanaka H, et al. Reduction of serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* (2002) 29(9):1858–66.
49. Scheibenbogen C, Freitag H, Blanco J, Capelli E, Lacerda E, Authier J, et al. The European ME/CFS Biomarker Landscape project: an initiative of the European network EUROMENE. *J Transl Med* (2017) 15(1):162. doi: 10.1186/s12967-017-1263-z

**Conflict of Interest:** Author HH was employed by CellTrend GmbH. CellTrend GmbH holds a patent on the use of beta-adrenergic receptor antibodies in diagnosis of ME/CFS. CS has a consulting agreement with Celltrend.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Szkłarski, Freitag, Lorenz, Becker, Sotzny, Bauer, Hartwig, Heidecke, Wittke, Kedor, Hanitsch, Grabowski, Sepúlveda and Scheibenbogen. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

9.2 FREITAG, H., SZKLARSKI, M., LORENZ, S., SOTZNY, F., BAUER, S., PHILIPPE, A., KEDOR, C., GRABOWSKI, P., LANGE, T., RIEMEKASTEN, G., HEIDECKE, H. & SCHEIBENBOGEN, C. 2021. Autoantibodies to Vasoregulative G-Protein-Coupled Receptors Correlate with Symptom Severity, Autonomic Dysfunction and Disability in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *J Clin Med*, 10, 3675.

## 9.2.1 Auszug aus der Journal Summary List (ISi Web of KnowledgeSM): Medicine, General and Internal (2020)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **“MEDICINE, GENERAL and INTERNAL”**  
 Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 168 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE	464,351	91.245	0.631180
2	LANCET	369,601	79.321	0.445240
3	JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION	224,147	56.272	0.279750
4	Nature Reviews Disease Primers	14,221	52.329	0.043550
5	BMJ-British Medical Journal	158,747	39.890	0.150630
6	ANNALS OF INTERNAL MEDICINE	72,588	25.391	0.082030
7	Lancet Digital Health	1,260	24.519	0.003000
8	JAMA Internal Medicine	25,002	21.873	0.077060
9	Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle	5,908	12.910	0.009440
10	PLOS MEDICINE	42,445	11.069	0.061920
11	Cochrane Database of Systematic Reviews	81,212	9.266	0.121830
12	JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE	13,801	8.989	0.011960
13	BMC Medicine	20,511	8.775	0.040120
14	JOURNAL OF TRAVEL MEDICINE	5,260	8.490	0.004900
15	JAMA Network Open	12,653	8.483	0.039940
16	CANADIAN MEDICAL ASSOCIATION JOURNAL	19,683	8.262	0.014960
17	MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA	14,127	7.738	0.011150
18	MAYO CLINIC PROCEEDINGS	20,504	7.616	0.025820

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
19	AMYLOID-JOURNAL OF PROTEIN FOLDING DISORDERS	2,202	7.141	0.003280
20	Translational Research	5,766	7.012	0.007980
21	Deutsches Arzteblatt International	6,542	5.594	0.007550
22	MEDICAL CLINICS OF NORTH AMERICA	4,487	5.456	0.005110
23	BRITISH JOURNAL OF GENERAL PRACTICE	8,303	5.386	0.009300
24	JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY OF MEDICINE	4,981	5.344	0.002310
25	PANMINERVA MEDICA	1,003	5.197	0.000930
26	ANNALS OF FAMILY MEDICINE	6,770	5.166	0.009280
27	JOURNAL OF GENERAL INTERNAL MEDICINE	26,727	5.128	0.028950
28	Frontiers in Medicine	6,143	5.091	0.013050
29	AMERICAN JOURNAL OF PREVENTIVE MEDICINE	28,400	5.043	0.037310
30	AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE	29,186	4.965	0.021220
31	Journal of Personalized Medicine	1,071	4.945	0.002290
32	MINERVA MEDICA	1,338	4.806	0.001280
33	PALLIATIVE MEDICINE	7,332	4.762	0.009100
34	ANNALS OF MEDICINE	5,619	4.709	0.004060
35	EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION	8,197	4.686	0.005980
36	AMERICAN JOURNAL OF CHINESE MEDICINE	4,572	4.667	0.003020
37	European Journal of Internal Medicine	7,083	4.487	0.009330

Selected JCR Year: 2020; Selected Categories: "MEDICINE, GENERAL und INTERNAL"



Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
38	BRITISH MEDICAL BULLETIN	5,494	4.291	0.003290
39	Journal of Clinical Medicine	21,502	4.241	0.031360
40	PREVENTIVE MEDICINE	20,705	4.018	0.028980
41	POSTGRADUATE MEDICINE	3,169	3.840	0.003850
42	DM DISEASE-A-MONTH	951	3.800	0.000600
43	PAIN MEDICINE	10,086	3.750	0.012300
44	International Journal of Medical Sciences	5,677	3.738	0.005680
45	Diagnostics	2,557	3.706	0.003180
46	JOURNAL OF URBAN HEALTH-BULLETIN OF THE NEW YORK ACADEMY OF MEDICINE	5,637	3.671	0.005810
47	JOURNAL OF PAIN AND SYMPTOM MANAGEMENT	15,063	3.612	0.015920
48	Journal of Translational Internal Medicine	457	3.451	0.000990
49	Internal and Emergency Medicine	3,446	3.397	0.004890
50	Military Medical Research	2,279	3.329	0.001380
51	Archives of Medical Science	4,209	3.318	0.005000
52	AMERICAN FAMILY PHYSICIAN	9,415	3.292	0.007180
53	JOURNAL OF THE FORMOSAN MEDICAL ASSOCIATION	5,341	3.282	0.005130
54	Polish Archives of Internal Medicine-Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej	1,933	3.277	0.002150
55	CANADIAN FAMILY PHYSICIAN	4,641	3.275	0.005350
56	QJM-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICINE	7,086	3.210	0.003550

Selected JCR Year: 2020; Selected Categories: "MEDICINE, GENERAL und INTERNAL"

Article

# Autoantibodies to Vasoregulative G-Protein-Coupled Receptors Correlate with Symptom Severity, Autonomic Dysfunction and Disability in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome

Helma Freitag <sup>1,\*</sup>, Marvin Szklarski <sup>1,†</sup>, Sebastian Lorenz <sup>1</sup>, Franziska Sotzny <sup>1</sup>, Sandra Bauer <sup>1</sup>, Aurélie Philippe <sup>2</sup>, Claudia Kedor <sup>1</sup>, Patricia Grabowski <sup>1</sup>, Tanja Lange <sup>3</sup>, Gabriela Riemekasten <sup>3</sup>, Harald Heidecke <sup>4</sup> and Carmen Scheibenbogen <sup>1,5</sup>

- <sup>1</sup> Institute of Medical Immunology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany; marvin.szklarski@charite.de (M.S.); sebastian.lorenz@charite.de (S.L.); franziska.sotzny@charite.de (F.S.); sandra.bauer@charite.de (S.B.); claudia.kedor@charite.de (C.K.); patricia.grabowski@charite.de (P.G.); carmen.scheibenbogen@charite.de (C.S.)
- <sup>2</sup> Department of Nephrology and Critical Care Medicine, Charité—Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany; aurelie.philippe@charite.de
- <sup>3</sup> Department of Rheumatology and Clinical Immunology, University of Lübeck, 23538 Lübeck, Germany; tanja.lange@uksh.de (T.L.); Gabriela.Riemekasten@uksh.de (G.R.)
- <sup>4</sup> CellTrend GmbH, 14943 Luckenwalde, Germany; heidecke@celltrend.de
- <sup>5</sup> Berlin Institute of Health Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charité—Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany
- \* Correspondence: helma.freitag@charite.de
- † These authors share first authorship.



