

Aus der I.Medizinische Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Anti-NMDAR2 Autoantikörper als potentielle Biomarker für Fatigue bei Patienten mit
rheumatischen Erkrankungen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Tatjana Marinoska
aus Struga, Nordmazedonien

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand:



1. Gutachter:



2. Gutachter:



Tag der Promotion:

30. Januar 2025

*Meinen Eltern die mich stets unterstützen
und meinem Sohn der mich inspiriert.*

Inhaltsverzeichnis

1	Deutsche Zusammenfassung.....	1
1.1	Einleitung.....	1
1.2	Material und Methoden.....	2
1.3	Ergebnisse.....	2
1.4	Diskussion.....	3
1.5	Literaturverzeichnis.....	7
2	Publikation	10
2.1	Introduction.....	10
2.2	Results.....	11
2.3	Discussion.....	19
2.4	Materials and methods.....	21
2.5	Conclusion.....	22
2.6	References.....	23
3	Danksagung.....	26
4	Tabellarischer Lebenslauf	27

1 deutsche Zusammenfassung

der Publikation: „**NMDA Receptors in Health and Diseases: New Roles and Signaling Pathways - Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR) Autoantibodies as Potential Biomarkers of Fatigue in Patients with Rheumatic Diseases**“

1.1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Mehr als 50 % aller Patienten mit rheumatischen Erkrankungen leiden unter Fatigue, ein überwältigendes, schwächendes und anhaltendes Erschöpfungsgefühl, das die motorischen und kognitiven Funktionen einer Person auf ein niedriges Niveau reduziert und zu erheblichen sozialen und ökonomischen Konsequenzen führt (1, 2).

Fatigue ist eines der frühesten unspezifischen Krankheitssymptome von Malignomen, zahlreichen chronisch-entzündlichen und immunologischen Erkrankungen und tritt besonders häufig bei rheumatischen Erkrankungen auf (2, 3).

Fatigue ist eine wichtige Determinante der gesundheitlichen Lebensqualität (QoL) bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen, selbst wenn die entzündliche Krankheitsaktivität in Remission ist (4). Obwohl die Komplikationen von Fatigue nicht lebensbedrohlich sind, kann ihre Chronizität erhebliche Auswirkungen auf mehrere Aspekte der Lebensqualität und der Erwerbsfähigkeit haben (5).

Trotz der großen klinischen Bedeutung und hohen Prävalenz von Fatigue bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen ist seine Pathophysiologie noch nicht vollständig geklärt (6). Bisher sind weder Biomarker noch experimentelle Tests zur objektiven Messung verfügbar. Deshalb basiert die Diagnose noch immer auf patientenbezogenen Fragebögen mit allen denkbaren Einschränkungen (4). In Anbetracht des einschränkenden Potentials dieses Phänomens hat die Entschlüsselung seiner zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen durch die Entwicklung genauerer Diagnoseverfahren und wirksamer Behandlung höchste Priorität in der rheumatologischen Forschung (6).

Anti-NR2-Antikörper sind eine Untergruppe von pathogenen anti-Doppelstrang-DNA (Anti-dsDNA)-Antikörpern, die mit einem einzelnen Epitop kreuzreagieren, das in GluN2 a/b-Untereinheiten der extrazellulären, Liganden-bindenden Domäne der NMDARs, NR2a und NR2b vorhanden ist (7).

Eine starke Korrelation der zirkulierenden Anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR)-Antikörper mit Fatigue wurde bereits bei Patienten mit SLE (Systemischer Lupus erythematodes) veröffentlicht (4). Des Weiteren wurden ähnliche Korrelationen zwischen kognitiver Dysfunktion und neuropsychiatrischen Manifestationen sowohl bei Patienten mit SLE als auch bei Patienten mit Sjögren Syndrom (SS) publiziert (8). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der beschriebene Zusammenhang auch für Patienten mit anderen entzündlichen und nicht-entzündlichen rheumatischen Erkrankungen gilt.

Die Anti-NMDAR-Antikörper sind bei Patienten mit SLE und SS sowohl im Blut als auch im Liquor und im Gehirn in situ vorhanden (9). Allerdings spiegeln die Autoantikörper im Serum nicht automatisch deren Vorhandensein im Liquor wider (10). Es wurde behauptet, dass der Status der Blut-Hirn-Schranke (BHS) für die Pathogenität der Anti NR2 Antikörper im Gehirn wichtig sein könnte (11).

Als Biomarker für neuronale Schäden und Degeneration kann das Neurofilament Light Protein (NfL) dienen. NfL ist Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts, das nach einer neuronalen Schädigung im Liquor und nachfolgend im Blut freigesetzt wird (12). Dies könnte Informationen über die Integrität der BHS liefern. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde untersucht, ob

erhöhte serologische NfL-Konzentrationen mit den Spiegeln von anti-NR2-Antikörpern assoziiert sind und ob diese Korrelation der Fatigue bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen entspricht.

1.2 Material und Methoden

Zwischen 2020 und 2022 wurden insgesamt 88 Patienten mit diversen rheumatischen Erkrankungen untersucht (Sjögren Syndrom, Systemischer Lupus Erythematodes, limitierte und diffuse Systemische Sklerose, rheumatoide Arthritis, Psoriasis Arthritis, Spondylarthritis, Arthrose und Fibromyalgiesyndrom), die im Rheumazentrum Rheinland-Pfalz, Bad Kreuznach (Deutschland) behandelt wurden und Teil dieser prospektiven Studie sind.

Serumproben von 88 Patienten wurden retrospektiv auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen die NR2-Untereinheit des NMDAR mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (NR2AT-IFA, Kat.-Nr. ENA100, DRD Biotech) gemäß den Anweisungen des Herstellers analysiert. Die Analyse des Serum-Neurofilament-Leichtketten (sNfL)-Spiegels wurde mithilfe der hochempfindlichen Einzelmolekül-Array-Technologie (SiMoA) bestimmt. Die Proben wurden in mehreren Durchgängen mit SiMoA HD-1 (Quanterix, USA) in Duplikaten unter Verwendung der NF-Light Advantage Kits (Quanterix) 13 gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen.

Parallel hierzu wurde der Fatigue-Schweregrad für motorische und kognitive Beeinträchtigung anhand des FMCS (Fatigue-Skala für Motorik und Kognition) Fragebogens erfasst. Der FMCS Fragebogen bietet die Möglichkeit, zwischen kognitiver und motorischer Fatigue zu unterscheiden und den Schweregrad in 4 Gruppen zu stratifizieren. Der Fatigue-Schweregrad wurde entsprechend mit dem zirkulierenden Antikörpertiter und dem NfL-Spiegel korreliert.

Die zusammengefassten Daten wurden einer explorativen statistischen Datenanalyse unterzogen. Alle Daten wurden hinsichtlich normaler oder nicht normaler Verteilung bewertet. Unterschiede in den Krankheitswerten wurden mithilfe des Mann-Whitney U- und H-Tests ermittelt. Die Korrelationen wurden durch die Rho-Korrelationsanalyse nach Spearman ermittelt. Statistische Analysen wurden mit SPSS PASW27 Statistics (IBM Corp., Somers, NY) berechnet. Die Abbildungen wurden mit GraphPad Prism für Windows (Microsoft, Redmond, WA) erstellt.

1.3 Ergebnisse

Unsere Kohorte umfasste 88 Patienten, 79 Frauen und 9 Männer, mit einem Durchschnittsalter von 50,97 Jahren, die gemäß den Fragebögen von Penner et al. an unterschiedlichen Graden kognitiver, motorischer und totaler Erschöpfung litten. Von den 88 in diese Studie einbezogenen Patienten litten 23 Patienten an einem Sjögren-Syndrom, 32 Patienten an systemischem Lupus erythematodes und 14 Patienten an einer anderen rheumatischen Autoimmunerkrankung (limitierte und diffuse systemische Sklerose, Polymyositis, rheumatoide Arthritis, IgG-4-assoziierte Erkrankung). Des Weiteren litten 7 Patienten an autoinflammatorischen Erkrankungen (Psoriasis-Arthritis, Spondyloarthritis) und 12 Patienten

an nicht-entzündlichen rheumatischen Erkrankungen (Osteoarthritis und Fibromyalgie). Dementsprechend wurden die Patienten in 5 Gruppen unterteilt.

Positive Titer (> 2ng/ml) an zirkulierenden Anti-NR2-Antikörpern waren bei ca. 50% aller Patienten mit autoimmunen rheumatischen Erkrankungen nachweisbar.

Ebenfalls wurden bei den Patienten mit autoinflammatorischen rheumatischen Erkrankungen (SPA, Psoriasis Arthritis) positive anti-NR2 Ak-Titer gefunden, die jedoch niedriger zu sein schienen.

Obwohl sich keine signifikante Korrelation zwischen Antikörpertitern und Fatigue-Schweregrad ergab, konnte gezeigt werden, dass die Rheumapatienten mit positiven Anti-NR2 Ak-Titern überwiegend unter schwergradiger Fatigue in allen Fatiguekategorien leiden, unabhängig von der Grunderkrankung.

In allen Patientengruppen korrelierte der zirkulierende NfL-Spiegel nicht mit dem Anti-NR2-Titer und dem Schweregrad der Fatigue.

1.4 Diskussion

N-Methyl-D-Asparaginsäure-Rezeptoren (NMDAR) gehören zu der Glutamat-Rezeptoren Familie im Zentralnervensystem (ZNS) (13) und sind für die aktivitätsabhängige synaptische Plastizität und die langfristige Potenzierung verantwortlich (9). Unter physiologischen Bedingungen kommen die NR2-Rezeptoren in besonders hoher Dichte bei Neuronen im Hippocampus, in der Amygdala und im Cortex vor, die für die zentralen Prozesse des Gedächtnisses, des Lernens und der Emotionen zuständig sind (13).

Eine fehlerhafte Funktion des NMDA-Rezeptors, vermittelt durch Antikörper, könnte zu verschiedenen neuropsychiatrischen Symptomen führen (9). De Giorgio et al. haben bereits 2001 in ihren experimentellen Studien gezeigt, dass die anti-ds-DNA Antikörper im Gehirn bei Patienten mit neuropsychiatrischem SLE durch eine Kreuzreaktivität auf den NMDA Rezeptoren den neuronalen Tod über einen apoptotischen Weg, ohne Anzeichen einer Entzündung, vermitteln und mit neurokognitiven Beeinträchtigungen assoziiert sind (14). Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen dem anti-NMDAR Antikörpertiter und depressiver Stimmung gefunden (7). Des Weiteren wurde eine Verbindung zwischen dem anti-NMDAR Antikörpertiter, vermindertem Kurzgedächtnis und verminderter Lernfähigkeit festgestellt (15). Darüber hinaus haben Lauvsnes et al. eine Korrelation dieser Autoantikörper mit der Hippocampus-Atrophie und kognitiver Beeinträchtigung nicht nur bei Patienten mit SLE, sondern auch bei Patienten mit pSS nachgewiesen (8).

Einen Zusammenhang zwischen den zirkulierenden Anti-NR2-Antikörpern und dem Fatigue-Schweregrad bei Patienten mit SLE wurde von Schwarting et al. 2019 gefunden (4).

In der vorliegenden Studie berichten wir, dass zirkulierende Anti-NR2-Antikörper nicht ausschließlich bei Fatigue-Patienten mit SLE vorhanden sind, sondern auch bei Fatigue-Patienten mit SS und anderen rheumatischen Autoimmunerkrankungen (limitierte und diffuse systemische Sklerose, Polymyositis, rheumatoide Arthritis, IgG 4-assoziierte Erkrankung).

