

April 2021

**Institute of Medical Immunology,
Charité –Universitätsmedizin Berlin**

Kostenlose Übersetzung durch DeepL

Myalgische Enzephalomyelitis/chronisches Erschöpfungssyndrom (ME/CFS) ist eine erworbene und komplexe chronische Erkrankung, die mehrere körperliche Funktionen beeinträchtigt.

Die Diagnose nach den Kanadischen Konsensus-Kriterien umfasst ein Unwohlsein nach Belastung (Post Exertional Malaise, PEM), eine Exazerbation der Symptome und eine verlängerte Erholungsphase, die der auslösenden Aktivität nicht angemessen ist.

Darüber hinaus bestehen bei den Patienten Anzeichen für neurologische und autonome Beeinträchtigungen, Schlafstörungen, Schmerzen, kognitive,

gastrointestinale und immunologische Symptome (1). Mit einer geschätzten Prävalenz von 0,86 % geht sie mit erheblichen Langzeitauswirkungen auf das persönliche Leben und das Gesundheitssystem einher (2).

Die Abgrenzung der Assoziation zwischen löslichem CD26 und Autoantikörpern gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, immunologischen und kardiovaskulären Parametern identifiziert unterschiedliche Muster bei postinfektiöser vs. nicht-infektiöser Myalgischer Enzephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrom

Soluble cluster of differentiation 26 (sCD26) hat eine Vielzahl von enzymatischen Funktionen, die immunologische, metabolische und vaskuläre Regulationen beeinflussen. Verminderte sCD26-Konzentrationen wurden bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen und auch bei Myalgischer Enzephalomyelitis/Chronic

Fatigue Syndrom (ME/CFS) berichtet.

Hier bewerten wir sCD26 als diagnostischen Marker neu und führen eine umfassende Korrelationsanalyse der sCD26-Konzentrationen mit klinischen und paraklinischen Parametern bei ME/CFS-Patienten durch. Obwohl diese Studie signifikant niedrigere Konzentrationen von sCD26 nur in der weiblichen Kohorte fand und die diagnostische Eignung nicht bestätigen konnte, liefern die Ergebnisse der Korrelationsanalysen auffällige pathomechanistische Erkenntnisse.

Bei Patienten mit infektionsgetriggertem Krankheitsbeginn weisen die Assoziationen von niedrigem sCD26 mit erhöhten Autoantikörpern (AAB) gegen alpha1 adrenerge (AR) und M3 muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) auf einen Pathomechanismus der infektionsgetriggerten autoimmunvermittelten vaskulären und immunologischen Dysregulation hin.

Es wurde festgestellt, dass die sCD26-Konzentrationen bei infektionsgetriggertem ME/CFS mit aktivierten T-Zellen, Leberenzymen, Kreatinkinase (CK) und Laktatdehydrogenase (LDH) und invers mit Interleukin-1 beta (IL-1b) assoziiert sind. Die meisten Assoziationen stehen im Einklang mit den bekannten Effekten der sCD26/DPP-4-Inhibition. Bemerkenswerterweise weisen bei nicht-infektiös ausgelöstem ME/CFS niedrigere sCD26-Werte bei Patienten mit höherer Herzfrequenz nach orthostatischer Herausforderung und posturalem orthostatischem Tachykardiesyndrom (POTS) auf einen Zusammenhang mit der orthostatischen Regulation hin.

Diese Befunde liefern Hinweise darauf, dass das Schlüsselenzym sCD26 mit immunologischen Veränderungen bei infektionsgetriggertem ME/CFS verbunden ist und beschreiben einen anderen Pathomechanismus bei der nicht-infektiösen ME/CFS-Untergruppe.

Der Pathomechanismus des ME/CFS ist noch nicht geklärt, aber es gibt zahlreiche Hinweise auf einen beteiligten Autoimmunprozess (3).

Der Ausbruch des ME/CFS folgt bei etwa zwei Dritteln der Patienten auf eine Infektion (4). Verschiedene Erreger können ME/CFS auslösen, wobei das Epstein-Barr-Virus (EBV) am besten untersucht ist (5). Autoantikörper (AAB) gegen Kern- und Membranstrukturen sowie Neurotransmitterrezeptoren einschließlich des muskarinischen cholinergen Rezeptors M3/M4-Antikörper (M3-mAChR/M4-mAChR) und des beta-1- und -2-adrenergen Rezeptors (beta1-AR/beta2-AR) sind bei Patienten mit ME/CFS beschrieben worden (3, 6-8).