**Citation:** Freitag, H.; Szklarski, M.; Lorenz, S.; Sotzny, F.; Bauer, S.; Philippe, A.; Kedor, C.; Grabowski, P.; Lange, T.; Riemekasten, G.; et al. Autoantibodies to Vasoregulative G-Protein-Coupled Receptors Correlate with Symptom Severity, Autonomic Dysfunction and Disability in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3675. <https://doi.org/10.3390/jcm10163675>

Academic Editors: Giovanni Ricevuti and Lorenzo Lorusso

Received: 9 July 2021  
 Accepted: 16 August 2021  
 Published: 19 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Background: Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS) is an acquired complex disease with patients suffering from the cardinal symptoms of fatigue, post-exertional malaise (PEM), cognitive impairment, pain and autonomous dysfunction. ME/CFS is triggered by an infection in the majority of patients. Initial evidence for a potential role of natural regulatory autoantibodies (AAB) to beta-adrenergic (AdR) and muscarinic acetylcholine receptors (M-AChR) in ME/CFS patients comes from a few studies. Methods: Here, we analyzed the correlations of symptom severity with levels of AAB to vasoregulative AdR, AChR and Endothelin-1 type A and B (ETA/B) and Angiotensin II type 1 (AT1) receptor in a Berlin cohort of ME/CFS patients ( $n = 116$ ) by ELISA. The severity of disease, symptoms and autonomic dysfunction were assessed by questionnaires. Results: We found levels of most AABs significantly correlated with key symptoms of fatigue and muscle pain in patients with infection-triggered onset. The severity of cognitive impairment correlated with AT1-R- and ETA-R-AAB and severity of gastrointestinal symptoms with alpha1/2-AdR-AAB. In contrast, the patients with non-infection-triggered ME/CFS showed fewer and other correlations. Conclusion: Correlations of specific AAB against G-protein-coupled receptors (GPCR) with symptoms provide evidence for a role of these AAB or respective receptor pathways in disease pathomechanism.

**Keywords:** adrenergic receptors; autoantibodies; myalgic encephalomyelitis; chronic fatigue syndrome; autoimmunity; vasoregulation; G-protein-coupled receptor

## 1. Introduction

Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS) is an acquired complex disease with cardinal symptoms of fatigue, post-exertional malaise (PEM), cognitive dysfunction and pain [1]. The estimated prevalence is up to 0.86%, with peaks in teenage years and middle age [2,3]. ME/CFS is triggered by an infection in the majority

of patients [4]. Although the pathogenesis is still unknown, there is ample evidence of immune and autonomic dysregulation [5].

There is increasing evidence that vascular dysfunction and hypoperfusion play an important role in ME/CFS. A diminished oxygen supply in muscles upon exercise was shown in several studies in ME/CFS patients [6,7]. In line with this, metabolic changes in ME/CFS indicate hypoxia and ischemia [8]. Several studies showed a decrease in cerebral blood flow upon orthostatic challenge [9,10]. Thus, hypoperfusion, which is aggravated upon exertion, may cause mental and skeletal muscle fatigue that are hallmarks of ME/CFS [11].

For the regulation of blood flow, G-protein-coupled receptors (GPCR) for vasoactive hormones, such as catecholamines, acetylcholine, angiotensin II and endothelin 1, play an important role [12]. Regulatory autoantibodies (AAB) targeting GPCR are involved in the pathogenesis of many diseases. Anti-GPCR AAB bind to their corresponding receptors, which can result in both agonistic and antagonistic effects [13]. Among the first AAB to GPCR described were those to beta1 adrenergic receptor (AdR) in dilated cardiomyopathy and to angiotensin II type 1 receptor (AT1-R), mediating vasoconstriction as risk factors for renal transplant rejection [14,15]. AAB against GPCR has been found in many rheumatic diseases as well [16]. These AAB belong to a regulatory network, which is dysregulated in many diseases [17].

There is evidence that AdR and muscarinic acetylcholine receptors (M-AChR)-AAB play a role in ME/CFS, too. Tanaka et al. were the first to describe elevated M-AChR-AAB in ME/CFS and their association with muscle weakness and neurocognitive impairment [18]. In a previous study, we found elevated AAB against beta2-AdR as well as M3/M4-AChR in a subgroup of ME/CFS patients [19]. Bynke et al. were able to verify these findings detecting elevated AAB against beta1/2-AdR and M3/M4-AChR in serum but not in cerebrospinal fluid of ME/CFS patients [20]. Beta1/2-AdR-AAB levels in blood correlated with structural alterations in the brain related to pain modulation [21]. Recently, we found agonistic beta2-AdR-AAB in healthy controls and in ME/CFS patients, stimulating the beta2-AdR on immune cells and reporter cell lines. Importantly, this agonistic function was attenuated in ME/CFS [22]. When performing immunoadsorption to remove AAB from circulation, we observed short-term clinical improvement in most patients [23,24]. For ME/CFS patients receiving rituximab, we documented a sustained decline of pretreatment elevated beta2-AdR-AAB levels in clinical responders to rituximab treatment [19].

The aim of this study was to investigate correlations between levels of AAB binding to vasoregulative GPCR and the severity of clinical symptoms in ME/CFS. As AAB responses are frequently activated by infections, we distinguished between patients with and without infection triggered ME/CFS onset. In a recent study, we found an increased prevalence of the autoimmune associated single-nucleotide variants in CTLA4 and PTPN22 in ME/CFS patients with infectious disease onset only [25]. Catecholamines binding to alpha1/2-AdR on vascular smooth muscle cells cause vasoconstriction, while they mediate vasodilation via beta2-AdR. Angiotensin II binding to AT1-R and endothelin-1 to endothelin-1 type A and B receptor (ETA/B-R) both activate important vasoconstrictive pathways. These ligands are increased by physical exertion [12]. Protease-activated receptors (PAR) play a role in vasoregulation during inflammation. Activation of PAR-1 by thrombin was shown to induce vascular constriction [26,27]. PAR-2 activated by trypsin can mediate inflammatory cell adhesion to the endothelium [28]. Acetylcholine can mediate vasodilatation via M3-AChR dependent release of nitric oxide [29]. M4-AChR expression was described in the brain microvascular system [30]. We expected that if vasoregulative AAB levels play a role in the pathomechanism of ME/CFS, they should correlate with the severity of key symptoms and disability.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

A total of 116 patients were diagnosed at the outpatient clinic for immunodeficiencies at the Institute for Medical Immunology at the Charité Universitätsmedizin Berlin between October 2016 and May 2017. Diagnosis of ME/CFS in all patients was based on the 2003 Canadian Consensus Criteria and exclusion of other medical or neurological diseases that may cause fatigue by a comprehensive clinical and laboratory evaluation [1]. All patients received a cardiopulmonary workup prior to referral. In case of suspected rheumatic, gastrointestinal or neurological disease, patients were referred to specialists before the diagnosis ME/CFS was given. The study was approved by the Ethics Committee of Charité Universitätsmedizin Berlin (EA4/090/10) in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All patients gave informed consent.

### 2.2. Determination of Autoantibody Levels and Laboratory Blood Data

CellTrend GmbH, Luckenwalde, Germany, analyzed serum levels of AAB against alpha1-, alpha2-, beta1-, beta2-, beta3-AdR, M3- and M4-AChR; AT1-R, ETA-R and ETB-R; PAR1/2. Whole blood samples from each subject were allowed to clot at room temperature and then centrifuged at  $2000 \times g$  for 15 min in a refrigerated centrifuge. The serum was purified and stored at  $-35^\circ\text{C}$ . The AAB were measured in serum samples using a sandwich ELISA kit (CellTrend GmbH, Luckenwalde, Germany). The microtiter 96-well polystyrene plates were coated with full-length receptor proteins. To maintain the conformational epitopes of the receptor, 1 mM calcium chloride was added to every buffer. Duplicate samples of a 1:100 serum dilution were incubated at  $4^\circ\text{C}$  for 2 h. After washing steps, plates were incubated for 60 min with a 1:20,000 dilution of horseradish-peroxidase labelled goat anti-human IgG used for detection. In order to obtain a standard curve, the plates were incubated with test serum from a GPCR AAB-positive index patient. The ELISAs were validated according to the FDA's "Guidance for industry: Bioanalytical method validation". The concentration of serum IgG, IgA, IgM, IgE and IgG subclasses were determined at Charité diagnostics laboratory Labor Berlin GmbH.