Diese Verteilung steht im Einklang mit den pathogenetischen und phänotypischen Ähnlichkeiten sowie der häufigen Überschneidung von Erkrankungen in der Gruppe der

Autoimmunerkrankungen. Somit können wir die Ergebnisse einer aktuellen Metaanalyse (17 Studien) bestätigen, die eine erhöhte Prävalenz von Anti-NMDAR-Antikörpern bei SLE (24,6 %) und Sjögren-Syndrom (19,7 %) im Vergleich zu gesunden Menschen (7,6 %) beschreibt (16). Allerdings wurde in einer kürzlich publizierten Studie mit über 7.000 Probanden berichtet, dass Seroprävalenz, Immunglobulinklasse oder Titer von Serumantikörpern gegen Gehirnantigene (einschließlich Anti-NMDAR) keine Vorhersage für die Erkrankung machen (17). Obwohl die Antikörper Korrelationen zu einem Krankheitsphänotyp aufweisen können, ist oft nicht klar, ob die gleichen Antikörper an der Ätiologie beteiligt sind oder nur Teil der Krankheitsmanifestationen darstellen. Außerdem ist fraglich, ob diese Autoantikörper zur Beurteilung des Risikos, der Schwere und der Prognose bei Autoimmunerkrankungen verwendet werden können. Da einige gehirnreaktive Autoantikörper auch in einer Untergruppe von gesunden Personen zu finden sind, stellt sich die Frage, ob diese Autoantikörper tatsächlich an der Pathophysiologie beteiligt sind und als diagnostische Biomarker dienen können. Im Rahmen der klassischen paraneoplastischen Zustände sind die Autoantikörper gegen intrazelluläre Antigene ein sekundäres Ereignis auf die irreversible, durch T-Zellen vermittelte neuronale Apoptose. Im Gegensatz dazu sind die zerebralen Autoantikörper bei Neuromyelitis optica (NMO) und Multipler Sklerose primär pathogen hervorgerufen und vermitteln weitere Krankheitsmanifestationen (18).

Darüber hinaus haben wir bei Patienten mit autoinflammatorischen rheumatischen Erkrankungen (PsA, SpA) positive Anti-NR2-Antikörpertiter gefunden, allerdings scheint die Prävalenz positiver Titer in dieser Patientengruppe geringer zu sein. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Anti-NR2-Antikörper unabhängig von der Grunderkrankung eine individuelle Rolle in der Pathophysiologie der Fatigue spielen. Daher könnte der Nachweis von Anti-NR2-Antikörpern einen potenziellen Biomarker für Fatigue darstellen, der krankheitsunabhängig ist.

Obwohl wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Fatigue und dem Titer der Anti-NR2-Antikörper finden konnten, zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass Rheumapatienten mit positiven Anti-NR2-Titern in allen Fatiguekategorien überwiegend unter schwerer Fatigue leiden.

Zahlreiche Faktoren können die Konzentration der Anti-NR2-Antikörper im Plasma beeinflussen und dadurch das Verständnis darüber verschleiern, wie die zirkulierenden Spiegel die Pathophysiologie sowie die klinischen und Laborbefunde widerspiegeln (19). Es ist immer noch umstritten, ob eine Erhöhung der Anti-NR2-Antikörper im Gehirn der Patienten mit Autoimmunerkrankungen auf eine erhöhte intrathekale Synthese durch die Infiltration von Immunzellen, die sich im Gehirn niederlassen, oder auf einen Transport vom peripheren Blutkreislauf zum Liquor durch eine beschädigte Blut-Hirn-Schranke (BHS) zurückzuführen ist (4). Das Vorhandensein von Plasmazellen im zerebralen Parenchym legt nahe, dass die Antikörper zumindest teilweise lokal produziert werden könnten (20).

Kowal et al. fanden im Jahr 2016 heraus, dass Mäuse mit hohen Konzentrationen an Anti-NR2-Antikörpern keinen neuronalen Schaden erleiden, bis diese Antikörper die BHS durchbrechen (21). Offenbar verhindert eine intakte BHS den Transport von Anti-NR2 aus dem systemischen Kreislauf in das Gehirn (19). Somit unterscheiden die Spiegel der Anti-NR2-

Antikörper im Liquor eher zwischen Patienten mit oder ohne neurokognitive Manifestationen, einschließlich Fatigue, als zwischen zirkulierendem Anti-NR2-Spiegel. Wiederholte Liquorsammlungen zur Überwachung der Fatigue sind jedoch invasiv, können nicht regelmäßig durchgeführt werden und wir hielten dies bei unserem Patientenkollektiv für nicht durchführbar. Nur eine blutbasierte Messung von Anti-NR2-Antikörpern wäre für diese Patientenpopulation geeignet und könnte eine breite Anwendung in der klinischen Routine bieten.

Um mit blutbasierten Messungen gleichwertige Informationen wie mit einem Liquortest bereitzustellen, haben wir eine Kombination aus einem zirkulierenden Anti-NR2-Antikörpertiter und einem zirkulierenden NfL-Spiegel als zusammengesetzte Diagnostik verwendet. Zweitens untersuchten wir die Korrelation zwischen Anti-NR2-Antikörpertitern als hirnreaktive Autoantikörper und zirkulierenden NfL-Spiegeln als Biomarker für Beeinträchtigungen der BHS bei rheumatischen Patienten mit Fatigue.

NfL sind Strukturproteine des neuronalen Zytoskeletts, die ausschließlich in zentralen und peripheren Neuronen exprimiert werden (22). Nach einer neuronalen Schädigung aufgrund neurodegenerativer, entzündlicher, vaskulärer oder traumatischer Prozesse werden sie im Liquor und anschließend in geringerem Maße im Blut freigesetzt (12). Dementsprechend ist NfL ein vielversprechender Biomarker für neuronale Schäden bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und traumatischen Hirnverletzungen und kann zukünftige Raten des kognitiven Rückgangs vorhersagen (23). Darüber hinaus korreliert der NfL-Spiegel im Liquor (CSF NfL) mit der Beteiligung des Zentralnervensystems (ZNS) an entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, SLE und primärem Sjögren-Syndrom (24, 25). Lauvsnes et al. berichteten, dass steigende Konzentrationen von NfL im Liquor mit steigenden Spiegeln von Anti-NR2-Antikörpern im Liquor verbunden sind und kognitive Dysfunktion bei Patienten mit SLE sowie bei pSS widerspiegeln können (23).

Im Allgemeinen sind die Erhöhungen des NfL-Spiegels unspezifisch, da sie aus jedem Prozess resultieren können, der zu Nervenschäden führt. Dies wird oft als Hindernis für die Implementierung der Serum NfL Spiegel (sNfL) in der klinischen Routine angesehen. Allerdings ist Fatigue nicht auf bestimmte pathophysiologische Prozesse beschränkt und dieser Mangel an Spezifität könnte tatsächlich von Vorteil sein, da er die Erkennung eines breiten Spektrums potenzieller neuronaler Schäden mit diffuser oder polytooper Lokalisierung im Gehirn ermöglicht (12). Tjensvoll et al. berichteten im Jahr 2021, dass steigende NfL-Konzentrationen im Liquor mit steigenden Konzentrationen von Anti-NR2-Antikörpern im Liquor verbunden waren und kognitive Dysfunktionen bei Patienten mit SLE und pSS widerspiegeln (23). Darüber hinaus fanden sie keine Unterschiede in den Liquor-NfL-Konzentrationen zwischen Patienten mit SLE und pSS, was darauf hindeutet, dass die neuronale pathogenetische Wirkung von Anti-NR2-Antikörpern bei beiden Krankheiten mehr oder weniger ähnlich ist (23). Dennoch deuten mehrere Studien darauf hin, dass sNfL gleichwertige und angemessene klinische Informationen wie Liquormessungen liefern könnten. sNfL kann eine Vorhersage über einen kognitiven Rückgang und Veränderungen des Hippocampusvolumens sowie der fraktionierten Anisotropie im Corpus callosum ermöglichen (24).

Der Zusammenhang zwischen den sNfL-Spiegeln bei Patienten mit SLE und neuropsychiatrischen Manifestationen sowie die bildgebend dargestellten zerebralen Anomalien via Magnetresonanztomographie (MRT) wurden von Lauvsnes et. al. dokumentiert (24). Darüber hinaus beobachteten sie eine moderate Korrelation zwischen Liquor- und Plasma-NfL-Konzentrationen (24). Engel et al. berichteten über erhöhte sNfL-Werte bei SLE-Patienten mit fokaler ZNS-Beteiligung, während sich die sNfL-Werte von SLE-Patienten mit diffuser ZNS-Beteiligung und Beteiligung des peripheren Nervensystems (PNS) nicht von denen von SLE-Patienten ohne neuropsychiatrische Manifestationen unterschieden (12).

Allerdings haben wir in der vorliegenden Studie keine signifikante Korrelation zwischen den Anti-NR2-Antikörpertitern als gehirnreaktive Autoantikörper und den zirkulierenden NfL-Spiegeln bei rheumatischen Patienten mit Fatigue festgestellt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen von Lauvsnes et al. überein, welche über den fehlenden Zusammenhang zwischen Anti-NR2-Antikörpern und sNfL berichten (24). Darüber hinaus gab es bei rheumatischen Patienten mit positiven Anti-NR2-Titern keine Korrelation zwischen dem zirkulierenden NfL-Spiegel und dem Grad der klinischen Fatigue, was darauf hindeutet, dass nicht nur die neuronalen Schäden und die BHS-Integrität, sondern auch andere Faktoren an der Pathophysiologie von Anti-NR2-Antikörpern beteiligt sein könnten.

Die vorliegende Studie weist einige Einschränkungen auf. Zunächst wurden die Anti-NR2-Antikörpertiter anhand des Cut-offs für den ELISA-Assay kategorisch als positiv und negativ definiert. Um die Cut-off Werte genauer und die Ergebnisse akkurater zu bestimmen, sind breite Daten normaler gesunder Personen, die im ELISA negativ auf Anti-NMDA-Rezeptor-Antikörper getestet wurden, notwendig. Die zweite Einschränkung war die kleine Kohorte von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen und die unterschiedliche Anzahl von Teilnehmern in jeder Untergruppe. Schließlich wurden die Untersuchungen von Anti-NMDA-Rezeptor-Antikörpern und NfL nur an Blutproben durchgeführt und umfassten keine Liquorproben oder Ergebnisse von bildgebenden Verfahren wie cMRT.

Es gibt Hinweise darauf, dass Anti-NR2-Antikörper pathogen für das Gehirn sein könnten, da sie via neuronale Apoptose durch Exzitotoxizität diffuse kognitive Beeinträchtigungen hervorrufen (13).

Experimentelle Studien zeigen alternative Hypothesen, einschließlich eines reduzierten Energiestoffwechsels und immunmetabolischer Störungen (4). Die Mechanismen der Pathogenität könnten entscheidend für den Grad der Wiederherstellung der Gehirnfunktion sein. Während die exzitotoxische Zellyse zu einer irreversiblen Gewebeerstörung führt, wäre ein pathogener Effekt, der durch Zellsignalveränderungen und Internalisierung von Membranrezeptoren verursacht wird, durch die Entfernung von Antikörpern reversibel (18, 24, 26). Schwarting et al. zeigten in-vitro einen (möglicherweise reversiblen) verringerten ATP-Metabolismus in Astrozyten. Außerdem konnte in der Gruppe bei Patienten mit Fatigue und zirkulierendem Anti-NR2 über einen Zeitraum von 2 Jahren ein verringertes Hippocampusvolumen festgestellt werden. Dies deutet auf einen strukturellen Effekt einer Langzeitexposition gegenüber diesen Autoantikörpern hin (4).

Die klinischen Effekte sind auch vom Verteilungsmuster der betroffenen NMDA-Rezeptoren abhängig. Eine Schädigung des Hippocampus und des limbischen Systems führt durch

neuronal Apoptose zu Veränderungen im Stoffwechsel des Hippocampus und zur Beeinträchtigung des Gedächtnisses, während eine Atrophie der Amygdala mit emotionalen Störungen verbunden ist (4).

Daher spricht Fatigue bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen auf eine immunsuppressive Therapie an, insbesondere auf Glucocorticosteroide, Medikamente mit sowohl immunmodulatorischer als auch metabolischer und endokriner Wirkung. Ferner führt die Entfernung der Anti-NR2-Antikörper mittels Immunadsorption bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen, Long Covid-Syndrom, aber auch beim chronischen Erschöpfungssyndrom (CFS) häufig zu einer deutlichen Verbesserung oder sogar zu einer Remission der Symptomatik. Dieser vielversprechende Effekt der durchgeführten Immunadsorption weist auf einen eher reversiblen Wirkmechanismus von Anti-NR2-Antikörpern hin. Darüber hinaus unterstützt die Remission der Fatigue-Symptomatik, die mit sinkenden Antikörperspiegeln bei Patienten mit CFS und langem Covid-Syndrom einhergeht, diese Hypothese (27, 28).