Diese Antikörper gehören zu einem Netzwerk von natürlichen Antikörpern gegen adrenerge, cholinerge und andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), von denen gezeigt wurde, dass sie bei

verschiedenen Autoimmunerkrankungen dysreguliert und dysfunktional sind (9). Unterstützt werden diese Befunde durch die Komorbidität von ME/CFS mit anderen Autoimmun-assoziierten Erkrankungen wie Hashimoto-Thyreoiditis, Sjogren-Syndrom und entzündlichem Darmsyndrom (10, 11). Autoimmun-assoziierte Risikovarianten in den Genen für Protein-Tyrosin-Phosphatase-Nicht-Rezeptor-Typ 22 (PTPN22) und zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4 (CTLA4) wurden in einer kürzlich durchgeführten Studie mit infektionsausgelöstem ME/CFS in Verbindung gebracht (12).

Es gibt keine eindeutigen Hinweise, dass proinflammatorische Zytokine eine Rolle spielen (13).

Cluster of differentiation 26 (CD26), auch bekannt als Dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4), ist eine Serinprotease mit einer Vielzahl von enzymatischen und nicht-enzymatischen Funktionen, die die

Aktivierung von Immunzellen, die vasomotorische Anpassung und die Stoffwechselregulation beeinflussen.

CD26 wird auf der Oberfläche vieler Zellen, einschließlich Immunzellen, exprimiert. Durch Shedding entsteht eine lösliche Form, die aus dem extrazellulären Teil besteht (14). Lymphozyten gelten als Hauptquelle für lösliches CD26 (sCD26) und setzen bei Aktivierung große Mengen an vorgespeichertem, proteolytisch aktivem sCD26 frei (15, 16). Die zelluläre CD26-Expression auf T-Zellen wird bei der Aktivierung hochreguliert und erleichtert die Co-Stimulation, Aktivierung und Proliferation von T-Zellen (17, 18). In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, dass DPP-4-Inhibitoren die Proliferation von T-Zellen abschwächen (19).

Verminderte Konzentrationen von sCD26 wurden bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen gefunden, darunter rheumatoide Arthritis, Antineutrophile zytoplasmatische

Antikörper (ANCA)-assoziierte Vaskulitiden und entzündliche Darmerkrankungen, und es wurde gezeigt, dass sie negativ mit Krankheitsaktivität und Entzündungsmarkern korrelieren (20-22). In einer Untergruppe von ME/CFS-Patienten wurde ebenfalls über verminderte Konzentrationen von sCD26 berichtet und vorgeschlagen, sich als diagnostischer Biomarker zu eignen (23). Zwei weitere Studien analysierten die CD26-Oberflächenexpression auf Lymphozyten bei ME/CFS. Eine fand eine höhere Anzahl von CD26+ CD4+ T-Zellen bei ME/CFS-Patienten mit postviralem im Vergleich zu nichtviralem Ausbruch (24). In der anderen Studie korrelierte die Lebensqualität mit den CD26-Expressionswerten (25).

In dieser Studie versuchen wir, die Eignung von sCD26 als diagnostischer Marker bei ME/CFS-Patienten neu zu bewerten. Aufgrund der Dysregulation von sCD26 bei Autoimmunität und ME/CFS kann die weitere Aufklärung seiner Assoziation mit

klinischen und Laborparametern helfen, seine Rolle bei ME/CFS zu verstehen. Um dies zu erreichen, haben wir hier eine Korrelationsanalyse von sCD26 mit verschiedenen klinischen und paraklinischen Parametern durchgeführt, um weitere Erkenntnisse über die mögliche Rolle von sCD26 bei ME/CFS zu gewinnen.

Methoden

Menschliche Blutproben

Die Patienten wurden in der Ambulanz für Immundefekte am Institut für Medizinische Immunologie der Charité Universitätsmedizin Berlin diagnostiziert. Die Diagnose ME/CFS basierte auf den Kanadischen Konsensus-Kriterien von 2003 und dem Ausschluss anderer medizinischer oder neurologischer Erkrankungen, die Müdigkeit verursachen können. Der Krankheitsbeginn mit einer Infektion wurde in der Anamnese der Patienten erfasst.

Gesunde Kontrollen (HC) wurden aus der Belegschaft rekrutiert und litten nicht an einer Krankheit, die ihre Gesundheit und körperliche Funktion relevant beeinträchtigte. Bei den Kontrollen wurden jedoch weder klinische noch Laboruntersuchungen durchgeführt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki von 1964 und ihren späteren Änderungen genehmigt. Alle Patienten und HC gaben eine informierte Zustimmung.

sCD26, Autoantikörper (AAB) und Laboruntersuchung

sCD26 wurde im Serum mit dem Human CD26 Platinum ELISA (Thermo Fisher Scientific) gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Alpha1/2-Adrenorezeptor (Alpha1-AR/alpha2-AR)-AAB, beta1-AR-/beta2-AR/beta3-AR-AAB, M3-mAChR-/M4-mAChR-AAB sowie Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT1-R)-

AAB und Endothelin-Rezeptor A und B (ETA-R/ETB-R)-AAB wurden mittels ELISA-Technologie von CellTrend GmbH (Luckenwalde, Deutschland) bestimmt.