### 2.3. Questionnaires for Symptom Scoring

The presence and severity of symptoms in patients with ME/CFS were assessed based on the 2003 Canadian Consensus Criteria [1,31]. Cardinal symptoms of fatigue, muscle pain, immune symptoms (mean of the 3 symptoms painful lymph nodes, sore throat and flu-like symptoms) and cognitive impairment (mean of the 3 symptoms memory disturbance, concentration ability and mental tiredness) were scored between 1 (no symptoms) and 10 (most severe symptoms) by the patients. Symptoms of autonomic dysfunction were assessed by the Composite Autonomic Symptom Score 31 (COMPASS 31) [32]. In addition, disability was examined using the Bell score focusing on the level of restriction in daily functioning [33] and fatigue using Chalder Fatigue Score [34]. Physical activities of daily life were assessed via the Short Form Health Survey 36 (SF-36) [35].

### 2.4. Statistical Analysis

Statistical data analyses were performed using IBM SPSS Statistics 22.0 (New York, NY, USA), GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA) and R 4.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>, accessed on 9 July 2021). All data were presented as median and interquartile range (IQR), mean and standard deviation (SD) or frequency ( $n$ ) and percentage where appropriate. Comparisons of quantitative parameters between two groups were performed using the nonparametric Mann–Whitney test. Categorical parameters were compared between subgroups applying the Pearson's  $\chi^2$ -test. Correlation analysis was performed using the nonparametric Spearman coefficient. Due to multiple testing, Benjamini–Hochberg (BH) correction was applied, aiming to control a false discovery rate of 5%. Adjusted  $p$ -values  $< 0.05$  were considered to provide evidence for a statistically significant result.

### 3. Results

#### 3.1. Cohort Characteristics

We analyzed a cohort of 116 ME/CFS patients for correlation of AAB levels with symptom severity. Patient characteristics are shown in Table 1. The median age was 43 years (IQR: 31–50), and the previous median duration of disease at the time of analysis was four years (IQR: 2–9). A total of 83 of the 116 patients (72%) were female, and 86 (74%) reported an infection-triggered onset of disease. Patients with infection-triggered onset were younger by a median difference of ten years ( $p = 0.005$ ) and reported shorter disease duration ( $p = 0.022$ ). There were no differences in symptom severity, Bell disability scale, SF-36 physical function and COMPASS 31-assessed autonomic dysfunction (Table 1) nor in AAB levels (Table 2) between these groups.

**Table 1.** Clinical characteristics. Asterisks mark significant differences between groups (Mann–Whitney test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

	Whole Cohort ( <i>n</i> = 116, Median with IQR)	w/Infection-Triggered Onset ( <i>n</i> = 86, Median with IQR)	w/o Infection-Triggered Onset ( <i>n</i> = 30, Median with IQR)	Inf. vs. Non-Inf.
Age	42.5a (31–50)	39a (31–47)	49a (40–54)	<i>p</i> : 0.005 **
Disease duration	4a (2–9)	3a (1–8)	6.50a (2.00–14.25)	<i>p</i> : 0.022 *
Sex (f/m)	83/33 (72%/28%)	64/22 (74%/26%)	19/11 (63%/37%)	<i>p</i> : 0.247
Fatigue	8 (7–9)	8 (7–9)	8.50 (8–10)	<i>p</i> : 0.113
Cognitive-score	7 (5.67–8.00)	7.21 (5.92–8.00)	6.84 (5.67–7.96)	<i>p</i> : 0.351
Muscle pain	7 (5–8)	7 (5–8)	8 (6.00–8.38)	<i>p</i> : 0.187
Immune-score	5.33 (4.00–6.67)	5.66 (4.17–7.00)	5.17 (3.67–5.96)	<i>p</i> : 0.226
Bell-Score	30 (30–40)	30 (30–40)	30 (30–40)	<i>p</i> : 0.560
Chalder-Fatigue Score	27 (25–30)	28 (25.88–30)	26 (24–30)	<i>p</i> : 0.130
SF-36 Score physical function	45 (20–55)	45 (18.75–61.25)	40 (30–50)	<i>p</i> : 0.834
COMPASS 31 total score	45.70 (35.18–55.42)	45.47 (34.36–55.34)	46.37 (39.28–56.13)	<i>p</i> : 0.687
COMPASS 31 orthostatic score	28 (20–32)	28 (20–32)	28 (20–32)	<i>p</i> : 0.954
COMPASS 31 vasomotoric score	0 (0–3)	0 (0–3)	0 (0–3)	<i>p</i> : 0.646
COMPASS 31 secretomotoric score	6.42 (3.75–8.56)	6.42 (2.14–8.56)	6.42 (4.28–8.56)	<i>p</i> : 0.294
COMPASS 31 gastrointestinal score	8.90 (6.90–12.46)	8.90 (6.23–12.46)	8.90 (7.12–12.02)	<i>p</i> : 0.932
COMPASS 31 bladder score	1.10 (0–2.20)	1.10 (0–2.20)	0 (0–2.20)	<i>p</i> : 0.369
COMPASS 31 pupillomotoric score	2.40 (1.43–3.00)	2.40 (1.50–3.00)	2.40 (1.20–3.00)	<i>p</i> : 0.772