Eine andere Theorie ist die Bedeutung einer Anti-NMDAR-Antikörper induzierten Unterfunktion oder Überfunktion auf die Genexpression. Die Signalübertragung von NMDARs reguliert die Genexpression einschließlich ihrer eigenen Expression (11). Die durch Anti-NMDAR-Autoantikörper induzierte veränderte Signalübertragung, unabhängig davon, ob sie an synaptischen oder extrasynaptischen Stellen auftritt, hätte vermutlich langfristige Auswirkungen auf die Genexpression, die das gesamte Profil der betroffenen Zelle verändern könnte. Dennoch sind die langfristigen Folgen einer vorübergehenden Exposition gegenüber Anti-NMDAR-Autoantikörpern auf Neuronen und Gliazellen weiterhin unbekannt und unerforscht (11).

Insgesamt sind weitere Studien erforderlich, um die Anti-NR2-Pathophysiologie zu untersuchen und herauszufinden, ob die mit den Anti-NR2-Antikörpern verbundenen zerebralen Manifestationen möglicherweise reversibel oder aufgrund eines neuronalen Todes statisch sind. Dies würde neue Ansätze in der Therapie der durch diese Antikörper vermittelten Krankheitsbilder bieten.

1.5 Literaturverzeichnis

1. Larssen, E., Brede, C., Hjelle, A., Tjensvoll, AB, Norheim, KB, Bårdsen, K., Jonsdottir, K., Ruoff, P., Omdal, R. and Nilsen, MM, **2019**. Fatigue in primary Sjögren's syndrome: a proteomic pilot study of cerebrospinal fluid. *SAGE open medicine*, 7 , p.2050312119850390
2. Overman, C. L., Kool, M. B., Da Silva, J. A., Geenen, R., The prevalence of severe fatigue in rheumatic diseases: an international study. *Clin Rheumatol* **2016**, 35 (2), 409-415.
3. Dantzer R, Heijnen CJ, Kavelaars A, Laye S, Capuron L. The neuroimmune basis of fatigue. *Trends Neurosci.* **2014** Jan;37(1):39-46. doi: 10.1016/j.tins.2013.10.003. Epub 2013 Nov 13. PMID: 24239063; PMCID: PMC3889707). (Riley WT, Rothrock N, Bruce B,

-
4. Schwarting, A., Möckel, T., Lütgendorf, F., Triantafyllias, K., Grella, S., Boedecker, S., Weinmann, A., Meineck, M., Sommer, C., Schermuly, I., Fellgiebel, A., Luessi, F., Weinmann-Menke, J., Fatigue in SLE: diagnostic and pathogenic impact of anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) autoantibodies. *Ann Rheum Dis* **2019**, *78* (9), 1226-1234.
 5. Mæland, E., Miyamoto, S. T., Hammenfors, D., Valim, V., Jonsson, M. V., Understanding Fatigue in Sjögren's Syndrome: Outcome Measures, Biomarkers and Possible Interventions. *Front Immunol* **2021**, *12*, 703079.
 6. Korte, S. M., Straub, R. H., Fatigue in inflammatory rheumatic disorders: pathophysiological mechanisms. *Rheumatology (Oxford)* **2019**, *58* (Suppl 5), v35-v50.
 7. Lapteva L, Nowak M, Yarboro CH, et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies, cognitive dysfunction, and depression in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **2006**;54(8):2505-2514. doi:10.1002/art.22031
 8. Lauvsnes, M. B., Beyer, M. K., Kvaløy, J. T., Greve, O. J., Appenzeller, S., Kvivik, I., Harboe, E., Tjensvoll, A. B., Gøransson, L. G., Omdal, R., Association of hippocampal atrophy with cerebrospinal fluid antibodies against the NR2 subtype of the N-methyl-D-aspartate receptor in patients with systemic lupus erythematosus and patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol* **2014**, *66* (12), 3387-3394
 9. Tay, S. H., Fairhurst, A.-M., & Mak, A. (2017). Clinical utility of circulating anti-N-methyl-d-aspartate receptor subunits NR2A/B antibody for the diagnosis of neuropsychiatric syndromes in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: An updated meta-analysis. *Autoimmunity Reviews*, *16*(2), 114–122.
 10. Tomalla, V., Schmeisser, M. J., & Weinmann-Menke, J. (2023). Mouse models, antibodies, and neuroimaging: Current knowledge and future perspectives in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (NPSLE). *Frontiers in psychiatry*, *14*, 1078607.
 11. Wollmuth, L. P., Chan, K., Groc, L., The diverse and complex modes of action of anti-NMDA receptor autoantibodies. *Neuropharmacology* **2021**, *194*, 108624.
 12. Engel, S., Boedecker, S., Marczyński, P., Bittner, S., Steffen, F., Weinmann, A., Schwarting, A., Zipp, F., Weinmann-Menke, J., Luessi, F., Association of serum neurofilament light chain levels and neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus. *The Adv Neurol Disord* **2021**, *14*, 17562864211051497.
 13. Nowling, T. K., Kral, M., Wolf, B., Gilkeson, G., Ruth, N. M., Formal neurocognitive function and anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in paediatric lupus. *Lupus Sci Med* **2021**, *8* (1).
 14. DeGiorgio, L A et al. "A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus." *Nature medicine* vol. (2001) *7*,11: 1189-93. doi:10.1038/nm1101-1189
 15. Omdal R, Brokstad K, Waterloo K, Koldingsnes W, Jonsson R, Mellgren SI. Neuropsychiatric disturbances in SLE are associated with antibodies against NMDA receptors. *Eur J Neurol.* **2005**;12(5):392-398. doi:10.1111/j.1468-1331.2004.00976.x
 16. Schramm, M. A., Venhoff, N., [NMDAR autoantibodies as biomarker for fatigue in SLE]. *Z Rheumatol* **2020**, *79* (1), 83-84.

-
17. Gastaldi, V.D., Wilke, J.B., Weidinger, C.A., Walter, C., Barnkothe, N., Teegen, B., Luessi, F., Stöcker, W., Lühder, F., Begemann, M. and Zipp, F., 2022. Factors predisposing to humoral autoimmunity against brain-antigens in health and disease Analysis of 49 autoantibodies in over 7000 subjects. *Brain, Behavior, and Immunity* **2022**, S0889-1591(22)00421-4.
18. Mader, S., Brimberg, L., Diamond, B., The Role of Brain-Reactive Autoantibodies in Brain Pathology and Cognitive Impairment. *Front Immunol* **2017**, 8, 1101.
19. Gulati, G., Iffland, P. H., 2nd, Janigro, D., Zhang, B., Luggen, M. E., Anti-NR2 antibodies, blood-brain barrier, and cognitive dysfunction. *Clin Rheumatol* **2016**, 35 (12), 2989-2997.
20. Bendorius M, Po C, Muller S, Jeltsch-David H. From Systemic Inflammation to Neuroinflammation: The Case of Neurolupus. *Int J Mol Sci.* **2018** Nov 13;19(11):3588. doi: 10.3390/ijms19113588. PMID: 30428632; PMCID: PMC6274746.
21. Kowal, C., DeGiorgio, L. A., Nakaoka, T., Hetherington, H., Huerta, P. T., Diamond, B., Volpe, B. T., Cognition and immunity, antibody impairs memory. *Immunity* **2004**, 21 (2), 179-88.
22. Zanella, I., Blasco, H., Filosto, M., Biasiotto, G., Editorial: The Impact of Neurofilament Light Chain (NFL) Quantification in Serum and Cerebrospinal Fluid in Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* **2022**, 16, 915115.
23. Tjensvoll, A. B., Lauvsnes, M. B., Zetterberg, H., Kvaløy, J. T., Kvikvik, I., Maroni, S. S., Greve, O. J., Beyer, M. K., Hirohata, S., Putterman, C., Alves, G., Harboe, E., Blennow, K., Gøransson, L. G., Omdal, R., Neurofilament light is a biomarker of brain involvement in lupus and primary Sjögren's syndrome. *J Neurol* **2021**, 268 (4), 1385-1394.
24. Lauvsnes, M. B., Zetterberg, H., Blennow, K., Kvaløy, J. T., Tjensvoll, A. B., Maroni, S., Beyer, M. K., Greve, O. J., Kvikvik, I., Alves, G., Gøransson, L. G., Harboe, E., Hirohata, S., Omdal, R., Neurofilament light in plasma is a potential biomarker of central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus. *J Neurol* **2022**, 269 (6), 3064-3074.
25. Kurki, P., Helve, T., Dahl, D., Virtanen, I., Neurofilament antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **1986**, 13 (1), 69-73.
26. Chang, E. H., Volpe, B. T., Mackay, M., Aranow, C., Watson, P., Kowal, C., Storbeck, J., Mattis, P., Berlin, R., Chen, H., Mader, S., Huerta, T. S., Huerta, P. T., Diamond, B., Selective Impairment of Spatial Cognition Caused by Autoantibodies to the N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *EBioMedicine* **2015**, 2 (7), 755-64.
27. Giannoccaro, M. P., Cossins, J., Sørland, K., Fluge, Ø., Vincent, A., Searching for Serum Antibodies to Neuronal Proteins in Patients With Myalgic Encephalopathy/Chronic Fatigue Syndrome. *Clin Ther* **2019**, 41 (5), 836-847.
28. Moghimi, N., Di Napoli, M., Biller, J., Siegler, J.E., Shekhar, R., McCullough, L.D., Harkins, M.S., Hong, E., Alaouieh, D.A., Mansueto, G. and Divani, A.A., **2021**. The neurological manifestations of post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection. *Current neurology and neuroscience reports*, 21(9), pp.1-17.

2 Publikation

Article

NMDA Receptors in Health and Diseases: New Roles and Signaling Pathways - Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR) Autoantibodies as Potential Biomarkers of Fatigue in Patients with Rheumatic Diseases

Tatjana Marinoska ^{1*}, Tamara Möckel ², Konstantinos Triantafyllias ^{1,2}, Sebastian Boegel ², Matthias Dreher ^{2,3}, Felix Luessi ^{3,4} and Andreas Schwarting ^{1,2,3*}

¹ Center for Rheumatic Disease Rhineland-Palatinate GmbH, Bad Kreuznach, Germany

² Division of Rheumatology and Clinical Immunology, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Germany

³ University Center for Autoimmune Disease, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Germany

⁴ Division of Neurology, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Germany

* Correspondence: Univ. Prof. Dr. Andreas Schwarting, schwarting@uni-mainz.de Tatjana Marinoska, tatjana_marinoska@yahoo.com, Tel. +49 152 54139669

Abstract: Fatigue is a widespread and complex symptom with motor and cognitive components; it is diagnosed predominantly by questionnaire. We recently published a correlation between anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antibodies and fatigue in patients with SLE (systemic lupus erythematosus). In the present study, we examined whether this association also applies to patients with other rheumatic diseases. Serum samples of 88 patients with different rheumatic diseases were analyzed for the presence of anti-NR2 antibodies and Neurofilament light chain (NfL) protein. The severity of fatigue was determined according to the FSMC questionnaire (Fatigue Scale for Motor and Cognitive Functions) and correlated with the circulating antibody titer and NfL level accordingly. Positive titers of anti-NR2 antibodies were detected in patients with both autoimmune and non-autoimmune rheumatic diseases. These patients suffer predominantly from severe fatigue. The circulating NfL level did not correlate with the anti-NR2 titer and the fatigue severity in all patient groups. The association of severe fatigue with circulating anti-NR2 antibodies in patients with rheumatic diseases, independently from the main disease, suggests an individual role of these autoantibodies in fatigue pathophysiology. Thus, the detection of these autoantibodies might be a helpful diagnostic tool in rheumatic patients with fatigue.

Keywords: anti-NMDAR2 antibodies; fatigue; rheumatic diseases; neurofilament light chain

1. Introduction

Fatigue is one of the most debilitating and frequent symptoms in rheumatic patients. It is a common feature of cancer and many chronic inflammatory and immunological diseases and is particularly prominent in rheumatological conditions. The prevalence of fatigue varies within rheumatic diseases; it is estimated as lowest in patients with osteoarthritis (35%) and highest in patients with fibromyalgia (82%) [1]. In contrast, the prevalence of fatigue in the general population defined as chronic fatigue syndrome ranges between 0.007 and 2.8% [2].

The clinical significance of chronic fatigue in patients with inflammatory rheumatic diseases is underlined by its association with lower self-reported health-related quality of life (QoL). While the complications of fatigue are not life-threatening, its chronicity can lead to severe debility, markedly

affecting mood, sleep, routine daily activities, work capacity and employment opportunities [3]. Rheumatic patients rank fatigue as one of their most disabling symptoms, even when inflammatory disease activity is under control [2]. In contrast to the clinical importance of fatigue in rheumatic diseases, its pathology remains poorly understood. No biomarkers or experimental tests for objective measurement of fatigue are yet available. Thus, self-report questionnaires continue to be the diagnostic gold standard, with many conceivable and established limitations.