Die Routinelaborwerte wurden im Diagnostiklabor der Charité (Labor Berlin GmbH, Berlin, Deutschland) bestimmt. Der Interleukin 1 (IL-1b)-Spiegel wurde in Vollblutproben nach 4-stündiger Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) bestimmt.

CD26 Oberflächenexpression auf Immunzellen

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) von gesunden Probanden wurden aus heparinisiertem Vollblut durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert und 1×10^6 PBMCs wurden mit dem LIVE/DEAD™ Fixable Aqua dead cell stain kit (Life Technologies) für 15 min angefärbt, gefolgt von einer extrazellulären Färbung. Zunächst wurde CCR7 PerCp Cy 5.5 gefärbt (Klon G043H7,

Biolegend) für 15 min bei 37 °C, gefolgt von CD3 AF700 (Klon OKT3, Biolegend), CD4 BV605 (Klon RPA-T4, BD Biosciences), CD8 PB (Klon SK1, Biolegend), CD45 RA FITC (Klon HI100, Biolegend), CD56 APC-Cy7 (Klon HCD56, Biolegend), CD19 PE-Cy7 (Klon HIB19, Biolegend), CD26 APC (Klon BA5b, Biolegend) für 15 min bei 4°C. Die unspezifische Bindung von Fc-Rezeptoren wurde mit 2% polyklonalem IgG (Flebogamma) blockiert.

Die CD26-Oberflächenexpression wurde mit dem CytoFLEX LX (Beckman Coulter) gemessen und die Daten wurden mit der FlowJo Software 10.0.08 analysiert. Die Gating-Strategien sind in den ergänzenden Informationen dargestellt.

Fragebögen zur Symptombeurteilung

Das Vorhandensein und der Schweregrad von Symptomen bei Patienten mit ME/CFS wurde mit Hilfe eines Fragebogens bewertet, der auf den Kanadischen Konsensus-Kriterien von 2003 basiert (1, 26).

Die Kardinalsymptome Müdigkeit, Muskelschmerzen, Immunsymptome (Mittelwert der 3 Symptome schmerzhaftes Lymphknoten, Halsschmerzen und grippeähnliche Symptome) und kognitive Beeinträchtigung (Mittelwert der 3 Symptome Gedächtnisstörung, Konzentrationsfähigkeit und geistige Müdigkeit) wurden von den Patienten zwischen 1 (keine Symptome) und 10 (schwerste Symptome) bewertet. Die Symptome der autonomen Dysfunktion wurden mit dem Composite Autonomic Symptom Score 31 (COMPASS 31) bewertet (27).

Darüber hinaus wurde die Behinderung mit dem Bell-Score untersucht, der sich auf den Grad der Einschränkung der täglichen Funktionsfähigkeit konzentriert (28), und die Müdigkeit mit dem Chalder Fatigue Score (29).

Der Grad der körperlichen Aktivität im täglichen Leben wurde mit dem Short Form Health Survey (SF-36) (30) erfasst.

Statistische Auswertung

Statistische Datenanalysen wurden mit IBM SPSS Statistics 22.0, GraphPad Prism 6.0 und R 4.0 durchgeführt. Alle Daten wurden als Median mit Interquartilsbereich (IQR), Mittelwert mit Standardabweichung (SD) oder Anzahl (n) mit Prozentsatz zusammengefasst. Vergleiche von quantitativen Parametern zwischen einem Gruppenpaar wurden mit dem Mann-Whitney-U-Rangsummentest durchgeführt.

Für den Vergleich von quantitativen Parametern zwischen Altersgruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-hoc-Analyse verwendet. Kategorische Parameter wurden zwischen Untergruppen mittels Chi²-Test verglichen.

Für die Bewertung von sCD26 als diagnostischer Marker wurde die Fläche unter der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve geschätzt. Die

Korrelationsanalyse wurde mit dem nichtparametrischen Spearman-Koeffizienten durchgeführt.