**Table 2.** AAB levels and AAB/IgG-ratios. Differences between groups analyzed using Mann–Whitney test.

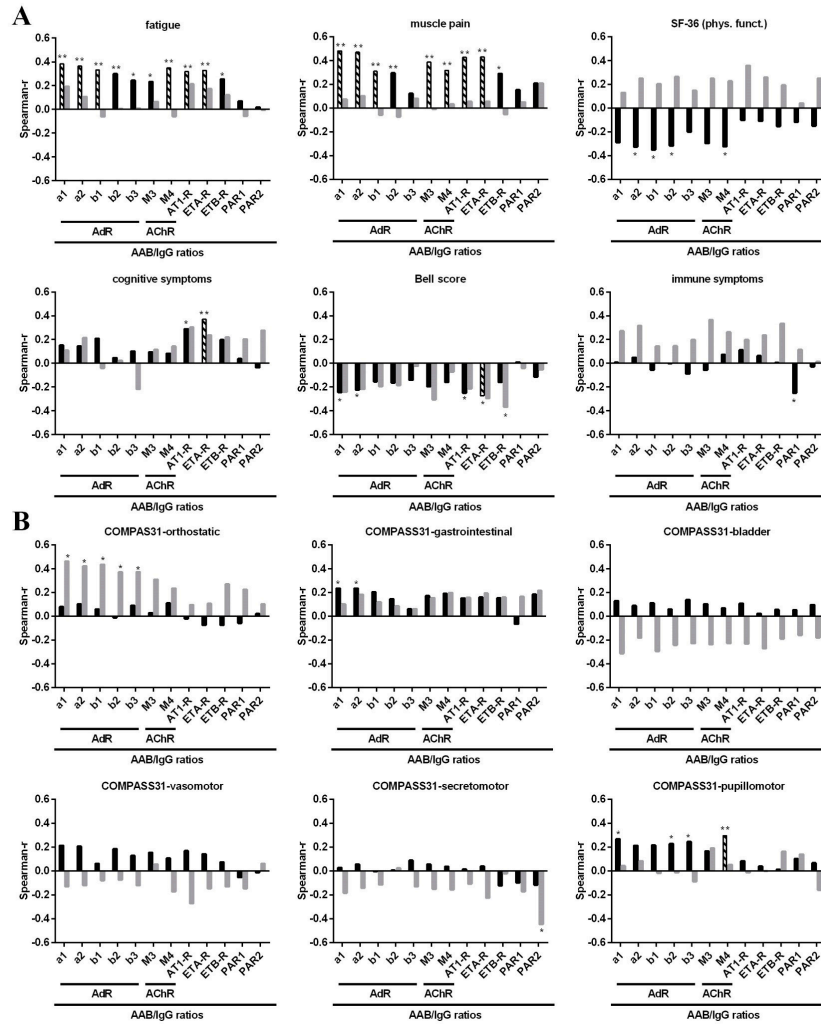
	Whole Cohort (n = 116, Median with IQR)	w/Infection- Triggered Onset (n = 86, Median with IQR)	w/o Infection- Triggered Onset (n = 30, Median with IQR)	Inf. vs. Non-Inf.
alpha1-AdR-AAB	8.71 U/l (7.24–11.65)	8.66 U/l (7.30–11.86)	8.83 U/l (6.85–10.02)	p: 0.400
alpha2-AdR-AAB	7.36 U/l (6.06–9.11)	7.37 U/l (6.05–9.65)	7.34 U/l (6.07–8.97)	p: 0.709
beta1-AdR-AAB	10.30 U/l (7.86–15.20)	9.88 U/l (7.61–16.20)	10.67 U/l (8.48–13.44)	p: 0.902
beta2-AdR-AAB	6.74 U/l (4.76–11.26)	6.74 U/l (4.75–11.55)	6.59 U/l (4.67–10.37)	p: 0.622
beta3-AdR-AAB	8.93 U/l (6.10–13.31)	9.45 U/l (6.29–13.68)	8.70 U/l (5.72–13.20)	p: 0.824
M3-AChR-AAB	4.74 U/l (3.41–6.10)	4.77 U/l (3.44–7.01)	4.45 U/l (3.37–5.62)	p: 0.293
M4-AChR-AAB	6.50 U/l (5.16–8.33)	6.50 U/l (5.20–9.11)	6.59 U/l (5.08–7.98)	p: 0.660
AT1-R-AAB	11.28 U/l (8.52–16.38)	11.62 U/l (8.50–17.05)	10.49 U/l (8.68–16.13)	p: 0.474
ETA-R-AAB	9.03 U/l (7.65–12.45)	8.98 U/l (7.60–12.79)	9.77 U/l (7.87–11.46)	p: 0.774
ETB-R-AAB	13.05 U/l (10.00–19.67)	13.05 U/l (10.03–19.87)	13.06 U/l (9.71–17.48)	p: 0.750
PAR1-AAB	4.52 U/l (3.14–5.96)	4.76 U/l (3.26–6.31)	3.49 U/l (3.07–4.91)	p: 0.102
PAR2-AAB	12.80 U/l (9.33–21.48)	12.12 U/l (8.46–22.08)	14.63 U/l (10.68–18.50)	p: 0.535
alpha1-AdR-AAB/IgG	0.90 U/g (0.78–1.20)	0.90 U/g (0.78–1.21)	0.90 U/g (0.77–1.13)	p: 0.626
alpha2-AdR-AAB/IgG	0.75 U/g (0.64–0.98)	0.74 U/g (0.63–0.99)	0.78 U/g (0.65–0.98)	p: 0.969
beta1-AR-AAB/IgG	1.06 U/g (0.82–1.54)	1.02 U/g (0.80–1.47)	1.14 U/g (0.86–1.57)	p: 0.595
beta2-AdR-AAB/IgG	0.71 U/g (0.49–1.12)	0.70 U/g (0.49–1.11)	0.78 U/g (0.44–1.15)	p: 0.897
beta3-AdR-AAB/IgG	0.88 U/g (0.66–1.31)	0.88 U/g (0.66–1.28)	0.89 U/g (0.67–1.49)	p: 0.989
M3-AChR-AAB/IgG	0.48 U/g (0.37–0.64)	0.48 U/g (0.37–0.66)	0.46 U/g (0.33–0.62)	p: 0.479
M4-AChR-AAB/IgG	0.69 U/g (0.51–0.87)	0.69 U/g (0.51–0.88)	0.68 U/g (0.52–0.88)	p: 0.984
AT1-R-AAB/IgG	1.16 U/g (0.92–1.73)	1.19 U/g (0.93–1.77)	1.14 U/g (0.85–1.47)	p: 0.414
ETA-R-AAB/IgG	0.95 U/g (0.77–1.29)	0.93 U/g (0.76–1.34)	1.03 U/g (0.81–1.18)	p: 0.812
ETB-R-AAB/IgG	1.29 U/g (1.02–1.93)	1.31 U/g (1.02–2.00)	1.29 U/g (1.00–1.82)	p: 0.707
PAR1-AAB/IgG	0.45 U/g (0.35–0.59)	0.45 U/g (0.36–0.66)	0.36 U/g (0.31–0.52)	p: 0.067
PAR2-AAB/IgG	1.37 U/g (0.96–1.99)	1.36 U/g (0.92–1.98)	1.55 U/g (1.15–2.16)	p: 0.398
total IgG	9.73 g/l (8.39–11.10)	9.79 g/l (8.41–11.09)	9.63 g/l (8.36–11.51)	p: 0.969

### 3.2. Correlation of AAB with Total IgG and Age

As we already observed in a previous study [19], most of the AAB levels showed a positive correlation with total IgG and IgG-subclasses, predominantly with IgG1 and IgG3 (Table S1). As the GPCR AAB belong to a regulatory network of AAB, their level may depend on total IgG levels. Further, we observed an inverse correlation with age for some AAB (Table S1), as well as between age and total IgG (whole cohort:  $r = -0.2526$ ;  $p = 0.007$ ,  $n = 114$ ). Therefore, we calculated AAB/IgG ratios to correct for the effect of age (Table 2 and Table S2).

### 3.3. Correlation of AAB with Clinical Symptom Scores

Levels of various AAB correlated with symptom severity (Table S3). Further, we observed a positive correlation of alpha1/2-AdR, M4-AChR and ETA-R with disease duration (Table S2). Minimizing the effect of age by using AAB/IgG ratios for correlation analyses led, in general, to higher correlation estimates ( $r$ ) and more correlations reached a level of significance (Table S4). We analyzed patient cohorts according to the type of disease onset. As 74% of patients reported an infectious onset, this group was much larger than the non-infectious onset group. Correlations of symptom severity with AAB/IgG ratios stratified according to disease onset are shown as Spearman’s correlation coefficient values in Figure 1, and correlations of clinical symptoms with absolute AAB levels are shown in Figure S1. The most correlations were found in patients with infection-triggered onset only, while fewer and other correlations were found in those with non-infection-triggered onset (Tables S3 and S4).



**Figure 1.** Correlations between symptom severity and AAB/IgG ratios. Correlation analysis of AAB/IgG ratios with the severity of (A) fatigue, muscle pain, cognitive and immune symptom scores, physical functioning (SF-36) and Bell disability score and (B) with COMPASS 31 subdomains. Spearman correlation coefficients ( $r$ ) are shown for patients with infection-triggered onset (black bars) and patients without infection-triggered onset (grey bars). Significant correlations prior to BH-correction are marked with asterisks (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ), correlations that remained significant after BH-correction are indicated by black-and-white striped bars.

In patients with infection-triggered onset ( $n = 86$ ), severity of fatigue correlated positively with most AAB/IgG ratios, including those against alpha1/2-AdR, beta1/2/3-AdR, M3/4-AChR, AT1-R, ETA-R and ETB-R, but not PAR-1/2 (Figure 1A, black bars). Muscle pain severity showed similar correlations to fatigue, except for beta3-AdR-AAB/IgG.

The SF-36 physical function showed a correlation pattern similar to fatigue and muscle pain with significant negative correlations (due to lower scores indicating more severe impairment) with alpha2-AdR-, beta1/2-AdR- and M4-ACh-AAB/IgG. In contrast, the severity of cognitive symptoms correlated positively with AT1-R- and ETA-R-AAB/IgG only. The severity of the Bell disability score showed a similar negative correlation with AT1-R- and ETA-R-, and with alpha1/2-AdR-AAB/IgG. For the immune score, only an inverse correlation with PAR1 was found. The Chalder Fatigue Score did not correlate with AAB/IgG (not shown). Scatter plots for significant correlations are shown in Figures S2–S5.

None of these significant correlations of fatigue and muscle pain were found in patients without infection-triggered onset (Figure 1A, grey bars). Correlations between most AAB/IgG and SF-36 physical function scores were even opposite to those of patients with infection-triggered onset. However, the correlation estimates (*r*) between AT1-R-AAB/IgG and cognitive symptoms and between AT1-R- and ETA-R-AAB/IgG and the Bell score were similar to those of patients with infection-triggered onset. As this subgroup was much smaller (*n* = 30), this may explain a lack of significance. Further, we found a significant negative correlation of ETB-R-AAB/IgG and the Bell score in this group only.

Interesting correlation patterns were also found for AAB/IgG and the three domains of orthostatic, gastrointestinal and pupillomotor function assessed by the COMPASS 31 questionnaire (Figure 1B). In patients with infection-triggered onset, the gastrointestinal symptoms correlated positively with alpha1/2-AdR- and the pupillomotor symptoms with alpha1-, beta2/3-AdR- and M4-AChR-AAB/IgG ratios. In contrast, the non-infection-triggered onset group showed strong correlations of alpha1/2-AdR- and beta1/2/3-AdR-AAB/IgG with orthostatic symptoms and an inverse correlation of PAR2-AAB/IgG with secretomotor symptoms, which are absent in the other subgroup. We did not observe any of these correlations with total IgG (not shown). Patients without infection-triggered onset had a significantly longer disease duration prior to these analyses (Table 1). As we observed higher alpha1/2-AdR, M4-AChR and ETA-R-AAB/IgG ratios to be associated with longer disease duration (Table S2), this may have an impact on the correlations of alpha1/2-AdR/IgG with orthostatic symptoms.