The pathogenesis of fatigue, particularly in the setting of inflammatory rheumatic diseases, is not yet completely elucidated, but growing evidence suggests a multifaceted picture [3]. An association has been described with various psychological and physiological conditions, including depression, anxiety, dysfunctional and alexithymic psychological profile, pain, neuroticism and fibromyalgia [4,5]. Manzo et al. reported in 2019 a significant correlation between the fatigue severity and the presence of cognitive symptoms measured by objective cognitive tests, such as working and verbal memory dysfunction, attention disorders and alteration in executive functions [6].

However, psychological factors and profiles are not able to explain the markedly elevated prevalence of fatigue in patients with rheumatic diseases, implying the contribution of additional, still-unexplored molecular, genetic and metabolic factors to its development and regulation [5]. Therefore, fatigue is increasingly considered as a biological and brain phenomenon [7,8]. Autoantibodies are features of many rheumatic diseases, and several studies have explored a potential correlation between specific autoantibodies, fatigue and cognitive dysfunction. Most notably, a subset of pathogenic anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) antibodies cross-reacting with a single epitope present in GluN2 a/b subunits of the extracellular, ligand-binding domain of the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) have been identified as possible pathogenic factors closely associated with cognitive dysfunction, both in patients with SLE (systemic lupus erythematosus) and pSS (primary Sjögren's syndrome) [9–11]. Although their prevalence is markedly elevated in SLE and pSS patients with neuropsychiatric manifestations, anti-NMDAR antibodies are not restricted in these populations. In particular, autoantibodies to NMDAR subunit NR1 or voltage-gated potassium channel complex have been associated with limbic encephalitis [12].

We recently identified a strong correlation of circulating antibodies to the NMDAR subunit NR2 with fatigue in SLE patients [11]. In the present study, we explored the presence of these anti-NMDAR antibodies in patients with other inflammatory and non-inflammatory rheumatic diseases suffering from fatigue. In addition, we investigated the association of these autoantibodies with circulating neurofilament level, as a marker of neuronal damage and blood–brain barrier (BBB) breach.

2. Results

2.1 Demographic Characteristics of the Patients

Our cohort included 88 patients, 79 females and 9 males, with a mean age of 50.97 years and a mean of body-mass index (BMI) 26.29 kg/m² and suffering from different grades of cognitive, motoric and total fatigue, according to the questionnaires of Penner et al. [13] (Table 1).

Table 1. Demographic characteristics of the patients.

	<i>n</i>	Mean Value	Std. Deviation	Min.	Max.
Gender					
Female (%)	79 (89.77)				
Male (%)	9 (10.23)				
Age	88	50.97	13.26	21	81
BMI	88	26.29	6.39	15.89	53.2
FSMC total	88	73.02	16.25	31	98
FSMC cognitive	88	35.12	9.30	11	50
FSMC motoric	88	37.76	7.73	15	53
Anti NR2	88	2.19	1.50	0.11	11.50

2.2 Clinical Characteristics of the Patients

Of the 88 patients included in this study, 23 patients were diagnosed with Sjögren's syndrome, 32 patients with systemic lupus erythematosus and 14 patients with other autoimmune rheumatic diseases (limited and diffuse systemic sclerosis, polymyositis, rheumatoid arthritis, IgG 4 associated disease), as well as 7 patients with non-autoimmune inflammatory rheumatic disease (psoriatic arthritis, spondyloarthritis) and 12 patients with non-inflammatory rheumatic disease (osteoarthritis and fibromyalgia) (Table 2).

Table 2. Clinical characteristics of the patients and distribution of positive anti-NR2 antibody titer in the different groups of fatigued patients with rheumatic diseases.

Disease Group	Diagnosis	N	positive anti-NR2 antibody titer (>2ng/ml)
Sjögren Syndrome	Sjögren Syndrome	23	(n=11) 47.8%
Systemic lupus erythematosus	Systemic lupus erythematosus	32	(n=15) 46.9%
other autoimmune rheumatic disease	Systemic sclerosis, Mixed connective tissue disease, Polymyositis, Rheumatoid arthritis, IgG 4 associated disease	14	(n=8) 57.1%
Non-autoimmune inflammatory rheumatic disease	Psoriatic arthritis, Spondyloarthritis	7	(n=3) 42.9%
Non-inflammatory rheumatic disease	Fibromyalgia, Osteoarthritis	12	(n=6) 50.0%
Total		88	43 (48.8%)

Elevated anti-NR2 antibodies (titer > 2 ng/mL) were presented in 48.8% ($n = 43$) of total fatigued rheumatic patients, in 47.8% ($n = 11$) of SS patients, 46.9% ($n = 15$) of SLE patients, 57.1% ($n = 8$) of patients with other autoimmune rheumatic disease, 42.9% ($n = 3$) of the patients with non-autoimmune inflammatory disease and 50% ($n = 6$) of the patients with non-inflammatory rheumatic disease (Table 2, Figure 1).

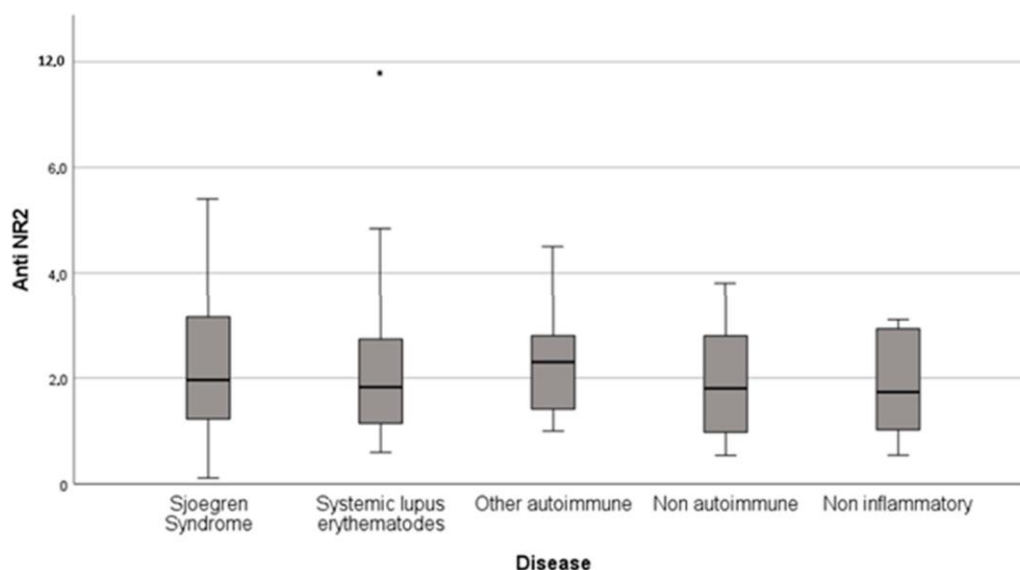


Figure 1. Distribution of anti-NR2 antibody titer in the different groups of fatigued patients with rheumatic diseases.

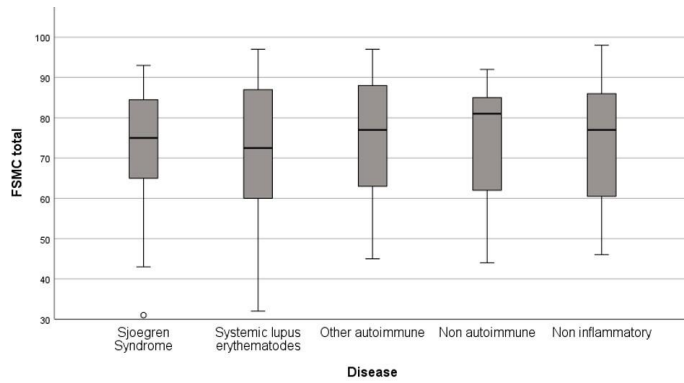
Among all rheumatic patients ($n = 88$), 72.7% ($n = 64$) of the patients were graded as severely fatigued, 13.6% ($n = 12$) as moderately fatigued, 11.4% ($n = 10$) as mildly fatigued and 0.01% ($n = 2$) did not have fatigue based on the total FSMC score as determined by Penner et al., 2009.

The results for the different fatigue sub-categories were similar: 55.7% ($n = 49$) of the rheumatic patients suffered from severe cognitive fatigue, 79.5% ($n = 70$) severe motor, 22.7% ($n = 20$) moderate cognitive, 11.4% ($n = 10$) moderate motor, 12.5% ($n = 11$) mild cognitive, 4.5% ($n = 4$) mild motor, 9.1% ($n = 8$) of the patients did not suffer from cognitive fatigue and 4.5% ($n = 4$) did not suffer from motor fatigue.

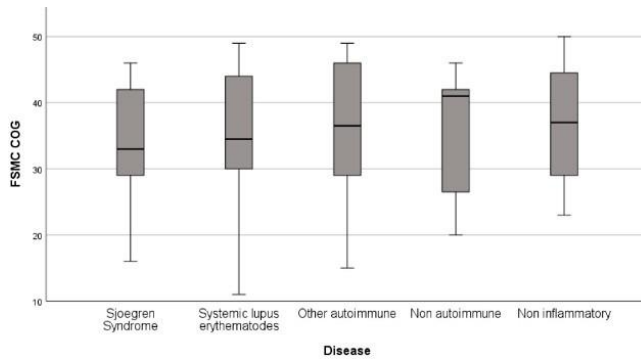
2.3 Patients with Positive anti-NR2 Antibody Titer

Furthermore, we analyzed the distribution of the fatigue grade for particular fatigue categories (cognitive, motor and total fatigue) in the different groups of rheumatic patients with positive anti-NR2 titers. All patients ($n = 43$) with an anti-NR2 titer >2 ng/mL were included in further analysis. Anti-NR2 positive patients from all disease groups predominantly suffered from severe fatigue level regardless of the fatigue sub-categories.

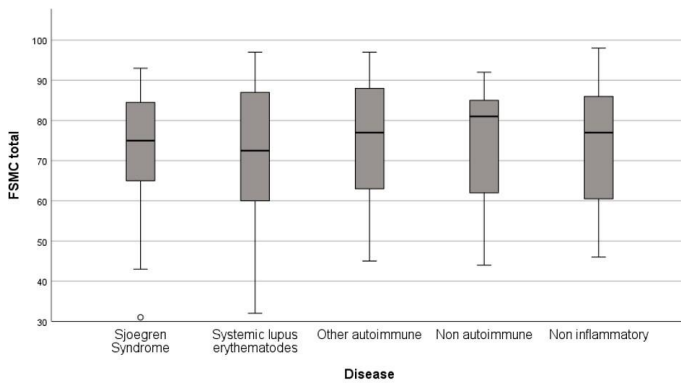
When considering only the anti-NR2-positive patients, 81.8% ($n = 9$) of those with SS, 66.7% ($n = 10$) of those with SLE, 87.5% ($n = 7$) of those with other autoimmune rheumatic diseases, 66.7% ($n = 2$) of those with non-autoimmune inflammatory diseases and 83.3% ($n = 5$) of those with non-inflammatory rheumatic diseases suffered from severe total fatigue (Figure 2a). In terms of cognitive fatigue in the anti-NR2-positive patients, 36.4% ($n = 4$) of those with SS, 46.7% ($n = 7$) of those with SLE, 87.5% ($n = 7$) of those with other autoimmune rheumatic diseases, 67.7% ($n = 2$) of those with non-autoimmune inflammatory rheumatic diseases and 83.3% ($n = 5$) of those with non-inflammatory rheumatic diseases suffered from severe levels of cognitive fatigue (Figure 2b). Focusing on motor fatigue, 81.8% ($n = 9$) of the anti-NR2-positive SS patients, 93.3% ($n = 14$) of the positive SLE patients, 100% ($n = 8$) of the positive patients with other autoimmune rheumatic diseases, 66.7% ($n = 2$) of the positive patients with non-autoimmune inflammatory rheumatic diseases and 83.3% ($n = 5$) of the positive patients with non-inflammatory rheumatic diseases suffered from severe levels of motor fatigue (Figure 2c).



(a)



(b)



(c)

Figure 2. (a–c) Severity of total fatigue in patients with positive anti-NR2 titer according to the FMSC score.