Aufgrund von Mehrfachtests wurde die Benjamini-Yekutieli (BY)-Korrektur für jede Art von korrelierten Daten angewandt, mit dem Ziel, eine Falschentdeckungsrate von 5 % unter Berücksichtigung möglicher Abhängigkeiten zwischen den Parametern zu kontrollieren. Angepasste p-Werte $<0,05$ wurden als Beweis für ein statistisch signifikantes Ergebnis angesehen.

Signifikante Korrelationen mit sCD26 und ihre Interkorrelationen wurden als Netzwerkgraphen dargestellt. Die Netzwerkgraphen wurden mit dem Fruchterman-Reingold-Algorithmus aus dem Paket "igraph" (31) erstellt.

Dieser Algorithmus wurde speziell deshalb gewählt, weil die modellierten Kräfte dazu neigen, die am häufigsten verwendeten Eckpunkte (Punkte) zu zentrieren, während sich die weniger häufigen außen befinden (kräftegeleiteter Graph). Die bidirektionale

schrittweise multiple Regressionsanalyse wurde nach der Log-Transformation der Daten durchgeführt, um die Kriterien der normalverteilten Residuen zu verbessern. Alter und Geschlecht wurden als mögliche Confounder einbezogen.

Ergebnisse

Patienten-Kohorte

Die Konzentrationen von sCD26 wurden bei 205 Patienten mit ME/CFS und 98 HC analysiert. Das mediane Alter der Patienten betrug 43 (IQR: 33-51) Jahre. 71% der Patienten waren weiblich und bei 72% wurde ein infektiöser Ausbruch der Erkrankung angegeben.

Zwei Patienten machten keine Angaben zum Krankheitsbeginn. Der mediane Krankheitsbeginn lag 4 (IQR: 2-9) Jahre vor der Meldung in der Klinik. HC waren im Mittel 14 Jahre jünger als ME/CFS-Patienten (29a (IQR: 26-38)) und 50% waren Frauen (Tabelle 1). Dieser Mismatch

wurde in den Analysen berücksichtigt.

Mehrere Patienten berichteten über Komorbiditäten. 43 % der Patienten litten an Allergien, während 34 % über Nahrungsmittelunverträglichkeiten berichteten und 66 % unter Symptomen eines Reizdarmsyndroms (IBS) litten. Eine Hashimoto-Thyreoiditis lag bei 11 % der Patienten vor, eine Fibromyalgie bei 10 %. 16 % der Patienten litten an einem posturalen orthostatischen Tachykardiesyndrom (POTS) (Komorbiditäten siehe ergänzende Tabelle S1).

sCD26-Konzentrationen bei Patienten und HC

Insgesamt betrug der Median der sCD26-Konzentration bei ME/CFS-Patienten 648 ng/ml (IQR: 447-814) und unterschied sich nicht von HC mit 670 ng/ml (IQR: 543-797). Als wir unsere Kohorte in männliche und weibliche Patienten stratifizierten,

waren die sCD26-Konzentrationen bei weiblichen ME/CFS-Patienten im Vergleich zu männlichen signifikant niedriger (p : 0,007). Bei HC wurde kein Unterschied zwischen den Geschlechtern gefunden.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsache führten wir Vergleiche mit HC getrennt für jedes Geschlecht durch. Die Konzentrationen von sCD26 waren bei weiblichen Patienten signifikant niedriger als bei weiblichen HC (p : 0,013), während kein Unterschied zwischen männlichen Patienten und HC gefunden wurde (Abbildung 1A).

Bei Stratifizierung nach Art des Krankheitsausbruchs waren die sCD26-Konzentrationen bei männlichen Patienten mit infektionsgetriggertem ME/CFS signifikant höher als bei Patienten ohne infektionsgetriggerten Krankheitsausbruch (p : 0,035). Die löslichen CD26-Konzentrationen unterschieden sich bei weiblichen Patienten nicht zwischen den Onset-Untergruppen (Abbildung 1B). Es wurden keine Unterschiede in den

sCD26-Konzentrationen gesehen, wenn Patienten und HC nach drei Hauptaltersgruppen unterteilt wurden (Abbildung 1C). Bei der Analyse der Altersgruppen von ME/CFS und HC innerhalb der Geschlechter war der Kruskal-Wallis-Test insgesamt in der weiblichen Gruppe signifikant ($p: 0,009$), aber keiner der Unterschiede zwischen den Altersgruppen blieb in Post-hoc-Analysen signifikant (Abbildung 1D).

In der männlichen Gruppe wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (Kruskal-Wallis $p: 0,326$; Abbildung 1E).