In patients with infection-triggered onset, most of the AAB/IgG ratio correlations with fatigue, muscle pain and cognitive symptoms, as well as Bell score with ETA-R-AAB/IgG, remained significant after BH-correction (Table 3 and Figure 1). In addition, the association of pupillomotor symptoms with M4-AChR-AAB/IgG remained significant. After BH correction, none of the correlations observed in patients without infection-triggered onset remained significant.

**Table 3.** Significant clinical correlations with AAB/IgG ratios after BH-correction in patients with infection-triggered onset (Spearman correlation coefficient and Benjamini–Hochberg corrected *p*-value; significant correlations marked with asterisks: \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01).

	alpha1-AdR-AAB/IgG	alpha2-AdR-AAB/IgG	beta1-AdR-AAB/IgG	M3-AChR-AAB/IgG	M4-AChR-AAB/IgG	AT1-R-AAB/IgG	ETA-R-AAB/IgG
Fatigue	r: 0.383 p: 0.004 **	r: 0.363 p: 0.009 **	r: 0.331 p: 0.045 *	r: 0.234 p: 0.280	r: 0.349 p: 0.028 *	r: 0.317 p: 0.035 *	r: 0.328 p: 0.017 *
Muscle pain	r: 0.482 p: <0.001 **	r: 0.471 p: <0.001 **	r: 0.310 p: 0.045 *	r: 0.386 p: 0.008 **	r: 0.319 p: 0.035 *	r: 0.427 p: 0.002 **	r: 0.429 p: 0.001 **
Cognitive score	r: 0.152 p: 0.303	r: 0.144 p: 0.306	r: 0.209 p: 0.132	r: 0.095 p: 0.583	p: 0.084 p: 0.589	r: 0.290 p: 0.051	r: 0.371 p: 0.007 **
Bell Score	r: -0.244 p: 0.099	r: -0.223 p: 0.105	r: -0.154 p: 0.270	r: -0.196 p: 0.280	r: -0.160 p: 0.308	r: -0.250 p: 0.083	r: -0.273 p: 0.045 *
COMPASS 31 pupillomotoric score	r: 0.268 p: 0.082	r: 0.212 p: 0.123	r: 0.215 p: 0.132	r: 0.166 p: 0.298	r: 0.294 p: 0.042 *	r: 0.084 p: 0.590	r: 0.039 p: 0.791



#### 4. Discussion

There is increasing evidence for a role of vascular dysfunction in ME/CFS that shows associations with key symptoms [11]. In this study, we found several remarkable correlations of vasoregulative AAB with clinical symptoms in ME/CFS. The dependence between the measured biologic gradient of AAB and the severity of symptoms suggests a causal pathomechanistic connection.

Due to a correlation of natural regulative AAB with total IgG [19] and dependence of IgG levels on age [36], AAB/IgG ratios were used in our analyses in order to correct for the influence of age. Using the AAB/IgG ratios instead of absolute AAB levels revealed stronger and more correlations, and more *p*-values reached a level of significance.

In line with our hypothesis of a role of vasoactive AAB in ME/CFS, we found that levels of alpha1/2- and beta1/2/3-AdR-, M3/4-AChR-, and AT1-R-, ETA/B-R-AAB/IgG ratios all significantly correlate with the severity of fatigue and, with the exception of beta3-AdR-AAB/IgG, with muscle pain. The same AAB alpha2-AdR-, beta1/2-AdR- and M4-AChR- (but not AT1-R-, ETA/B-R-) correlated with SF-36 physical function. Tanaka et al. already described the levels of M-AChR-AAB (without data on the M subtype) in ME/CFS to be associated with muscle weakness [18]. Bynke et al. could not show an association of AAB against beta1/2-AdR and M3/M4-AChR with various health-related questionnaires, but their cohort was rather small, and key symptoms including fatigue, muscle pain, cognitive and autonomous symptoms were not separately assessed [20]. We found elevated AAB against beta2-AdR, as well as M3 and M4-AChR, in ME/CFS patients in our previous study [19]. In this study, the severity of symptoms was not determined. In patients with postural tachycardia syndrome (POTS), one study reported elevated levels of AAB against alpha1-AdR and M4-AChR to correlate with symptom severity [37], while another demonstrated elevated levels of AAB against beta1-AdR- and beta2-AdR to correlate with symptom severity [38].

We observed a distinct pattern for cognitive impairment, which was associated with ETA-R and AT1-R-AAB. Of interest, ETA/B-R-, AT1-R- and further alpha1/2-AdR AAB/IgG correlated with the severity of Bell disability score, too, capturing exertion induced symptoms and ability to work. ETA-R-, AT1-R- and alpha1/2-AdR all activate strong vasoconstrictor pathways stimulated by physical exertion [12]. Enhanced levels of AT1-R-AAB are a well-established risk factor for renal transplant rejection [14]. In hypertension, elevated AT1-R-AAB and alpha1-AdR-AAB have been described suggesting an agonistic effect on their receptors [39]. Furthermore, AT1-R-AAB were associated with vascular aging and arterial stiffness [40,41]. The role of ETA-R-AAB was described in autoimmune-related pulmonary arterial hypertension in both systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis [42,43]. Our concept of higher ETA-R and AT1-R AAB/IgG to correlate with cognitive impairment due to vasoconstriction is in line with the recent studies by van Campen et al., showing both cerebral hypoperfusion and a decline in cognitive function in ME/CFS upon orthostatic stress [9,10].

Interesting correlation patterns were found for AAB/IgG ratios and gastrointestinal and pupillomotor function in the infection-triggered onset group as well. The gastrointestinal symptoms correlated with alpha1/2-AdR-ABB/IgG. This finding is in line with a study showing that colorectal motility is mediated by alpha1-AdR [44]. Pupillomotor symptoms correlated with alpha1-AdR-, beta2/3-AdR- and M4-AChR-ABB/IgG. Upon BH correction, the association of pupillomotor symptoms with M4-AChR-ABB/IgG remained significant. M4-AChR expression was described in the brain microvascular system and corneal endothelium [30,45].

Remarkably, we found no significant correlations of AAB/IgG against AdR, AChR and AT1-R/ET-R with fatigue, muscle pain and of AdR- and AChR-ABB/IgG with SF-36 physical function in patients without an infection-triggered onset of disease. However, similar estimates for correlations of AAB/IgG ratios to AT1-R/ETA-R and alpha1/2-AdR with cognition and Bell Score were found, which were not significant, likely related to the three-fold lower number of patients in this group. Only in patients with non-infectious disease onset

significant correlations of symptoms of orthostatic intolerance with all AdR-AAB/IgG were seen. Further, an inverse correlation of PAR2-AAB/IgG with secretomotor symptoms was found. PAR2 activated by trypsin was shown to mediate salivary secretion [46].