Patients with rheumatic diseases and positive anti-NR2 titers suffered predominantly from severe fatigue. In particular, 76.7% ($n = 33$) of the anti-NR2 positive patients ($n = 43$) had total FMSC scores valued as severe, 88.4% ($n = 38$) of these patients had motor FMSC scores valued as severe and 58.1% ($n = 25$) of these patients had cognitive FMSC scores valued as severe.

2.4 Correlation between Antibody Titer and Fatigue Severity

No significant correlation between anti-NR2 antibody titer and fatigue severity could be detected over all the disease groups, except for cognitive fatigue in the group of patients with other

autoimmune diseases ($n = 14$, $r = 0.594$, $p = 0.05$) (Table 3(a)). However, with regard to the FSMC motor score (0.461 , $p = 0.097$) and FSMC total score (0.490 , $p = 0.075$) in this group of patients, no correlation was found (Table 3(b,c)).

2.5 Correlation of the Circulating NfL Level, Anti-NR2 Antibody Titer and Fatigue Severity in Patients with Rheumatic Diseases

The correlation analysis of circulating NfL level (pg/mL) and anti-NR2 antibody titer in patients from different disease groups revealed no significant correlation between the two biomarkers in patients with fatigue (Table 4).

Table 3. (a) Correlation by Spearman-Rho of circulating anti-NR2 antibody titer and cognitive fatigue severity in the different groups of patients with rheumatic diseases. (b) Correlation by Spearman-Rho of circulating anti-NR2 antibody titer and motor fatigue severity in the different groups of patients with rheumatic diseases. (c) Correlation by Spearman-Rho of circulating anti-NR2 antibody titer and total fatigue severity in the different groups of patients with rheumatic diseases.

	<i>n</i>	r, Correlation Coefficient	<i>p</i>, Probability Value
(a)			
SS	23	0.255	0.240
SLE	32	0.229	0.208
Other autoimmune	14	0.549	<0.05
Non-autoimmune inflammatory	7	0.255	0.582
Non-inflammatory	12	0.364	0.24
(b)			
SS	23	0.215	0.325
SLE	32	0.085	0.643
Other autoimmune	14	0.461	0.097
Non-autoimmune inflammatory	7	0.126	0.788
Non-inflammatory	12	0.364	0.244
(c)			
SS	23	0.232	0.287
SLE	32	0.066	0.721
Other autoimmune	14	0.490	0.075
Non-autoimmune inflammatory	7	0.162	0.728
Non-inflammatory	12	0.371	0.235

Table 4. Correlation by Spearman-Rho of circulating NfL level and anti-NR2 antibody titer in the different groups of patients with rheumatic diseases.

	<i>n</i>	r, Correlation Coefficient	<i>p</i>, Probability Value
SS	23	0.190	0.386
SLE	32	0.035	0.851
Other autoimmune	14	0.051	0.864

non-autoimmune inflammatory	7	-0.464	0.294
Non-inflammatory	12	0.252	0.429
Total	88	0.067	0.534

Furthermore, we correlated the circulating NfL level (pg/mL) with the fatigue severity, according to the FSMC scores for the different categories (cognitive, motor, total) in the patients with positive (>2 ng/mL) $n = 43$ and negative (<2 ng/mL) $n = 45$ anti-NR2 antibodytiters. There was no significant correlation by Spearman-Rho for patients with positive anti-NR2 titer (>2 ng/mL) ($n = 43$) as well as for patients with negative anti-NR2 titer (<2 ng/mL) ($n = 45$) (Tables 5–7, Figure 3) concerning the FSMC cognitive, motor and total score.

Table 5. Correlation by Spearman-Rho of circulating NfL level and fatigue severity in patients with positive anti-NR2 antibody titer (>2 ng/mL) $n = 43$.

$n = 43$	r, Correlation Coefficient	p, Probability Value
FSMC cognitive	-0.160	0.305
FSMC motor	-0.158	0.310
FSMC total	-0.152	0.329

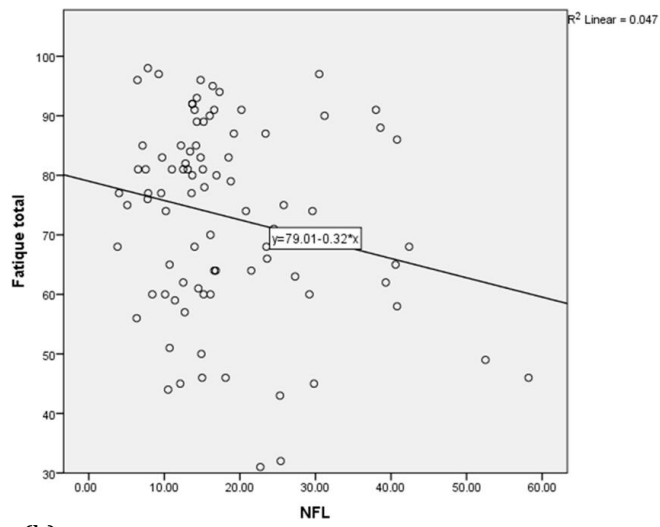
Table 6. Correlation by Spearman-Rho of circulating NfL level and fatigue severity in patients with negative anti-NR2 antibody titer (<2 ng/mL) $n = 45$.

$n = 45$	r, Correlation Coefficient	p, Probability Value
FSMC cognitive	-0.133	0.385
FSMC motor	-0.050	0.745
FSMC total	-0.107	0.485

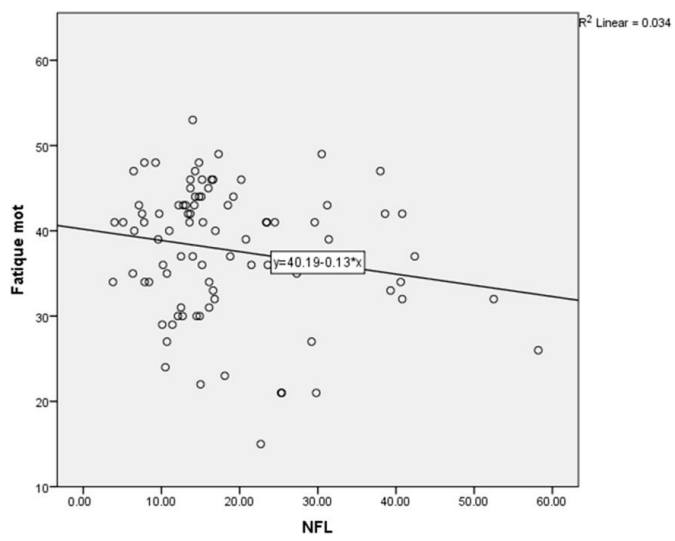
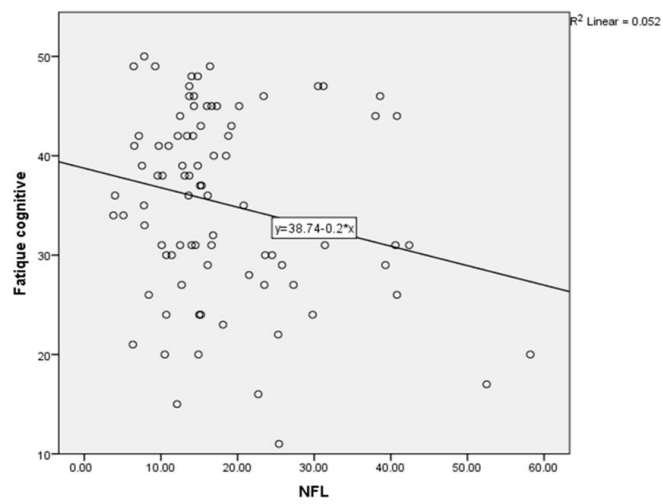
Table 7. Correlation by Spearman-Rho of circulating NfL level and fatigue severity in all patients with rheumatic diseases $n = 88$.

$n = 88$	r, Correlation Coefficient	p, Probability Value
FSMC cognitive	-0.150	0.163
FSMC motor	-0.093	0.389
FSMC total	-0.118	0.272

(a)



(b)



(c)

Figure 3. (a–c) Correlation by Spearman-Rho of circulating NfL level and fatigue severity in patients with positive anti-NR2 antibody titer (>2 ng/mL).

There was no significant correlation by Spearman-Rho between the adjusted NfL level (Z-score NfL) in accordance with age and BMI of a representative collective regarding the FSMC cognitive score, the FSMC motor score and the FSMC total score (Table 8).

Table 8. Correlation by Spearman-Rho of adjusted NfL level (Z-score) and fatigue severity in all patients with rheumatic diseases $n = 88$.

$n = 88$	r , Correlation Coefficient	p , Probability Value
FSMC cognitive	-0.127	0.239
FSMC motor	-0.097	0.370
FSMC total	-0.127	0.239

Moreover, we correlated the circulating NfL level (pg/mL) with the fatigue severity, according to the FSMC scores in the different groups of patients. In accordance with the previous results, no correlations were detected.

2.6. Distribution of the Anti-NR2 Antibody Titer in Patients with Rheumatic Diseases

In addition, we analyzed the distribution of the anti-NR2 antibody titer in the population of patients with rheumatic diseases.

First, we tested the variables antibody titer and cognitive fatigue for the normality of the distribution. For the antibody titer, the values for Skewness z-value and Kurtosis z-value were 11.63 and 31.93. Those values were outside the interval 1.96, 1.96 which indicates excessive deviation from the normal distribution. For the cognitive fatigue, the corresponding values for Skewness z-value and Kurtosis z-value were 1.53 and 1.21. Those values were in the corresponding interval of acceptable values 1.96, 1.96. Table 9(a) presents the test of normality for cognitive fatigue. In this table, the values of the Shapiro–Wilk test indicate that the significance for rejecting the null hypothesis is below the critical value of 0.05. Thus, both variables are not normally distributed. This can be also concluded from the following Q-Q boxplots (Figures 4 and 5).

Table 9. (a) Tests of normality for cognitive fatigue. (b). Tests of normality for motor fatigue.

	Kolmogorov–Smirnov ^a			Shapiro–Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
(a)						
Antibody titer	0.124	88	0.002	0.777	88	0.000
Fatigue cognitive	0.088	88	0.086	0.965	88	0.018
(b)						
Fatigue motor	0.140	88	0.000	0.958	88	0.007

^a Lilliefors Significance Correction.

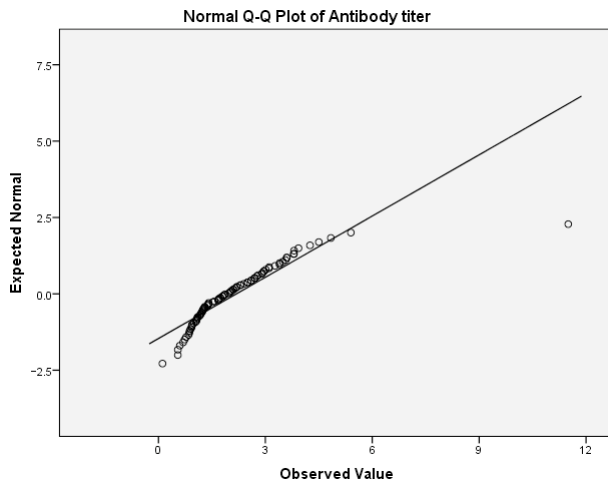


Figure 4. Normal Q-Q plot of anti-NR2 titer.

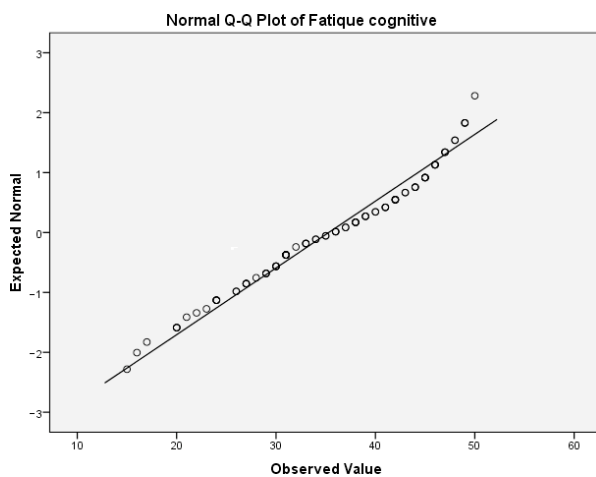


Figure 5. Normal Q-Q plot of cognitive fatigue.