Eine frühere Studie legte nahe, dass sCD26 ein potentieller diagnostischer Biomarker für ME/CFS ist (23). Unter Berücksichtigung der Ungleichheit von Alter und Geschlecht zwischen ME/CFS-Patienten und HC in dieser Studie führten wir ROC-Analysen durch (Abbildung 2). Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) des Modells von nur Geschlecht und Alter zur Unterscheidung von ME/CFS von HC (AUC: 0,736, 95% Konfidenzintervall (CI): 0,674 -

0,798) verbesserte sich nicht signifikant nach Hinzufügen von sCD26 (AUC: 0,754, 95% CI: 0,695-0,814) (Abbildung 2A). Ein ähnliches Ergebnis wurde gefunden, wenn man weibliche Patienten von weiblichen HC nur durch das Alter (AUC: 0,687, 95% CI: 0,596-0,779) sowie Alter und sCD26 (AUC: 0,733, 95% CI: 0,649-0,817) unterscheiden wollte (Abbildung 2B). In dieser Studie zeigte sCD26 damit keinen ausreichenden diagnostischen Wert.

Korrelation von sCD26 mit klinischen Parametern

Um Effekte und Wechselwirkungen von sCD26 zu bewerten, führten wir Korrelationsanalysen mit klinischen sowie paraklinischen Parametern durch. Da eine Abweichung der sCD26-Konzentrationen von HC nur bei weiblichen Patienten

beobachtet wurde, konzentrierten wir uns auf diese Gruppe. Die Patienten wurden aufgrund des angenommenen Unterschieds im Pathomechanismus nach infektionsgetriggertem oder nicht-infektionsgetriggertem Auftreten stratifiziert (Tabelle 2A zeigt die signifikanten Korrelationen, alle Daten sind in den ergänzenden Tabellen S2A-D dargestellt).

Bei Patientinnen mit infektionsgetriggertem ME/CFS korrelierte sCD26 mit dem Schweregrad der immunassoziierten Symptome ($r: 0,241$; $p: 0,019$) und zeigte eine inverse Korrelation mit dem Herzfrequenzanstieg während orthostatischer Herausforderung ($-0,211$; $p: 0,041$). Bei Patienten ohne infektionsbedingten Auslöser waren niedrigere sCD26-Konzentrationen mit POTS assoziiert ($p: 0,021$). In Übereinstimmung damit korrelierte sCD26 invers mit der Herzfrequenz im Sitzen ($r: -0,445$; $p: 0,007$) und Stehen nach 0 ($-0,566$;

p: <0,001), 2 (-0,433; p: 0,008), 5 (-0,558; p: <0,001) und 10 (-0,501; p: 0,025) Minuten orthostatischer Belastung.

Wir fanden keine Korrelation zwischen sCD26 und den Symptomen der Patienten nach Adjustierung für Mehrfachtests. Bei Patienten ohne infektionsbedingten Ausbruch blieben die inversen Korrelationen der sCD26-Konzentrationen mit der Herzfrequenz nach 0 und 5 Minuten orthostatischer Herausforderung signifikant.

Korrelation von sCD26 mit immunologischen und Laborparametern

Mehrere Korrelationen mit immunologischen Laborparametern wurden beim infektionsgetriggerten ME/CFS bei Frauen gefunden. Lösliches CD26 korrelierte mit dem Prozentsatz der CD8+ T-Zellen, die den Aktivierungsmarker HLA-DR+ exprimieren (r: 0,299; p: 0,005) und der Anzahl der

CD4+CD8+ T-Zellen (r: 0,270; p: 0. 009), während es umgekehrt mit Lymphozyten (r: -0,249; p: 0,017), CD3+ (r: -0,207; p: 0,048) und CD4+ (r: -0,221; p: 0,034) T-Zellen und LPS-stimuliertem IL-1b (r: -0,309; p: 0,005) korrelierte. Außerdem korrelierte sCD26 mit den Spiegeln der Enzyme Laktatdehydrogenase (LDH) (r: 0,228; p: 0,020), Kreatinkinase (CK) (r: 0,329; p: 0,001), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)/Alanin-Aminotransferase (ALT) (r: 0. 271; p: 0,006), Glutamat-Oxalosäure-Transaminase (GOT)/Aspartat-Aminotransferase (AST) (r: 0,252; p: 0,010) und Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) (r: 0,203; p: 0,040). Es wurde eine inverse Korrelation zwischen sCD26 und den Spiegeln von AAB gegen alpha1-AR (r: -0,286; p: 0,004) und M3-mAChR (r: -0,303; p: 0,002) festgestellt (Tabelle 2A).