GPCR AAB are different from classical autoantibodies that frequently activate, complement and can mediate inflammation and destruction [47]. No cytotoxic effect or complement activation of GPCR AAB has been reported so far. GPCR AAB specifically bind to their corresponding receptors, which can have functional consequences. Both stimulating agonistic and inhibiting antagonistic effects were described [13,15,48]. Considering an agonistic function, several associations of AAB with symptoms that we found are plausible. Elevated levels of agonistic AT1-R/ETA-R AAB could well explain the association with more cognitive dysfunction due to their effect on vasoconstriction described in several other diseases [49]. In a similar manner, enhanced PAR2 activity could explain fewer secretomotor symptoms and enhanced alpha1-AdR activity more gastrointestinal symptoms [44]. The inverse correlation of immune score with PAR1-AAB/IgG could be explained by lower levels of PAR1-AAB, resulting in less vascular constriction [26,27]. The associations of elevated levels of both alpha- and beta-AdR-AAB with more severe fatigue and muscle pain in post-infectious ME/CFS could point to overactivity of vasoconstrictive alpha-AdR-AAB or an impaired function of vasodilative beta2-AdR-AAB. Previously, we found an impaired agonistic beta2-AdR-AAB function in immune and reporter cell line assays in ME/CFS patients with higher AAB levels [22]. AAB against beta1-AdR were shown to impair both beta1-AdR- and beta3-AdR-mediated vasorelaxation in rats [50]. The AdR dysfunction may specifically play a role upon exertion with enhanced release of epinephrine and norepinephrine, resulting in enhanced vasoconstriction and hypoperfusion with consecutive fatigue and muscle pain. Autoimmune mechanisms are likely in post-infectious ME/CFS [25]. As all these AAB are natural regulatory, AAB dysfunction may evolve during infection by bystander activation and somatic hypermutation resulting in AAB with a stronger or altered antigen binding to GPCR or in epitope spreading. With respect to AdR such a scenario would be in line with patients frequently reporting that an infection in a stressful situation, presumably going along with a stress-induced activation of AdR, triggered the disease onset.

The most discrepant patterns we observed between the patient subgroups are the correlations of all AdR-AAB with orthostatic dysfunction in non-infection-triggered disease but with fatigue, muscle pain and SF-36 in post-infectious ME/CFS. Since absolute AAB levels, as well as AAB/IgG ratios, did not differ between the two patient subgroups, this implicates that not merely the AAB level but rather the function of the AAB or of the receptors are different in these patient subgroups. To further follow this hypothesis, in patients with non-infection-triggered onset, the function of AdR-AAB responses may not be altered, but correlations here could reflect an adaptive response. For example, patients with connective tissue diseases, such as Ehlers Danlos syndrome (EDS), are at higher risk to develop ME/CFS. Here the vasculature is more elastic, leading to lower systolic and diastolic blood pressure, tachycardia and often POTS. Patients have an autonomic dysfunction with gastrointestinal problems and disturbed bladder function as well. There is evidence that patients with EDS have heightened vasoconstriction due to adrenergic hyper-responsiveness [51]. It is tempting to speculate that in these patients, elevated AdR-AAB are reflecting this compensatory overactivity of the adrenergic system. In line with this concept, in patients with POTS, elevated levels of AAB against alpha1-AdR and M4-AChR correlated with symptom severity [37].

A limitation of this study is that several correlations were no longer evident after correction for multiple testing due to the many parameters analyzed in our study. We provided both the corrected and the uncorrected correlations in order to address a possible unnecessary rejection of true findings upon adjustment for multiple testing [52]. The interpretation of the findings in the cohort without infection-triggered onset is based on a smaller number of patients and some non-significant findings. We did not increase the number of patients with non-infection triggered ME/CFS because we did not want to add

a patient group diagnosed and analyzed at a later time point. In addition, disease onset is self-reported, and some patients may be wrongly classified. The symptom severity is self-reported and a subjective measure, leading to a wide distribution. As sleep disturbances are a key symptom in ME/CFS too, and sleep is associated with the parasympathetic system, a sleep score should be assessed in further studies. Further, we did not analyze a healthy control cohort in this study. In previous and ongoing unpublished studies, we constantly found that a subgroup of approximately one-third of ME/CFS patients has higher AAB against beta2-AdR as well as M3/M4-AChR compared to healthy controls [19,20]. Findings from our recent functional study suggest that the agonistic function of beta2-AdR AAB may be attenuated in ME/CFS patients, too, despite normal AAB levels [22].

In conclusion, our study provides evidence that AAB and/or the receptor pathways of AdR, AChR as well as AT1-R and ET-R play a role in ME/CFS due to the association with symptom severity. Thus, it is conceivable that various symptoms of ME/CFS, including fatigue, muscle pain, cognitive impairment and autonomic dysregulation, could be mediated or aggravated by these AAB. Further studies are required to decipher the mechanism and binding specificity of these GPCR-AAB, and their effect of on vascular function in ME/CFS, and how this may be translated into therapeutic concepts. In the case of dysfunctional AAB, therapies targeting AAB, such as immunoabsorption or rituximab, would be warranted and were shown to be effective in a subset of ME/CFS patients (reviewed in [5]). Further specific targeting of dysfunctional or regulative AAB may be developed as treatment strategies in ME/CFS.

## 5. Patents

CellTrend GmbH holds a patent for the use of beta-adrenergic receptor antibodies in the diagnosis of CFS.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm10163675/s1>, Table S1: AAB para-clinical correlations, Table S2: AAB/IgG ratio para-clinical correlations, Table S3: AAB clinical correlations of AdR-, AChR- and other AAB; onset-stratified, Table S4: Clinical correlations of AdR-, AChR- and other AAB/IgG ratio; onset-stratified, Figure S1: Correlations between symptom severity and AAB, Figure S2: Correlations with fatigue in patients with infection-triggered onset, Figure S3: Correlations with muscle pain, cognitive and immune symptoms in patients with infection-triggered onset, Figure S4: Correlations with Bell score, physical functioning and symptoms of autonomic dysfunction in patients with infection-triggered onset, Figure S5: Correlations in patients without infection-triggered onset.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.S. methodology, M.S., S.L., H.F. and H.H.; validation, M.S., H.F., S.B. and F.S.; formal analysis, M.S.; investigation, S.B., C.K., P.G. and H.H.; resources, C.K. and P.G.; data curation, M.S., S.L. and T.L.; writing—original draft preparation, M.S., H.F. and C.S.; writing—review and editing, S.L., F.S., S.B., A.P., C.K., P.G., T.L., G.R. and H.H.; visualization, H.F. and M.S.; supervision, C.S.; project administration, C.S.; funding acquisition, C.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Weidenhammer-Zöbele Foundation, M.S. received a scholarship from the Lost Voices Foundation.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Charité Universitätsmedizin Berlin (protocol code EA4/090/10, date of approval 11 December 2012).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on reasonable request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The support in patient care and data management by Silvia Thiel is acknowledged. Further, we thank all patients who trustfully donated the blood samples and agreed to participate in this research project.