The same analyses were performed for the variable motor fatigue. For the motor fatigue, the values for Skewness z-value and Kurtosis z-value were 2.623 and 0.104, respectively. The Skewness z-value was outside the interval 1.96, 1.96, indicating that the values were not normally distributed. Table 9(b) provides the test of normality of this variable.

The values of the Shapiro–Wilk test indicate that the significance for rejecting the null hypothesis was below the critical value of 0.05. Thus, the variable motor fatigue was not normally distributed. This can also be concluded from the boxplot diagram, which is given below (Figure 6).

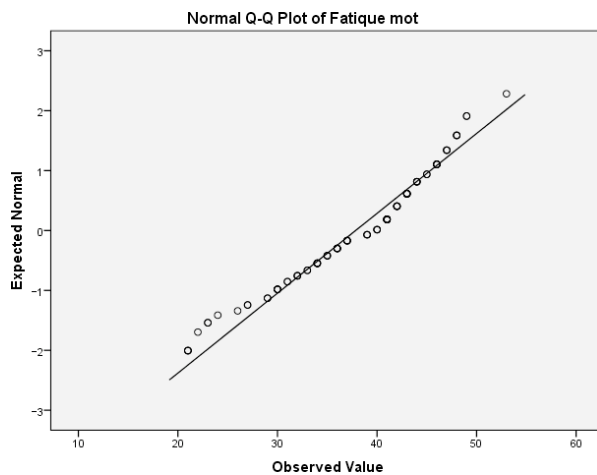


Figure 6. Normal Q-Q plot of motor fatigue.

For the variable total fatigue, there was no need to perform an analysis of normality of distribution. If the two variables, cognitive and motor fatigue, that are part of this variable do not have a normal distribution, then it can be safely said that this variable also does not have a normal distribution.

3. Discussion

NMDAR signaling is responsible for the majority of excitatory synaptic transmission in the CNS, as an elementary mechanism of synaptic plasticity, fundamental for learning and memory [10]. It affects almost all forms of brain activity, including those important for higher brain functions. It has been well established that anti-NR2 antibodies in the brain are related to the neurocognitive impairment in patients with neuropsychiatric SLE (De Giorgio et al.) [14]. Moreover, it has been shown that anti-NR2 antibodies are associated with depressive mood (Lapteva et al.) [15], as well as decreased short memory and learning abilities (Omdal et al.) [16]. In addition, Lauvsnes et al. found a correlation of anti-NR2 antibodies with hippocampal atrophy and cognitive impairment, not only in patients with SLE, but also in patients with pSS [17].

In our previous study we revealed an association of the circulating anti-NR2 antibodies and fatigue in patients with SLE. In the present study we report that circulating anti-NR2 antibodies are not exclusively present in fatigued patients with SLE, but can also be detected in fatigued patients with SS and other autoimmune rheumatic diseases (limited and diffuse systemic sclerosis, polymyositis, rheumatoid arthritis, IgG 4 associated disease).

This distribution is in accordance with the pathogenetic and phenotypic similarities, as well as the frequent overlap of diseases in the group of autoimmune diseases. Thus, we can confirm the results of a recent meta-analysis (17 studies), describing increased anti-NMDAR antibody prevalence in SLE (24.6%) and Sjögren's syndrome (19.7%) compared to healthy people (7.6%) [18]. However, a recent study in over 7000 subjects reported that seroprevalence, immunoglobulin class, or titers of serum antibodies against brain-antigens (including anti-NMDAR) did not predict disease [19].

Additionally, we found positive anti-NR2 antibody titers in patients with autoimmune rheumatic diseases (PsA, SpA); however, the prevalence of positive titers in this patient group seems to be lower.

These findings suggest an individual role of anti-NR2 antibodies in the pathophysiology of fatigue, regardless of the main disease. Therefore, it could be postulated that the detection of anti-NR2 antibodies may represent a potential biomarker of fatigue, which is disease independent.

Although we could not find a significant correlation between the fatigue severity and the titer of anti-NR2 antibodies, the results of this study demonstrate that rheumatic patients with positive anti-NR2 titers suffer predominantly from severe fatigue in all fatigue categories.

Numerous factors can influence the plasma anti-NR2 antibody concentration and thereby obscure the understanding of how the circulating levels reflect the pathophysiology and clinical and laboratory findings [20]. It is still a matter of debate whether elevation of anti-NR2 antibodies in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with autoimmune diseases is due to increased intrathecal synthesis or to a transport from the peripheral blood circulation to the CSF through a damaged BBB [11]. Kowal et al. found in 2016 that mice with high levels of anti-NR2 antibodies have no neuronal damage until BBB breakdown takes place [21]. Apparently, an intact BBB prevents the transport of anti-NR2 from the systemic circulation into the brain [20]. Thus, the levels of anti-NR2 antibodies in CSF are more likely to distinguish between patients with or without neuro-cognitive manifestations, including fatigue, than the circulating anti-NR2 levels. However, repeated collections of CSF to monitor fatigue are invasive and cannot be performed on regular basis, and thus we considered this infeasible in our patient population. Only blood-based measures of anti-NR2 antibodies would be convenient for the population of fatigued patients and could offer a broad application in clinical routine.

For the purpose of providing information equivalent to CSF testing, via blood-based measures, we used a combination of a circulating anti-NR2 antibody titer and circulating NfL level as a composite diagnostic. Secondly, we explored the correlation between anti-NR2 antibody titers, as brain-reactive autoantibodies and circulating NfL levels, as a surrogate biomarker in rheumatic patients with fatigue. NfL is a structural protein of the neuronal cytoskeleton, exclusively expressed in central and peripheral neurons [22]. Following neuronal damage due to neurodegenerative, inflammatory, vascular or traumatic processes, these proteins are released into CSF and consecutively into the blood to a lesser extent [23]. Accordingly, NfL is a promising biomarker for neuronal damage in neurodegenerative conditions, multiple sclerosis, cardiovascular diseases, and traumatic brain injury and can predict future rates of cognitive decline [24]. In addition, NfL levels in the CSF (CSF NfL) correlate with central nervous system (CNS) involvement in autoimmune inflammatory diseases, such as multiple sclerosis, SLE and primary Sjögren's syndrome [25,26]. In general, NfL level increases are unspecific, as they may arise from any process resulting in neural damage, which is often viewed as an obstacle for the implementation of sNfL level assessment into clinical practice. However, fatigue is not restricted to specific pathophysiological processes, and this lack of specificity might actually be beneficial because it enables the detection of a wide range of potential neuronal damages with diffuse or polytopic localization in the brain [23]. Tjensvoll et al. reported in 2021 that increasing concentrations of NfL in CSF were associated with increasing levels of anti-NR2 antibodies in CSF and reflected cognitive dysfunction in patients with SLE and pSS [24]. Moreover, they found no differences in NfL concentrations between patients with SLE and pSS, indicating that the neuronal pathogenetic impact of anti-NR2 antibodies is more or less similar in the two diseases [24]. Nevertheless, several studies suggest that plasma NfL could provide adequate clinical information, equivalent to CSF measures [23,25]. Plasma NfL can predict cognitive decline and changes in hippocampal volumes and fractional anisotropy in the corpus callosum [25]. Lauvsnes et al. found an association between plasma NfL concentrations in patients with SLE and some abnormal neurological, cognitive and neuroimaging findings [25]. Furthermore, they observed moderate correlation between CSF and plasma NfL concentrations [25]. Engel et al. reported increased sNfL levels in SLE patients with focal CNS involvement, whereas sNfL levels of SLE patients with diffuse CNS and peripheral nervous system involvement did not differ from those of SLE patients without neuropsychiatric manifestations [23].

However, in the present study, we did not find a significant correlation between anti-NR2 antibody titers as brain-reactive autoantibodies and circulating NfL levels in rheumatic patients with fatigue. These results are in accordance with the findings of Lauvsnes et al., who reported the lack of association between anti-NR2 antibodies and plasma NfL [25].

Moreover, there was no correlation between circulating NfL level and clinical fatigue level in rheumatic patients with positive anti-NR2 titers, suggesting that, not only neuronal damage and BBB integrity, but also other factors may be involved in the pathophysiology of anti-NR2 antibodies.

The present study has some limitations. First, the anti-NR2-antibody titers were categorically defined as positive and negative using the cut-off for the ELISA assay. The data of normal healthy individuals who tested negative for anti-NMDA receptor antibodies by ELISA are needed to assess their

cut-off values precisely and interpretate the clinical results more accurately. A second limitation was the small cohort of patients with rheumatic diseases and the different number of participants in each subgroup. Lastly, the investigations of anti-NMDA receptor antibodies and NfL were only performed on blood samples and did not include CSF samples or results of imaging techniques such as cMRT.

Experimental studies are not concordant to a single theory with regard to the pathophysiological mechanism of anti-NR2 antibodies. Besides the theory of neuronal apoptosis via excitotoxicity, there are suggestions of alternative hypotheses, including reduced energy metabolism and immune-metabolic disturbances [11].

The mechanisms of pathogenicity could be decisive for the degree of recovery of brain function. Whereas the excitotoxic cell lysis results in irreversible tissue destruction, a pathogenic effect caused by cell signaling alterations and internalization of membrane receptors can be reversed upon removal of antibodies [25,27,28].

Overall, further studies are required to investigate the anti-NR2 pathophysiology and reveal if the cerebral manifestations related to the anti-NR2 antibodies are potentially reversible or static due to a neuronal death. This would offer new approaches in the therapy of the clinical conditions mediated by these antibodies.

4. Materials and Methods

4.1 Study Design and Patient Cohort

Between 2020 and 2022, patients treated at the Center for Rheumatic Diseases Rhineland-Palatinate GmbH, Bad Kreuznach (Germany) were screened for eligibility for inclusion in this prospective study based on available medical records. Inclusion criteria were a confirmed rheumatologic diagnosis from a rheumatologist, as well as presence of fatigue according to the FSMC (fatigue scale for motor and cognitive functions) questionnaire.

Clinical, histological, laboratory, psychometric and personality data were also collected. Written informed consent was obtained from all patients.

4.2 Analysis of Anti-NR2 Antibody and sNfL Levels

Freshly drawn blood samples were collected, centrifuged and stored at 80 °C. For the detection of circulating anti-NR2 antibodies, human serum was analyzed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (NR2AT-IFA, Cat. No. ENA100, DRD Biotech) according to the manufacturer's instructions. All samples were analyzed retrospectively.

Anti-NR2 titers >2 ng/mL were considered as elevated or positive, according to the ELISA Kit manufacturer's instructions.

Analysis of serum neurofilament light chain (sNfL) levels were determined using highly sensitive single molecule array (SiMoA, Billerica, MA, USA) technology. Samples were measured in duplicate in several rounds by SiMoA HD-1 (Quanterix, Billerica, MA, USA) using NF-Light Advantage Kits (Quanterix) [19] according to the manufacturer's instructions. Resorufin- β -D-galactopyranoside (RGP) was incubated at 33 °C for 60 min prior to running the assay. sNfL measurements were performed in a blinded fashion without information about clinical data. sNfL Z scores were derived from a recently published database comprising 4532 control persons with no evidence of CNS disease taking part in four cohort studies in Europe and North America (Benkert et al., Lancet Neurol 2022) [29]. The authors of this study modelled the distribution of sNfL concentrations in the function of physiological age-related increase and body-mass index (BMI)-dependent modulation, to derive Z score values from this reference database, via a generalized additive model for location, scale and shape. The application we used to calculate age- and BMI-adjusted sNfL Z scores based on this reference database can be accessed at the following link: <http://shiny.dkfbasel.ch/baselnflreference> (accessed on 27 July 2022).

4.3 Fatigue Status

In parallel, the degree of fatigue for motor and cognitive functions was recorded using the FSMC

(fatigue scale for motor and cognitive functions) questionnaire [13]. The FSMC contains 20 items. Ten items measure symptoms of motor and cognitive fatigue. Responses are scored on a five-point scale. Item scores can be summed to a global severity score for FSMC-total or for the two sub-scales FSMC-cognitive and FSMC-motor.

This questionnaire enables us to differentiate cognitive from motor fatigue and to stratify the degree of severity into 4 groups. While the FSMC questionnaire was originally developed for patients with Multiple Sclerosis (MS), we have adapted it for patients with rheumatic diseases.