Im Gegensatz dazu wurden bei Patienten ohne infektionsbedingten Ausbruch keine der oben genannten Korrelationen

gesehen und Spearman's r deutete sogar auf eine inverse Beziehung für einige Parameter hin. Das lösliche CD26 korrelierte in dieser Untergruppe nur mit dem Phosphat ($r: 0,353$; $p: 0,032$) und invers mit dem Immunglobulin A (IgA)-Spiegel ($-0,366$; $p: 0,022$).

Nach Anwendung der BY-Korrektur blieb keine der Korrelationen mit den Laborparametern signifikant. Interessanterweise beobachteten wir ähnliche Korrelationsmuster bei männlichen Patienten (Tabelle 2B, alle Daten in den ergänzenden Tabellen S3A-D) sowie bei der gesamten ME/CFS-Kohorte (Tabelle 2C, alle Daten in den ergänzenden Tabellen S4A-C). Dies gilt insbesondere für die inversen r -Werte für Korrelationen zwischen sCD26 und AAB. In der gesamten ME/CFS-Kohorte blieben die meisten Korrelationen mit sCD26 nach der BY-Korrektur signifikant, wahrscheinlich aufgrund der höheren Anzahl (Tabelle 3).

Signifikante Korrelationen zwischen sCD26 und Laborparametern und deren Interkorrelationen wurden in einem Netzwerkdiagramm visualisiert (Abbildung 3). Bei Patienten mit infektionsgetriggertem Ausbruch beobachteten wir starke Interkorrelationen zwischen Markern für Organfunktion und -schädigung GPT, GOT, GGT, LDH und CK sowie AAB. Weiterhin zeigten Analysen inverse Korrelationen von HLA-DR+ exprimierenden CD8+ T-Zellen und LDH mit alpha1-AR-AAB. CK korrelierte invers mit IL-1b.

Regressionsanalysen für sCD26

Basierend auf den signifikanten Korrelationen nach BY-Korrektur (Tabelle 3) führten wir eine multiple Regressionsanalyse für sCD26 durch, um die Stärke der Assoziationen zu quantifizieren. Da die Korrelationsanalysen erhebliche Unterschiede zwischen den Onset-Gruppen zeigten, konzentrierten wir uns auf Patienten mit

infektionsgetriggertem ME/CFS. Geschlecht und Alter wurden als mögliche Confounder einbezogen. Das Modell war signifikant ($p: <0,001$) mit einem adjustierten R^2 von 0,325. Eine bidirektionale schrittweise Regression ergab das am besten passende Modell (adjustiertes R^2 : 0,344; $p: <0,001$), bestehend aus den in Tabelle 4 dargestellten Parametern.

In Abbildung 4 sind die vorhergesagten $\log(sCD26)$ -Werte gegen die realen Werte aufgetragen (siehe ergänzende Abbildungen S1A-C) für zusätzliche diagnostische Plots bezüglich dieser linearen Regressionsanalyse).

CD26-Expression auf Immunzellen

In einer Kohorte von HC (n: 12) und ME/CFS (n: 12) Patienten analysierten wir Immunzellen auf ihre CD26-Oberflächenexpression. Das mediane Alter der analysierten ME/CFS-Patienten betrug 53 Jahre (IQR: 33-57), das mediane Alter der HC-Patienten 34 Jahre (IQR: 29-42). Alle analysierten Probanden waren

weiblich. Wir beobachteten signifikant erhöhte Häufigkeiten von CD26 exprimierenden CD4+ T-Zellen ($p: 0,018$), aber keinen Unterschied in der Expressionshöhe von CD26 (Median Fluoreszenzintensität (MFI)) pro Zelle (Abbildung 5, Gating-Strategie in Supplementary Figure S2).

Diskussion

In dieser Studie haben wir sCD26 im Kontext von ME/CFS neu evaluiert. Obwohl wir seine diagnostische Eignung nicht bestätigen konnten, liefern die Ergebnisse der Korrelationsanalysen einige auffällige pathomechanistische Erkenntnisse.

Unsere Studie stimmt teilweise mit einer früheren Studie überein, in der 73 Patienten mit ME/CFS mit 122 HC verglichen wurden, die verminderte Konzentrationen von sCD26 aufwiesen (23). Wir fanden niedrigere Konzentrationen von sCD26 nur bei weiblichen ME/CFS-Patienten im Vergleich zu weiblichen HC. Die ROC-Analyse in