**Conflicts of Interest:** H.H., managing director of CellTrend GmbH, holds a patent for the use of beta-adrenergic receptor antibodies in diagnosis of CFS. All other authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Carruthers, B.M.; Jain, A.K.; De Meirleir, K.L.; Peterson, D.L.; Klimas, N.G.; Lerner, A.M.; Bested, A.C.; Flor-Henry, P.; Joshi, P.; Powles, A.C.P.; et al. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *J. Chronic Fatigue Syndr.* **2003**, *11*, 7–115. [\[CrossRef\]](#)
- Bakken, I.J.; Tveito, K.; Gunnes, N.; Ghaderi, S.; Stoltenberg, C.; Trogstad, L.; Haberg, S.E.; Magnus, P. Two age peaks in the incidence of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis: A population-based registry study from Norway 2008–2012. *BMC Med.* **2014**, *12*, 167. [\[CrossRef\]](#)
- Valdez, A.R.; Hancock, E.E.; Adebayo, S.; Kiernicki, D.J.; Proskauer, D.; Attewell, J.R.; Bateman, L.; DeMaria, A., Jr.; Lapp, C.W.; Rowe, P.C.; et al. Estimating Prevalence, Demographics, and Costs of ME/CFS Using Large Scale Medical Claims Data and Machine Learning. *Front. Pediatrics* **2018**, *6*, 412. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chu, L.; Valencia, I.J.; Garvert, D.W.; Montoya, J.G. Onset Patterns and Course of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Front. Pediatrics* **2019**, *7*, 12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sotzny, F.; Blanco, J.; Capelli, E.; Castro-Marrero, J.; Steiner, S.; Murovska, M.; Scheibenbogen, C.; European Network on, M.C. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome—Evidence for an autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* **2018**, *17*, 601–609. [\[CrossRef\]](#)
- Vermeulen, R.C.; Kurk, R.M.; Visser, F.C.; Sluiter, W.; Scholte, H.R. Patients with chronic fatigue syndrome performed worse than controls in a controlled repeated exercise study despite a normal oxidative phosphorylation capacity. *J. Transl. Med.* **2010**, *8*, 93. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Keller, B.A.; Pryor, J.L.; Giloteaux, L. Inability of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients to reproduce VO(2) peak indicates functional impairment. *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Germain, A.; Barupal, D.K.; Levine, S.M.; Hanson, M.R. Comprehensive Circulatory Metabolomics in ME/CFS Reveals Disrupted Metabolism of Acyl Lipids and Steroids. *Metabolites* **2020**, *10*, 34. [\[CrossRef\]](#)
- van Campen, C.; Rowe, P.C.; Verheugt, F.W.A.; Visser, F.C. Cognitive Function Declines Following Orthostatic Stress in Adults With Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS). *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 688. [\[CrossRef\]](#)
- van Campen, C.; Verheugt, F.W.A.; Rowe, P.C.; Visser, F.C. Cerebral blood flow is reduced in ME/CFS during head-up tilt testing even in the absence of hypotension or tachycardia: A quantitative, controlled study using Doppler echography. *Clin. Neurophysiol. Pr.* **2020**, *5*, 50–58. [\[CrossRef\]](#)
- Wirth, K.; Scheibenbogen, C. A Unifying Hypothesis of the Pathophysiology of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS): Recognitions from the finding of autoantibodies against ss2-adrenergic receptors. *Autoimmun. Rev.* **2020**, *19*, 102527. [\[CrossRef\]](#)
- Holwerda, S.W.; Restaino, R.M.; Fadel, P.J. Adrenergic and non-adrenergic control of active skeletal muscle blood flow: Implications for blood pressure regulation during exercise. *Auton. Neurosci.* **2015**, *188*, 24–31. [\[CrossRef\]](#)
- Dragun, D.; Philippe, A.; Catar, R.; Hegner, B. Autoimmune mediated G-protein receptor activation in cardiovascular and renal pathologies. *Thromb. Haemost.* **2009**, *101*, 643–648.
- Dragun, D.; Muller, D.N.; Brasen, J.H.; Fritsche, L.; Nieminen-Kelha, M.; Dechend, R.; Kintscher, U.; Rudolph, B.; Hoebeke, J.; Eckert, D.; et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 558–569. [\[CrossRef\]](#)
- Wallukat, G.; Muller, J.; Podlowski, S.; Nissen, E.; Morwinski, R.; Hetzer, R. Agonist-like beta-adrenoceptor antibodies in heart failure. *Am. J. Cardiol.* **1999**, *83*, 75H–79H. [\[CrossRef\]](#)
- Cabral-Marques, O.; Riemekasten, G. Functional autoantibodies targeting G protein-coupled receptors in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 648–656. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cabral-Marques, O.; Marques, A.; Giil, L.M.; De Vito, R.; Rademacher, J.; Gunther, J.; Lange, T.; Humrich, J.Y.; Klapa, S.; Schinke, S.; et al. GPCR-specific autoantibody signatures are associated with physiological and pathological immune homeostasis. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5224. [\[CrossRef\]](#)
- Tanaka, S.; Kuratsune, H.; Hidaka, Y.; Hakariya, Y.; Tatsumi, K.I.; Takano, T.; Kanakura, Y.; Amino, N. Autoantibodies against muscarinic cholinergic receptor in chronic fatigue syndrome. *Int. J. Mol. Med.* **2003**, *12*, 225–230. [\[CrossRef\]](#)
- Loebel, M.; Grabowski, P.; Heidecke, H.; Bauer, S.; Hanitsch, L.G.; Wittke, K.; Meisel, C.; Reinke, P.; Volk, H.D.; Fluge, O.; et al. Antibodies to beta adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Brain Behav. Immun.* **2016**, *52*, 32–39. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bynke, A.J.P.; Gottfries, C.F.; Heidecke, H.; Scheibenbogen, C.; Bergquist, J. Autoantibodies to beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in Myalgic Encephalomyelitis (ME) patients—A validation study in plasma and cerebrospinal fluid from two Swedish cohorts. *Brain Behav. Immun.-Health* **2020**, *7*, 100107. [\[CrossRef\]](#)
- Fujii, H.; Sato, W.; Kimura, Y.; Matsuda, H.; Ota, M.; Maikusa, N.; Suzuki, F.; Amano, K.; Shin, I.; Yamamura, T.; et al. Altered Structural Brain Networks Related to Adrenergic/Muscarinic Receptor Autoantibodies in Chronic Fatigue Syndrome. *J. Neuroimaging Off. J. Am. Soc. Neuroimaging* **2020**, *30*, 822–827. [\[CrossRef\]](#)