4.4 Statistical Analyses

All data were assessed for normal or non-normal distribution. Differences in disease scores were determined using the Mann–Whitney U and H-Test. Correlations were determined by Spearman’s Rho correlation analysis. The level of significance was set at $\alpha = 0.05$. The resulting p -values were considered nominally significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were calculated with SPSS PASW27 Statistics (IBM Corp., Somers, NY). Figures were created using GraphPad Prism for Windows (Microsoft, Redmond, WA, USA).

5. Conclusions

Fatigue is a widespread and complex symptom that is diagnosed by questionnaire. Here, we report that the presence of circulating anti-NR2 antibodies is associated with severe fatigue in patients with both autoimmune and non-autoimmune rheumatic diseases. Thus, the detection of these autoantibodies might be a helpful diagnostic tool in rheumatic patients with fatigue.

Furthermore, the presence of anti-NR2 antibodies in different subsets of rheumatic patients, independently from the main disease, suggests an individual role of these autoantibodies in fatigue pathophysiology.

The lack of correlation between the circulating NfL levels, anti-NR2 antibody titer and clinical fatigue manifestations indicates alternative factors and theories in fatigue pathophysiology, such as chronification and microglial activation.

Further studies on a larger cohort are needed to confirm the validity of anti-NR2 antibodies as a biomarker of fatigue in patients with rheumatic autoimmune diseases.

Author Contributions: T.M. (Tatjana Marinoska), A.S. and M.D. contributed to the concept and design of the study; T.M. (Tatjana Marinoska), T.M. (Tamara Möckel) and F.L. contributed to the acquisition of data. T.M. (Tatjana Marinoska), A.S., T.M. (Tamara Möckel), K.T., S.B., M.D. and F.L. contributed to the data analyses and interpretation. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and reviewed by the ethics committees of the state medical association of Rhineland-Palatinate (protocol code: 2019-14273, date of approval: 26 July 2019).

Informed Consent Statement: The participants gave their written consent to participate in the survey. To increase the level of anonymity of the survey, the collection of personal data was reduced to a minimum.

Data Availability Statement: The data sets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors would like to thank the patient participants for their excellent cooperation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

6. References

1. Overman, C.L.; Kool, M.B.; Da Silva, J.A.; Geenen, R. The prevalence of severe fatigue in rheumatic

-
- diseases: An international study. *Clin. Rheumatol.* **2016**, *35*, 409–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Flessa, C.M.; Zampeli, E.; Evangelopoulos, M.E.; Natsis, V.; Bodewes, I.L.A.; Huijser, E.; Versnel, M.A.; Moutsopoulos, H.M.; Mavragani, C.P. Genetic Variants of the BAFF Gene and Risk of Fatigue Among Patients with Primary Sjogren s Syndrome. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 836824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 3. Mæland, E.; Miyamoto, S.T.; Hammenfors, D.; Valim, V.; Jonsson, M.V. Understanding Fatigue in Sjögren s Syndrome: Outcome Measures, Biomarkers and Possible Interventions. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 703079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 4. Howard Tripp, N.; Tarn, J.; Natasari, A.; Gillespie, C.; Mitchell, S.; Hackett, K.L.; Bowman, S.J.; Price, E.; Pease, C.T.; Emery, P.; et al. Fatigue in primary Sjögren s syndrome is associated with lower levels of proinflammatory cytokines. *RMD Open* **2016**, *2*, e000282. [[CrossRef](#)]
 5. Karageorgas, T.; Fragioudaki, S.; Nezos, A.; Karaiskos, D.; Moutsopoulos, H.M.; Mavragani, C.P. Fatigue in Primary Sjögren s Syndrome: Clinical, Laboratory, Psychometric, and Biologic Associations. *Arthritis Care Res.* **2016**, *68*, 123–131. [[CrossRef](#)]
 6. Manzo, C.; Martinez-Suarez, E.; Kechida, M.; Isetta, M.; Serra-Mestres, J. Cognitive Function in Primary Sjögren s Syndrome: A Systematic Review. *Brain Sci.* **2019**, *9*, 85. [[CrossRef](#)]
 7. Korte, S.M.; Straub, R.H. Fatigue in inflammatory rheumatic disorders: Pathophysiological mechanisms. *Rheumatology* **2019**, *58*, v35–v50. [[CrossRef](#)]
 8. Chen, G.; Che, L.; Cai, X.; Zhu, P.; Ran, J. Bioinformatic Analysis Identifies Biomarkers and Treatment Targets in Primary Sjögrens Syndrome Patients with Fatigue. *BioMed Res. Int.* **2022**, *2022*, 7697558. [[CrossRef](#)]
 9. Harrison, M.J.; Ravdin, L.D.; Lockshin, M.D. Relationship between serum NR2a antibodies and cognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **2006**, *54*, 2515–2522. [[CrossRef](#)]
 10. Nowling, T.K.; Kral, M.; Wolf, B.; Gilkeson, G.; Ruth, N.M. Formal neurocognitive function and anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in paediatric lupus. *Lupus Sci. Med.* **2021**, *8*, e000462. [[CrossRef](#)]
 11. Schwarting, A.; Möckel, T.; Lütgendorf, F.; Triantafyllias, K.; Grella, S.; Boedecker, S.; Weinmann, A.; Meineck, M.; Sommer, C.; Schermuly, I.; et al. Fatigue in SLE: Diagnostic and pathogenic impact of anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) autoantibodies. *Ann. Rheum. Dis.* **2019**, *78*, 1226–1234. [[CrossRef](#)]
 12. Wollmuth, L.P.; Chan, K.; Groc, L. The diverse and complex modes of action of anti-NMDA receptor autoantibodies. *Neuropharmacology* **2021**, *194*, 108624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 13. Penner, I.K.; Raselli, C.; Stöcklin, M.; Opwis, K.; Kappos, L.; Calabrese, P. The Fatigue Scale for Motor and Cognitive Functions (FSMC): Validation of a new instrument to assess multiple sclerosis-related fatigue. *Mult. Scler. J.* **2009**, *15*, 1509–1517. [[CrossRef](#)]
 14. DeGiorgio, L.A.; Konstantinov, K.N.; Lee, S.C.; Hardin, J.A.; Volpe, B. Diamond, B A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1189–1193. [[CrossRef](#)]
 15. Lapteva, L.; Nowak, M.; Yarboro, C.H.; Takada, K.; Roebuck-Spencer, T.; Weickert, T.; Bleiberg, J.; Rosenstein, D.; Pao, M.; Patronas, N.; et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies, cognitive dysfunction, and depression in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **2006**, *54*, 2505–2514. [[CrossRef](#)]
 16. Omdal, R.; Brokstad, K.; Waterloo, K.; Koldingsnes, W.; Jonsson, R.; Mellgren, S.I. Neuropsychiatric disturbances in SLE are associated with antibodies against NMDA receptors. *Eur. J. Neurol.* **2005**, *12*, 392–398. [[CrossRef](#)]
 17. Lauvsnes, M.B.; Beyer, M.K.; Kvaløy, J.T.; Greve, O.J.; Appenzeller, S.; Kvivik, I.; Harboe, E.; Tjensvoll, A.B.; Gøransson, L.G.; Omdal, R. Association of hippocampal atrophy with cerebrospinal fluid antibodies against the NR2 subtype of the N-methyl- D-aspartate receptor in patients with systemic lupus erythematosus and patients with primary Sjögren s syndrome. *Arthritis Rheumatol.* **2014**, *66*, 3387–3394. [[CrossRef](#)]
 18. Schramm, M.A.; Venhoff, N. NMDAR autoantibodies as biomarker for fatigue in SLE. *Z. Für Rheumatol.* **2020**, *79*, 83–84. [[CrossRef](#)]
 19. Gastaldi, V.D.; Wilke, J.B.; Weidinger, C.A.; Walter, C.; Barnkothe, N.; Teegen, B.; Luessi, F.; Stöcker, W.; Lühder, F.; Begemann, M.; et al. Factors predisposing to humoral autoimmunity against brain-

-
- antigens in health and disease Analysis of 49 autoantibodies in over 7000 subjects. *Brain Behav. Immun.* **2022**, *108*, 135–147. [[CrossRef](#)]
20. Gulati, G.; Iffland, P.H.; Janigro, D.; Zhang, B.; Luggen, M.E. Anti-NR2 antibodies, blood-brain barrier, and cognitive dysfunction. *Clin. Rheumatol.* **2016**, *35*, 2989–2997. [[CrossRef](#)]
21. Kowal, C.; DeGiorgio, L.A.; Nakaoka, T.; Hetherington, H.; Huerta, P.T.; Diamond, B.; Volpe, B.T. Cognition and immunity, antibody impairs memory. *Immunity* **2004**, *21*, 179–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zanella, I.; Blasco, H.; Filosto, M.; Biasiotto, G. Editorial: The Impact of Neurofilament Light Chain (NFL) Quantification in Serum and Cerebrospinal Fluid in Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurosci.* **2022**, *16*, 915115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Engel, S.; Boedecker, S.; Marczynski, P.; Bittner, S.; Steffen, F.; Weinmann, A.; Schwarting, A.; Zipp, F.; Weinmann-Menke, J.; Luessi, F. Association of serum neurofilament light chain levels and neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2021**, *14*, 17562864211051497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Tjensvoll, A.B.; Lauvsnes, M.B.; Zetterberg, H.; Kvaløy, J.T.; Kvivik, I.; Maroni, S.S.; Greve, O.J.; Beyer, M.K.; Hirohata, S.; Putterman, C. Neurofilament light is a biomarker of brain involvement in lupus and primary Sjögren s syndrome. *J. Neurol.* **2021**, *268*, 1385–1394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lauvsnes, M.B.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Kvaløy, J.T.; Tjensvoll, A.B.; Maroni, S.; Beyer, M.K.; Greve, O.J.; Kvivik, I.; Alves, G. Neurofilament light in plasma is a potential biomarker of central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus. *J. Neurol.* **2022**, *269*, 3064–3074. [[CrossRef](#)]
26. Kurki, P.; Helve, T.; Dahl, D.; Virtanen, I. Neurofilament antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* **1986**, *13*, 69–73.
27. Mader, S.; Brimberg, L.; Diamond, B. The Role of Brain-Reactive Autoantibodies in Brain Pathology and Cognitive Impairment. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1101. [[CrossRef](#)]
28. Chang, E.H.; Volpe, B.T.; Mackay, M.; Aranow, C.; Watson, P.; Kowal, C.; Storbeck, J.; Mattis, P.; Berlin, R.; Chen, H.; et al. Selective Impairment of Spatial Cognition Caused by Autoantibodies to the N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *EBioMedicine* **2015**, *2*, 755–764. [[CrossRef](#)]
29. Benkert, P.; Meier, S.; Schaedelin, S. NfL Reference Database in the Swiss Multiple Sclerosis Cohort Study Group. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: A retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol.* **2022**, *21*, 246–257. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3 Danksagung

Mein größter Dank gilt [REDACTED], der nicht nur mir das Promotionsthema überlassen hat, sondern auch meine Begeisterung für die Rheumatologie und klinische Immunologie erneut geweckt hat und meinen beruflichen Werdegang

maßgeblich beeinflusst hat. Ich möchte mich bedanken für die Motivierung, stets intensive Betreuung, die detaillierten Korrekturen und das durchweg konstruktive Feedback.

Weiterhin danke ich [REDACTED] für die Begleitung bei der Durchführung der Experimente, kritische Diskussionen, zahlreiche Verbesserungsvorschläge und die gute Zusammenarbeit.

Daneben möchte ich [REDACTED] danken, der mich in der Entwicklung und Umsetzung meiner Promotion stets unterstützt hat und für Fragen und Probleme immer ein offenes Ohr hatte.

Außerdem möchte ich mich bei allen [REDACTED] bedanken, die sich bereit erklärt haben an meiner Studie teilzunehmen und damit meine Promotion erst möglich gemacht haben.

Ganz besonders jedoch danke ich [REDACTED], die mich zu jeder Zeit gefördert haben und mir bei Schwierigkeiten immer wieder zur Seite standen.