unserer Studie konnte die diagnostische Eignung von sCD26 nicht nachweisen. Weiterhin fanden Fletcher et al. in Übereinstimmung mit unseren Befunden einer erhöhten Häufigkeit von CD26 exprimierenden CD4+ T-Zellen eine erhöhte Anzahl von T- und NK-Zellen, die CD26 bei ME/CFS exprimieren. Die CD26-Expressionsmenge pro Zelle war in unserer Studie bei ME/CFS nicht erhöht und Fletcher et al fanden sogar eine Abnahme der CD26-Expressionsmenge auf T-Zellen und NK-Zellen. Der zugrundeliegende Mechanismus von reduziertem sCD26 bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen ist noch nicht geklärt. Eine aktuelle Studie zeigte, dass sCD26/DPP-4 in T-Zellen in sekretorischen Granula zusammen mit Granzymen und Perforin gespeichert wird. Bei Stimulation führt Degranulation zu einer massiven Freisetzung von proteolytisch aktivem sCD26/DPP-4 (16). In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, dass die Serumkonzentration von sCD26 vom Aktivierungszustand der T-Zellen abhängt (15).

Außerdem fanden wir bei männlichen Patienten mit postinfektiösem Beginn höhere sCD26-Konzentrationen im Vergleich zu nichtinfektiösem Beginn. In einer früheren Studie lieferten Porter et al. Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation von CD26 zwischen den Onset-Subgruppen, da sie eine höhere Anzahl von CD26+CD4+ T-Zellen bei Patienten mit postviralem im Vergleich zu nichtviralem Onset ME/CFS fanden (24). Da wir die CD26-Expression nur in einer kleinen Untergruppe analysierten, konnten wir die Untergruppen nicht vergleichen.

Bei der Durchführung von Korrelationsanalysen stellten wir fest, dass die Konzentrationen von sCD26 mit immunologischen und kardiovaskulären Parametern sowie mit Leberenzymen und CK bei ME/CFS assoziiert sind.

Bemerkenswerterweise wurden die meisten Assoziationen nur bei Patienten mit infektionsgetriggelter Erkrankung beobachtet. Von den Korrelationen, die nach BY-Korrektur signifikant blieben, ist eines der auffälligsten Ergebnisse unserer

Studie die inverse Korrelation von alpha1-AR- und M3-mAChR-AAB mit sCD26 bei infektionsgetriggertem ME/CFS, aber nicht bei Patienten mit nicht-infektionsgetriggertem Ausbruch. Wir und andere fanden erhöhte beta1/2-AR- und M3-mAChR-AAB in einer Untergruppe von ME/CFS-Patienten (6). Erhöhte Spiegel von Autoantikörpern gegen alpha1-AR und M3-mAChR wurden auch bei Patienten mit orthostatischer Hypotonie und POTS gefunden (32, 33). In unserer Studie beobachteten wir eine inverse Korrelation zwischen alpha1-AR-AAB und dem Prozentsatz der HLA-DR+CD8+ T-Zellen. Es wurde gezeigt, dass T-Zellen auch alpha1-AR exprimieren, das eine Hemmung der T-Zellproliferation vermittelt (34). Daher ist es verlockend zu spekulieren, dass höhere alpha1-AR-AAB mit einer Hemmung der Aktivierung von T-Zellen verbunden sind, obwohl nicht bekannt ist, ob alpha1-AR-AAB den Rezeptor aktivieren können. In Übereinstimmung mit der Erkenntnis, dass aktivierte T-Zellen eine Hauptquelle von

sCD26 sind (15, 16), ist es plausibel, dass niedrigere Anteile von HLA-DR+ in CD8+ T-Zellen direkt mit niedrigerem sCD26 assoziiert sind.

Es wurde festgestellt, dass die IL-1-Freisetzung invers mit sCD26 assoziiert ist. Ein direkter enzymatischer Abbau von IL-1 durch sCD26 bleibt umstritten (35). Wir konnten in einer aktuellen Studie beobachten, dass beta2-AR-AAB die LPS-induzierte Tumornekrosefaktor (TNF)-Freisetzung hemmen, und ihre hemmende Funktion war bei ME/CFS mit höheren beta2-AR-AAB beeinträchtigt (36). Dies könnte eine Erklärung für die Assoziation von beta2-AR-AAB mit der IL-1-Freisetzung sein, die vor der BY-Korrektur bei Patienten mit infektionsgetriggertem Ausbruch beobachtet wurde. Wir fanden jedoch keine Korrelation von sCD26 mit der TNF-Freisetzung, was mit der Tatsache zusammenhängen könnte, dass diese Zytokine in Monozyten und Makrophagen unterschiedlich reguliert werden.