22. Hartwig, J.; Sotzny, F.; Bauer, S.; Heidecke, H.; Riemekasten, G.; Dragun, D.; Meisel, C.; Dames, C.; Grabowski, P.; Scheibenbogen, C. Research article IgG stimulated  $\beta$ 2 adrenergic receptor activation is attenuated in patients with ME/CFS. *Brain Behav. Immun.-Health* **2020**, *3*, 100047. [[CrossRef](#)]
23. Scheibenbogen, C.; Loebel, M.; Freitag, H.; Krueger, A.; Bauer, S.; Antelmann, M.; Doehner, W.; Scherbakov, N.; Heidecke, H.; Reinke, P.; et al. Immunoadsorption to remove ss2 adrenergic receptor antibodies in Chronic Fatigue Syndrome CFS/ME. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193672. [[CrossRef](#)]
24. Tolle, M.; Freitag, H.; Antelmann, M.; Hartwig, J.; Schuchardt, M.; van der Giet, M.; Eckardt, K.U.; Grabowski, P.; Scheibenbogen, C. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Efficacy of Repeat Immunoadsorption. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Steiner, S.; Becker, S.C.; Hartwig, J.; Sotzny, F.; Lorenz, S.; Bauer, S.; Lobel, M.; Stittrich, A.B.; Grabowski, P.; Scheibenbogen, C. Autoimmunity-Related Risk Variants in PTPN22 and CTLA4 Are Associated With ME/CFS With Infectious Onset. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Tognetto, M.; D'Andrea, M.R.; Trevisani, M.; Guerrini, R.; Salvadori, S.; Spisani, L.; Daniele, C.; Andrade-Gordon, P.; Geppetti, P.; Harrison, S. Proteinase-activated receptor-1 (PAR-1) activation contracts the isolated human renal artery in vitro. *Br. J. Pharm.* **2003**, *139*, 21–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kuwabara, Y.; Tanaka-Ishikawa, M.; Abe, K.; Hirano, M.; Hirooka, Y.; Tsutsui, H.; Sunagawa, K.; Hirano, K. Proteinase-activated receptor 1 antagonism ameliorates experimental pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.* **2019**, *115*, 1357–1368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Tennant, G.M.; Wadsworth, R.M.; Kennedy, S. PAR-2 mediates increased inflammatory cell adhesion and neointima formation following vascular injury in the mouse. *Atherosclerosis* **2008**, *198*, 57–64. [[CrossRef](#)]
29. Rhoden, A.; Speiser, J.; Geertz, B.; Uebeler, J.; Schmidt, K.; de Wit, C.; Eschenhagen, T. Preserved cardiovascular homeostasis despite blunted acetylcholine-induced dilation in mice with endothelial muscarinic M3 receptor deletion. *Acta Physiol.* **2019**, *226*, e13262. [[CrossRef](#)]
30. Radu, B.M.; Osculati, A.M.M.; Suku, E.; Banciu, A.; Tsenov, G.; Merigo, F.; Di Chio, M.; Banciu, D.D.; Tognoli, C.; Kacer, P.; et al. All muscarinic acetylcholine receptors (M1-M5) are expressed in murine brain microvascular endothelium. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5083. [[CrossRef](#)]
31. Fluge, O.; Risa, K.; Lunde, S.; Alme, K.; Rekeland, I.G.; Sapkota, D.; Kristoffersen, E.K.; Sorland, K.; Bruland, O.; Dahl, O.; et al. B-Lymphocyte Depletion in Myalgic Encephalopathy/Chronic Fatigue Syndrome. An Open-Label Phase II Study with Rituximab Maintenance Treatment. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129898. [[CrossRef](#)]
32. Sletten, D.M.; Suarez, G.A.; Low, P.A.; Mandrekar, J.; Singer, W. COMPASS 31: A refined and abbreviated Composite Autonomic Symptom Score. *Mayo Clin. Proc.* **2012**, *87*, 1196–1201. [[CrossRef](#)]
33. Bell, D.S. *The Doctor's Guide to Chronic Fatigue Syndrome: Understanding, Treating and Living with CFIDS*; Da Capo Lifelong Books: Boston, MA, USA, 1995.
34. Cella, M.; Chalder, T. Measuring fatigue in clinical and community settings. *J. Psychosom. Res.* **2010**, *69*, 17–22. [[CrossRef](#)]
35. Ware, J.E., Jr.; Sherbourne, C.D. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med. Care* **1992**, *30*, 473–483. [[CrossRef](#)]
36. Lock, R.J.; Unsworth, D.J. Immunoglobulins and immunoglobulin subclasses in the elderly. *Ann. Clin. Biochem.* **2003**, *40*, 143–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Gunning, W.T., 3rd; Kvale, H.; Kramer, P.M.; Karabin, B.L.; Grubb, B.P. Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome Is Associated With Elevated G-Protein Coupled Receptor Autoantibodies. *J. Am. Heart Assoc.* **2019**, *8*, e013602. [[CrossRef](#)]
38. Li, H.; Yu, X.; Liles, C.; Khan, M.; Vanderlinde-Wood, M.; Galloway, A.; Zillner, C.; Benbrook, A.; Reim, S.; Collier, D.; et al. Autoimmune basis for postural tachycardia syndrome. *J. Am. Heart Assoc.* **2014**, *3*, e000755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Liao, Y.H.; Wei, Y.M.; Wang, M.; Wang, Z.H.; Yuan, H.T.; Cheng, L.X. Autoantibodies against AT1-receptor and alpha1-adrenergic receptor in patients with hypertension. *Hypertens. Res.* **2002**, *25*, 641–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Wang, M.; Yin, X.; Zhang, S.; Mao, C.; Cao, N.; Yang, X.; Bian, J.; Hao, W.; Fan, Q.; Liu, H. Autoantibodies against AT1 Receptor Contribute to Vascular Aging and Endothelial Cell Senescence. *Aging Dis.* **2019**, *10*, 1012–1025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Li, G.; Cao, Z.; Wu, X.W.; Wu, H.K.; Ma, Y.; Wu, B.; Wang, W.Q.; Cheng, J.; Zhou, Z.H.; Tu, Y.C. Autoantibodies against AT1 and alpha1-adrenergic receptors predict arterial stiffness progression in normotensive subjects over a 5-year period. *Clin. Sci.* **2017**, *131*, 2947–2957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Guo, L.; Li, M.; Chen, Y.; Wang, Q.; Tian, Z.; Pan, S.; Zeng, X.; Ye, S. Anti-Endothelin Receptor Type A Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Arthritis Rheumatol.* **2015**, *67*, 2394–2402. [[CrossRef](#)]
43. Becker, M.O.; Kill, A.; Kutsche, M.; Guenther, J.; Rose, A.; Tabeling, C.; Witzentrath, M.; Kuhl, A.A.; Heidecke, H.; Ghofrani, H.A.; et al. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2014**, *190*, 808–817. [[CrossRef](#)]
44. Naitou, K.; Shiina, T.; Kato, K.; Nakamori, H.; Sano, Y.; Shimizu, Y. Colokinetic effect of noradrenaline in the spinal defecation center: Implication for motility disorders. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Grub, M.; Mielke, J.; Rohrbach, J.M. [m4 muscarinic receptors of the cornea: Muscarinic cholinceptor-stimulated inhibition of the cAMP-PKA pathway in corneal epithelial and endothelial cells]. *Ophthalmologe* **2011**, *108*, 651–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Nishiyama, T.; Nakamura, T.; Obara, K.; Inoue, H.; Mishima, K.; Matsumoto, N.; Matsui, M.; Manabe, T.; Mikoshiba, K.; Saito, I. Up-regulated PAR-2-mediated salivary secretion in mice deficient in muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *J. Pharm. Exp.* **2007**, *320*, 516–524. [[CrossRef](#)]
47. Ludwig, R.J.; Vanhoorelbeke, K.; Leypoldt, F.; Kaya, Z.; Bieber, K.; McLachlan, S.M.; Komorowski, L.; Luo, J.; Cabral-Marques, O.; Hammers, C.M.; et al. Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Riemekasten, G.; Petersen, F.; Heidecke, H. What Makes Antibodies Against G Protein-Coupled Receptors so Special? A Novel Concept to Understand Chronic Diseases. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 564526. [[CrossRef](#)]
49. Lukitsch, I.; Kehr, J.; Chaykovska, L.; Wallukat, G.; Nieminen-Kelha, M.; Batuman, V.; Dragun, D.; Gollasch, M. Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies. *Transplantation* **2012**, *94*, 8–13. [[CrossRef](#)]
50. Abdelkrim, M.A.; Leonetti, D.; Montaudon, E.; Chatagnon, G.; Gogny, M.; Desfontis, J.C.; Noireaud, J.; Mallem, M.Y. Antibodies against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induce endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries of the Wistar rat. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *19*, 308–316. [[CrossRef](#)]
51. Gazit, Y.; Nahir, A.M.; Grahame, R.; Jacob, G. Dysautonomia in the joint hypermobility syndrome. *Am. J. Med.* **2003**, *115*, 33–40. [[CrossRef](#)]
52. Althouse, A.D. Adjust for Multiple Comparisons? It's Not That Simple. *Ann. Thorac. Surg.* **2016**, *101*, 1644–1645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## 10 Lebenslauf

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

## 11 Publikationsliste

\*<sup>1</sup> FREITAG, H.†<sup>2</sup>, SZKLARSKI, M.†, LORENZ, S., SOTZNY, F., BAUER, S., PHILIPPE, A., KEDOR, C., GRABOWSKI, P., LANGE, T., RIEMEKASTEN, G., HEIDECKE, H. & SCHEIBENBOGEN, C. 2021. Autoantibodies to Vasoregulative G-Protein-Coupled Receptors Correlate with Symptom Severity, Autonomic Dysfunction and Disability in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *J Clin Med*, 10, 3675.  
Impact Factor 2021: 4.964

\* SZKLARSKI, M., FREITAG, H., LORENZ, S., BECKER, S. C., SOTZNY, F., BAUER, S., HARTWIG, J., HEIDECKE, H., WITTKE, K., KEDOR, C., HANITSCH, L. G., GRABOWSKI, P., SEPULVEDA, N. & SCHEIBENBOGEN, C. 2021. Delineating the Association Between Soluble CD26 and Autoantibodies Against G-Protein Coupled Receptors, Immunological and Cardiovascular Parameters Identifies Distinct Patterns in Post-Infectious vs. Non-Infection-Triggered Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Front Immunol*, 12, 644548.  
Impact Factor 2021: 8.786

SCHERBAKOV, N.†, SZKLARSKI, M.†, HARTWIG, J., SOTZNY, F., LORENZ, S., MEYER, A., GRABOWSKI, P., DOEHNER, W. & SCHEIBENBOGEN, C. 2020. Peripheral endothelial dysfunction in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *ESC Heart Fail*, 7, 1064-1071.  
Impact Factor 2020: 4.411

---

<sup>1</sup> \* Diese Publikationen wurden zur Vorstellung im Rahmen dieses Promotionsvorhabens ausgewählt.

<sup>2</sup> † Zwischen diesen Autor\*innen besteht eine geteilte Erstautorenschaft.



## 12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Carmen Scheibenbogen für die allzeit engagierte und offene Betreuung dieses Promotionsvorhabens.

Ich danke Prof. Dr. Patricia Grabowski für die Mitbetreuung und die Einblicke in die Arbeit der Fatigue-Ambulanz.

Weiterhin danke ich Sebastian Lorenz, Dr. Helma Freitag, Dr. Franziska Sotzny und Dr. Jelka Hartwig für konstruktive und kritische Diskussionen, welche diese Arbeit vorangetrieben haben.

Ich möchte mich herzlich bei Silvia Thiel und Sandra Bauer sowie dem Team des Charité Fatigue Centrums für ihre Unterstützung bedanken.

Ich danke allen Patient\*innen und Spender\*innen, die diese Forschung durch ihre Beteiligung möglich gemacht haben.

Schließlich gilt tiefer Dank meinen Eltern für die Unterstützung und Ermutigung und Sakshi Mudaliar für die Geduld und das Vertrauen.