5. Tabellarischer Lebenslauf

1. Persönliche Informationen

Name und Vorname	Tatjana Marinoska
------------------	-------------------

2. Schulbildung und akademische Werdegang

22.01.2022	Facharztprüfung für Innere Medizin und Rheumatologie Bezirksärztekammer Koblenz, Deutschland
15.09.2017	Approbation gem. § 3 Absatz 3 der BÄO zur Ausübung des ärztlichen Berufes in Deutschland
25.08.2017	Kenntnisprüfung zur Erteilung der Approbation als Arzt gemäß § 3 Bundesärzteordnung (BÄO)
02.08.2016	Berufserlaubnis nach § 10 Absatz 1 der Bundesärzteordnung zur vorübergehenden Ausübung des ärztlichen Berufes in Hessen
02.12.2011	Lizenz zur Ausübung des ärztlichen Berufes in Nordmazedonien Ärztekammer der Nordmazedonien
18.05.2011-13.11.2011	Praktikum als Ärztin
01.10.2005-17.05.2011	Doktor der Medizin Medizinische Fakultät, Universität "Hil. Kyril und Methodius", Skopje (Nordmazedonien)
04.09.2009-02.10.2009	Praktikum als Medizinstudentin Abteilung der Kardiochirurgie, Städtisches Klinikum, Arkhangelsk (Russia)
2001-2005	Gymnasium "Hil. Kliment Ohridski", Ohrid (Nordmazedonien)
18.06.2005	Diplom für abgeschlossenes Gymnasium mit kontinuierlich ausgezeichnetem Erfolg
14.06.2001	Diplom für abgeschlossene Grundschule mit kontinuierlich ausgezeichnetem Erfolg
1993-2001	Grundschule "Hristo Uzunov", Ohrid (Nordmazedonien)

3. Berufliche Werdegang

22.01.2022-dato	Fachärztin für Innere Medizin und Rheumatologie RZ Rheumazentrum Rheinland-Pfalz, Bad Kreuznach, Akademisches Krankenhaus der Universitätsmedizin Mainz
16.04.2018-22.01.2022	Assistenzärztin in Weiterbildung RZ Rheumazentrum Rheinland-Pfalz, Bad Kreuznach, Akademisches Krankenhaus der Universitätsmedizin Mainz
15.12.2017-15.04.2018	Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Ärztin) Medizinische Klinik I, Pneumologie und Allergologie,

	Johann Wolfgang Goethe- Universitätsklinikum, Frankfurt am Main
10.10.2017-15.12.2017	Assistenzärztin In Weiterbildung Rheumazentrum Mittelhessen, Sebastian-Kneipp-Str. 36, Bad Endbach
02.08.2016-30.09.2017	Assistenzärztin in Weiterbildung Abteilung für Rheumatologie, "Klaus-Miehlke Klinik" Wiesbaden
14.03.2013-15.07.2016	Ärztin "Klinik für Prävention, Behandlung und Rehabilitation der kardiovaskulären Erkrankungen", Ohrid (Nordmazedonien)
01.03.2012-31.12.2012	Freiwilliger ärztlicher Dienst "Klinik für Prävention, Behandlung und Rehabilitation der kardiovaskulären Erkrankungen", Ohrid (Nordmazedonien)

4. Sprachkenntnisse

Mazedonisch	Muttersprache
Deutsch	C1
Englisch	C1
Spanisch	B1
Serbisch	C1

5. Publikationen

Marinoska, T., Möckel, T., Triantafyllias, K., Boegel, S., Dreher, M., Luessi, F., & Schwarting, A. (2023). NMDA Receptors in Health and Diseases: New Roles and Signaling Pathways-Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR) Autoantibodies as Potential Biomarkers of Fatigue in Patients with Rheumatic Diseases. <i>International journal of molecular sciences</i> , 24(4), 3560. https://doi.org/10.3390/ijms24043560
Triantafyllias, K., Marinoska, T., Heller, C. <i>et al.</i> Optical spectral transmission to assess glucocorticoid therapy response in patients with arthritis: a longitudinal follow-up comparison with joint ultrasound. <i>Arthritis Res Ther</i> 25, 47 (2023). https://doi.org/10.1186/s13075-023-03023-9
Marinoska, T., Lauf, C., Shorn, C., Schwarting, A. (2022) Fehlendes Therapieansprechen- ist es wirklich eine rheumatoide Arthritis? <i>Dtsch Med Wochenschr</i> 2022, 147:1153-1157 (2022) doi: 10.1055/a-1887-3463
Kapitel "Komplikationen und Folgezustände" des Buches Gastrointestinale und hepatobiliäre Infektionen , Markus Menges, Jens M. Kittner DOI 10.1007/9783662669594 ISBN des gedruckten Buches 978-3-662-66958-7

6. Konferenzen

Teilnahmebescheinigung an der 38. Jahrestagung der Landesarbeitsgemeinschaft Rheumatologie und kooperatives Rheumazentrum RLP vom 03.04.2024 bis 04.04.2024 in Bad Kreuznach, Deutschland
Teilnahmebescheinigung und Poster Präsentation an der 15th International Symposium on Sjögren's Syndrome , awarded with 8 European CME credits, vom 07.09.2022 bis 10.09.2022 in Rome, Italien
Teilnahmebescheinigung der Fortbildungsveranstaltung 50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), die 36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie (DGORh) und der wissenschaftlichen Herbsttagung der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie (GKJR) , mit orale Präsentation und 2 Poster Präsentationen vom 31.08.2022 bis 03.09.2022 in Berlin, Deutschland
Teilnahmebescheinigung der Fortbildungsveranstaltung 22th ELUAR European Congress of

Rheumatology , vom 01.06.2022 bis 04.06.2022 in Copenhagen, Denmark
Teilnahmebescheinigung Ärztliche Fortbildung Psoriasis and psoriatic arthritis masterclass: from theory to practice vom 08.04 bis 09.04.2022 in Frankfurt am Main, Deutschland
Teilnahmebescheinigung der Fortbildungsveranstaltung 49. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), die 35. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie (DGORh) und der wissenschaftlichen Herbsttagung der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie (GKJR) , mit 2 Poster Präsentationen, vom 15.09.2021 bis 18.09.2021, virtuell
Teilnahmebescheinigung Ärztliche Fortbildung, Jahresveranstaltung des UCA (universitäres Autoimmunität) , am 01.02.2020 in Universitätsmedizin der JGU Mainz, Deutschland
Bescheinigung für die Teilnahme an der 35. Jahrestagung der Landesarbeitsgemeinschaft Rheumatologie und kooperatives Rheumazentrum RLP am 01.04.2019 in Bad Kreuznach, Deutschland
Teilnahmebescheinigung Ärztliche Fortbildung ACR-Update 2019 am 29.11 und 30.11.2019 in Frankfurt am Main, Deutschland
Teilnahmebescheinigung Ärztliche Fortbildung, Herausforderung bei Rheuma: Impfungen und Fatigue am 23.10.2019 in Bad Kreuznach, Deutschland
Bescheinigung für die erfolgreiche Teilnahme am Workshop Notfallmanagement der rheumatologische Notfallpatient am 06.11.2019 in Bad Kreuznach, Deutschland
Teilnahmebescheinigung Ärztliche Fortbildung, 12 Treffen für Nachwuchskräfte in der Rheumatologie am 05.11.2019 in Ingelheim, Deutschland
Teilnahmebescheinigung der Deutschen Bildgebungskurs Rheumatologie vom 27.09.2019 bis 29.09.2019 in Rheumazentrum Rein Ruhr, in Düsseldorf, Deutschland
Teilnahmebescheinigung der 8 Pfizer Inflammation Campus vom 28.06.2019 bis 30.06.2019 in Berlin, Deutschland
Teilnahmebescheinigung und Poster Präsentation an der 34. Jahrestagung der Landesarbeitsgemeinschaft Rheumatologie und kooperatives Rheumazentrum RLP vom 05.04.2019 bis 06.04.2019 in Bad Kreuznach, Deutschland
Zertifikat über die Teilnahme und erfolgreiche Abschlussprüfung an dem Kurs Kapillarmikroskopie der Rheumatologische Fortbildungsakademie GmbH , Wilhelmine-Gemberg-Weg 6, 10179 Berlin am 05.04.2019 in Bad Kreuznach, Deutschland
DEGUM-Zertifikat über die erfolgreiche Teilnahme DEGUM Refresher-Kurs Arthrosonographie am 09.03.2019 in Göttingen, Deutschland
Bescheinigung für die erfolgreiche Teilnahme am Seminar „Cadio-Pulmonale Reanimation“ am 18.12.2018 in Bad Kreuznach, Deutschland
Zertifikat über die Teilnahme an dem Spiroergometrikurs heute- Implikationen für Klinik und Praxis vom 23.11.2018 bis 24.11.2018 in Würzburg, Deutschland
Teilnahmebescheinigung Ärztliche Fortbildung PAH Akademie Gießen, 4. Praxisseminar PAH und Kollagenosen am 03.11.2018 in Gießen, Deutschland
Teilnahmebescheinigung der Fortbildungsveranstaltung, 46. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), die 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädische Rheumatologie (DGORh) und der wissenschaftlichen Herbsttagung der Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie (GKJR) vom 19.09.2018 bis 22.09.2018 in 68161 Mannheim, Deutschland
Teilnahmebescheinigung Ärztliche Fortbildung, ACR-Update 2017 am 25.11.2017 in Frankfurt am Main, Bristol-Myers Squibb GmbH & Co.KGaA, Deutschland
Zertifikat über die Teilnahme an „ Experencia Programm Vienna “ vom 20 bis 21.11.2017 in Vienna Austria, Bristol-Myers Squibb GmbH & Co.KGaA
Teilnahmebescheinigung Ärztliche Fortbildung, Rheumatologie trifft Dermatology , UCB Pharma GmbH am 18.11.2017 in Gießen, Deutschland
Teilnahmebescheinigung Kurs für Klinische Immunologie am 17.11.2017 in Rheumazentrum Ruhrgebiet, Herne , Rheumatologische Fortbildungsakademie GmbH, Deutschland
Teilnahmebescheinigung Ärztliche Fortbildung, Exzellenz-Kurs SpA Psoriasis-Arthritis und axiale Spondarthritis 21.09.2017 bis 23.09.2017 in Seeheim-Jugenheim, Fraunhofer-Institut IME-Projektgruppe TMP, House of Pharma and Healthcare e.V Theodor-Stern-Kai 7, 60596 Frankfurt am Main, Deutschland

Teilnahmebescheinigung Ärztliche Fortbildung, 35. Münchener Intensivkurs Rheumatologie , Stammnummer (SNR) 676301 vom 16.02 bis 18.02.2017 in München, Deutschland
Teilnahmebescheinigung Ärztliche Fortbildungsveranstaltung Epidemiologie, Diagnostik und Therapie- Optionen bei Spondyloarthritis, Universitätsmedizin Berlin CBF, Rheumatologie , Veranstaltungsnummer (VNR) 2761102016057490003, vom 23.02 bis 24.02.2017 in Berlin, Deutschland
DEGUM-Zertifikat über die erfolgreiche Teilnahme an einem Sonographie-Grundkurs der Bewegungsorgane (Anwendungsbereich 10 Bewegungsapparat) vom 27.01 bis 29.01.2017 in Heidelberg, Deutschland
Zertifikat über die Teilnahme an einem Sonographie-Grundkurs des Abdomens in der Erwachsenendiagnostik (Gemäß den Richtlinien und in Zusammenarbeit mit der DEUGM und der Arbeitsgemeinschaft Ultraschall der Deutschen Röntgengesellschaft radprax MVZ- DEUGM vom 21.01 bis 22.01.2017 in Solingen, Deutschland
Zertifikat über die Teilnahme an der Intervention-Angiologie Werkstatt " Periphere Arterielle Verschlusskrankheit" 18.12.2015, Ohrid, Mazedonien
Zertifikat über die Teilnahme an der " 5th Macedonian Cardiology Congress" , 04.06.2014- 07.06.2014, Skopje, Mazedonien
Zertifikat über die Teilnahme an der Interventionskardiologie Werkstatt "CTO-Tips and Tricks with George Sianos" 05.04.2012, Ohrid, Mazedonien
Zertifikat über die Teilnahme und Poster Presentation an der 22th European Student Conference "Perspectives and Challenges in Regenerative Medicine" 21.09.2011- 24.09.2011, Berlin, Deutschland Publikation: Distribution of total IgE and specific IgE for Dermatophgoides Pteronyssinus (d1) in Republic of Macedonia, European journal of medical science, 22 nd , 126, Berlin, 2011

7. Mitgliedschaft

Landesärztekammer Mainz
Bezirksärztekammer Koblenz
Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie und Klinische Immunologie (DGRh)
ARRP-Landesarbeitsgemeinschaft Rheumatologie und kooperatives Rheumazentrum Rheinland-Pfalz
Ärztekammer Nordmazedonien

Datum 15.01.2025