Weiterhin fanden wir eine starke Assoziation von GOT, GPT und GGT mit sCD26 in Übereinstimmung mit der bekannten Assoziation von DPP-4 mit Leber- und Fettgewebeentzündungen und seiner Expression auf Gallengängen (37-40). Da CD26 eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Blutzuckerspiegels spielt, indem es Glucagon-like-peptide 1 (GLP-1) spaltet (41), werden CD26/DPP-4-Inhibitoren häufig bei der Behandlung von Diabetes mellitus eingesetzt (42). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen verbessern DPP-4-Inhibitoren die Leberdysfunktion bei Diabetes mellitus Typ 2 (43). Die Korrelationen zwischen sCD26 und CK stimmen mit Berichten über sCD26 überein, das als Myokin aus Muskeln ausgeschieden wird (44). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Nacul et al. könnten niedrige sCD26-Werte bei ME/CFS bis zu einem gewissen Grad mit körperlicher Inaktivität und einem gestörten Muskel-Energiestoffwechsel in Verbindung mit PEM zusammenhängen (45). Eine

Korrelation von sCD26 mit LDH könnte durch seine Freisetzung durch Leberzellen sowie die oben diskutierte Reduktion des oxidativen Stresses, die als Folge der DPP-4-Hemmung beobachtet wurde, erklärt werden.

Wir beobachteten Korrelationen von sCD26-Konzentrationen mit dem Blutdruck bei Patienten mit infektionsgetriggertem Beginn, die jedoch nach BY-Korrektur nicht bestehen blieben. Bemerkenswerterweise blieb bei Patienten mit nicht infektionsgetriggertem Beginn die inverse Korrelation von sCD26 mit der Herzfrequenz bei orthostatischer Herausforderung bestehen. Patienten aus dieser Gruppe, die an POTS litten, hatten auch signifikant niedrigere sCD26-Konzentrationen. Ein niedriges Blutvolumen wurde bei POTS beschrieben und mit einer Störung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) in Verbindung gebracht (46, 47). Wir fanden eine Korrelation von sCD26 mit ACE in dieser Gruppe vor der BY-Korrektur. Die beobachteten Assoziationen in dieser

Gruppe könnten auf eine gestörte orthostatische Regulation hinweisen, die vorbestehende Störungen durch POTS verstärkt.

Da 95 % der DPP-4-Aktivität im Serum aus sCD26 stammen, haben wir versucht, eine mechanistische Erklärung für die Assoziation von sCD26 mit immunologischen, kardiovaskulären und Leberparametern bei den Patienten zu finden, basierend auf dem bekannten Effekt der DPP-4-Hemmung, der in verschiedenen Studien beobachtet wurde (14). Ein hypothetisches Modell der Regulation und Rolle von sCD26 bei Patienten mit ME/CFS ist in der ergänzenden Abbildung S3 dargestellt.

Beschränkungen und Stärken

Unsere Studie hat mehrere Einschränkungen. Die ME/CFS-Kohorte und die HC-Gruppe waren in Bezug auf Alter und Geschlecht nicht gut gematcht,

aber dies wurde in unseren Analysen berücksichtigt. Viele Assoziationen, die wir diskutieren, basieren auf dem Effekt von DPP-4-Inhibitoren. Wir haben die DPP-4-Aktivität von sCD26 nicht analysiert. Durinx et al. zeigten jedoch, dass die Dipeptidylpeptidase-Aktivität im Serum hauptsächlich von sCD26 stammt (14). Bei SLE korrelieren die Konzentrationen von sCD26 eng mit der DPP-4-Aktivität (48). Darüber hinaus kennen wir den Beitrag des zellulären CD26 zur gesamten DPP-4-Aktivität nicht.

Unser Konzept muss als hypothetisch betrachtet werden und bedarf der Bestätigung in weiteren Patientenkohorten und experimentellen Studien.

Die Stärke unserer Studie ist, dass wir den Nachweis erbringen, dass das Schlüsselenzym sCD26 mit immunologischen und kardiovaskulären Störungen bei ME/CFS verbunden ist. Die Assoziationen von sCD26 mit Autoantikörpern liefern weitere Hinweise

für den Autoimmun-Pathomechanismus des infektionsgetriggerten ME/CFS und die Abgrenzung von ME/CFS-Untergruppen (12). Diese Befunde können helfen, die Heterogenität der Symptome und Biomarker der Patienten zu erklären, die in den meisten Studien zum ME/CFS gefunden wurden (49).

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die in der Studie präsentierten Originalbeiträge sind im Artikel/Ergänzungsmaterial enthalten. Rückfragen können an den korrespondierenden Autor gerichtet werden.

Ethische Stellungnahme

Die Studien mit menschlichen Teilnehmern wurden von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin geprüft und genehmigt (EA2/038/14 und EA2/067/20). Die Patienten/Teilnehmer gaben ihre schriftliche, informierte Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie.