

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Bedeutung Lipid-bindender Antiphospholipidantikörper für die Entstehung venöser  
Thromboembolien

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

Vorgelegt von

Isabel Emilia Kraus vom Cleff  
aus Wuppertal

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

Tag der Promotion: 07. Mai 2026

Nachnutzungslizenz: CC-BY-ND-4.0

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	II
Formelsammlung .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VII
1 Einleitung / Ziel der Dissertation .....	6
1.1 Grundlagen der (Auto-)Immunität .....	6
1.1.1 Das Immunsystem .....	6
1.1.2 Definition der Autoimmunität .....	8
1.1.3 Grundlagen der Autoimmunität .....	8
1.2 Das Antiphospholipid-Syndrom .....	9
1.2.1 Definition .....	9
1.2.2 Epidemiologie .....	9
1.2.3 Unterteilungs- und Abgrenzungsmöglichkeiten .....	9
1.2.3.1 Primäres APS vs. sekundäres APS .....	9
1.2.3.2 Catastrophic APS (CAPS) .....	9
1.2.3.3 Seronegatives APS (SN-APS) .....	9
1.2.4 Symptomatik und Klinik .....	10
1.2.5 Forschungshistorie des APS .....	11
1.2.5.1 Forschungshistorie des serologischen Antikörpernachweises bei APS .....	11
1.2.5.2 Forschungshistorie der sog. Kofaktoren des APS .....	12
1.2.6 Diagnostik .....	12
1.2.6.1 Klassifizierungskriterien .....	13
1.2.6.2 Das APS im ICD-10 und im ICD-11 .....	16
1.2.6.3 Möglichkeiten der Antikörperdiagnostik .....	17
1.2.6.4 Proteinaffinitätschromatografie und $\beta$ 2GPI .....	18
1.2.7 Sog. Kofaktorabhängigkeit: Mögliche Mechanismen und deren Evidenz .....	18
1.2.7.1 Hintergrund der sog. Kofaktorabhängigkeit .....	19
1.2.7.2 Validität bzw. Problematik des Konzepts der sog. Kofaktorabhängigkeit .....	21
1.2.7.3 Affinitätsaufreinigung als Ursache einer möglichen Proben- bzw. Ergebnisverfälschung .....	21
1.2.7.4 Effekt von Hinzugabe bzw. Ausschluss von sog. Kofaktoren auf den aCL-ELISA .....	23
1.2.7.5 Studienlage zur sog. Kofaktorabhängigkeit .....	25
1.2.8 Pathophysiologie .....	25
1.2.8.1 Zelluläre Mechanismen der Pathophysiologie .....	26
1.2.8.2 Humorale Mechanismen der Pathophysiologie .....	33
1.2.9 Therapieansätze .....	37
1.2.9.1 Allgemeine Herausforderungen der Therapie .....	37
1.2.9.2 Primärprophylaxe .....	37
1.2.9.3 Therapie und Sekundärprophylaxe .....	38

1.3	Zielsetzung dieser Dissertation .....	40
2	Material und Methoden .....	41
2.1	Material.....	41
2.1.1	Geräte .....	41
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	42
2.1.3	Reagenzien .....	43
2.1.4	Puffer und Lösungen .....	43
2.1.5	Fertigsysteme (sog. Kits).....	43
2.1.6	Software .....	44
2.2	Methoden .....	44
2.2.1	Studienvorbereitung.....	44
2.2.1.1	Auswahl der Negativkontrollen.....	44
2.2.1.2	Auswahl des suspekten Probenmaterials.....	45
2.2.1.3	Auswahl des Standards .....	45
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	45
2.2.2.1	Proteinfällung mittels Aussalzung .....	46
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop .....	47
2.2.3	Konzentrationsbestimmung mittels Qubit™ Protein BR Assay Kit.....	47
2.2.4	Cardiolipin-ELISA Typ <i>home made</i> .....	47
2.2.4.1	Vorbereitungen der ELISA-Platten .....	48
2.2.4.2	Durchführung Cardiolipin-ELISA Typ <i>home made</i> .....	48
2.2.4.3	Auswertung.....	49
2.2.5	Methoden der statistischen Analyse .....	49
2.2.5.1	Messgröße der Optischen Dichte.....	49
2.2.5.2	Vergleichbarkeit Schaffen: Messgröße der <i>Arbitrary Units</i> .....	50
2.2.5.3	Abgrenzung der Studienkollektive.....	50
2.2.5.4	z-Standardisierung.....	50
2.2.5.5	Testung auf Normalverteilung .....	51
2.2.5.6	Testung auf Log-Normalverteilung .....	52
2.2.5.7	Auswahl der nicht-parametrischen Methoden .....	52
3	Ergebnisse .....	56
3.1	Vorbereitung der Daten: Prüfung der Negativkontrollen.....	56
3.1.1	Akzidentiell fehlerhafte Versuchsdurchführung .....	56
3.1.2	Mögliche Ausreißer detektieren .....	56
3.1.3	Ausreißer definieren .....	58
3.1.4	Argumentation hinter dem Ausschluss der Ausreißer .....	59
3.2	Deskriptive Statistik .....	59
3.2.1	Lagemaße .....	59
3.2.2	Testung auf Normalverteilung .....	61
3.2.2.1	Testung auf Normalverteilung: Grafische Methodik.....	61
3.2.2.2	Testung auf Normalverteilung: Analytische Methodik.....	63

3.2.2.3	Testung auf Log-Normalverteilung .....	64
3.3	Explorative Statistik .....	64
3.3.1	Quantitative Analyse .....	64
3.3.1.1	Mann-Whitney-U-Test .....	64
3.3.1.2	Punktbiseriale Korrelation .....	65
3.3.1.3	Eta-Koeffizient .....	66
3.3.2	Qualitative Datenanalyse .....	67
3.3.2.1	Cut-off definieren .....	67
3.3.2.2	Anwendung des Cut-offs auf die Studienproben .....	67
3.3.2.3	Chi-Quadrat .....	68
4	Diskussion .....	70
4.1	Interpretation und Kontextualisierung der Ergebnisse .....	70
4.2	Studieninterne Methodenkritik und Limitierung des Versuchsaufbaus .....	71
4.2.1	Ausschluss sog. Kofaktoren als konzeptionelle Limitation .....	71
4.2.2	Technische Limitationen .....	71
4.2.3	Interferenzen und unspezifische Bindungen .....	71
4.2.4	Validierung und Vergleichbarkeit mit bestehenden Testsystemen .....	71
4.2.5	Limitationen der Probenselektion .....	72
4.3	Systemische Grenzen aktueller aPL-Testsysteme .....	72
4.3.1	Variabilität zwischen Laboratorien und Testsystemen .....	72
4.3.2	Kalibrierungsproblematik .....	72
4.3.3	Schwellenwerte und diagnostische Risiken .....	72
4.3.4	Zwischenfazit .....	73
4.4	Hypothetisches optimales Nachweisverfahren Lipid-bindender aCL .....	73
4.5	Hypothesenprüfung: Pathogenes Potenzial Lipid-bindender aCL .....	74
4.5.1	Empirische Grundlage und erste Hinweise .....	74
4.5.2	Biologische Plausibilität .....	74
4.5.3	Pathogenetische Relevanz oder Epiphänomen .....	74
4.5.4	Kausalanalyse nach Bradford-Hill .....	75
4.5.5	Zwischenfazit .....	75
4.6	Mögliche Implikation für Klinik, Forschung und Therapie .....	76
4.6.1	Klinische Relevanz und diagnostische Konsequenzen .....	76
4.6.2	Forschungsbedarf .....	76
4.6.3	Therapeutische Perspektiven .....	76
4.7	Fazit der Diskussion .....	77
5	Zusammenfassung .....	78
6	Anhang .....	80
6.1	Weiterführende Informationen zu dem immunologischen Gedächtnis .....	80
6.2	Weiterführende Informationen zu Autoimmunität .....	80
6.3	Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie des serologischen Antikörpernachweises bei APS .....	81

6.3.1	Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie der aCL .....	81
6.3.2	Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie des LA .....	81
6.3.3	Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie der a $\beta$ 2GPI .....	82
6.4	Weiterführende Informationen zur historischen Begründung des Konzepts der sog. Kofaktorabhängigkeit von aCL .....	82
6.5	Weiterführende Informationen zu $\beta$ 2GPI .....	84
6.6	Weiterführende Informationen zu der PAR-2-Signalvermittlung .....	84
6.7	Weiterführende Informationen zur Auswahl des Probenmaterials .....	85
6.7.1	Weiterführende Informationen zur Auswahl der Negativkontrollen .....	85
6.7.2	Weiterführende Informationen zur Auswahl der Studienproben: GMP-VTE-Studie .....	86
6.7.2.1	VTEval-Projekt .....	86
6.7.2.2	FOCUS-Studie und FOCUS-BioSeq-Projekt .....	87
6.8	Gebrauchsanweisung des verwendeten Qubit™-Kits .....	87
6.9	Weiterführende Informationen zu der Testung auf Log-Normalverteilung .....	89
6.10	Weiterführende Informationen zu den systemischen Grenzen aktueller aPL-Testsysteme .....	91
6.11	Weiterführende Informationen zu der Kausalanalyse nach Bradford-Hill .....	94
7	Literaturverzeichnis .....	96
8	Danksagung .....	119
9	Tabellarischer Lebenslauf .....	120

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Komponenten des angeborenen Immunsystems .....	7
Abbildung 2	Komponenten des adaptiven Immunsystems.....	8
Abbildung 3	Flussdiagramm (Work flow) zur Diagnosestellung des APS, vereinfacht nach Barbhaya et al. (17).....	14
Abbildung 4	Konformation und Bindungsstellen von $\beta$ 2GPI. Bildquelle: P.G. DE GROOT, J.C.M. MEIJERS, $\beta$ 2-Glycoprotein I: evolution, structure and function, Journal of Thrombosis and Haemostasis, Volume 9, Issue 7, 2011, Pages 1275-1284, ISSN 1538-7836.....	18
Abbildung 5	Möglichkeiten der Funktion von $\beta$ 2GPI bei sog. kofaktorabhängigen aCL.....	20
Abbildung 6	mögliche Kontaminationsquelle im Rahmen der Affinitätsaufreinigung .....	22
Abbildung 7	Eluat-Analyse, Bildquelle: McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl A .....	23
Abbildung 8	Cardiolipin-ELISA unter Ausschluss von $\beta$ 2GPI.....	24
Abbildung 9	Cardiolipin-ELISA in Anwesenheit von $\beta$ 2GPI.....	25
Abbildung 10	aPL-vermittelte Signalkaskade in dendr. Zellen und Monozyten, Bildquelle: N. Müller-Calleja et al. Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity. Science371, eabc0956 (2021).....	28
Abbildung 11	Aktivierungskontext von Protein C zu APC .....	34
Abbildung 12	zelluläre PAR-1-Signalkaskade je nach grundlegendem Aktivierungsmechanismus.....	35
Abbildung 13	beispielhafte Verdünnungsreihe des Standards HL5B .....	50
Abbildung 14	Übersicht über die Verteilung der AU aller Negativkontrollen .....	56
Abbildung 15	Übersicht über die Verteilung aller z-Faktorwerte der Negativkontrollen .....	57
Abbildung 16	Streudiagramm der z-Faktorwerte der Negativkontrollen in Zweifachbestimmung .....	57
Abbildung 17	Streudiagramm der z-Faktorwerte der Negativkontrollen in Dreifachbestimmung .....	58
Abbildung 18	Boxplot: Vergleich der AU-Mittelwerte der beiden Subgruppen.....	61
Abbildung 19	Histogramm Mittelwert AU beider Subgruppen .....	62
Abbildung 20	Streudiagramm der AU-Mittelwerte mit Cut-off-Markierung .....	67
Abbildung 21	Linearer Zusammenhang: Gruppenzugehörigkeit und AU-Wert.....	70
Abbildung 22	Stichprobengenerierung der GHS, Bildquelle: Wild PS, Zeller T, Beutel M, Blettner M, Dugi KA, Lackner KJ, et al. [The Gutenberg Health Study]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2012;55(6-7):824-9. ....	86
Abbildung 23	VTEval Projektablauf. Bildquelle: Frank B et al. Rationale and design of three observational, prospective cohort studies including biobanking to evaluate and improve diagnostics, management strategies and risk stratification in venous thromboembolism BMJ Open. 2015;5(7):e008157. ....	87
Abbildung 24	Histogramm Mittelwert Log-AU beider Subgruppen .....	90
Abbildung 25	Boxplot Mittelwert Log-AU beider Subgruppen.....	90
Abbildung 26	Interlaborative Variabilität von aCL-ELISAs; Bildquelle: Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. Thromb Res. 2007;120(1):127-33.....	92
Abbildung 27	EQAs Auswertung aCL-ELISA-Kits der ECAT-Foundation; Bildquelle: Huisman A, Urbanus RT, Meijer P. Antiphospholipid antibody solid phase-based assays: problems and proposed solutions for the 2023 ACR/EULAR classification criteria for antiphospholipid syndrome. J Thromb Haemost. 2024;22(3):874-6. ....	93

## Abkürzungsverzeichnis

aANX	Annexin A5-Antikörper
Abb.	Abbildung
aCL	Anti-Cardiolipin-Antikörper
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
AK	Antikörper
ANAs	Antinukleäre Antikörper
antiinflammator.	Anttiinflammatorisch
aPA	Antiphosphatidsäure-Antikörper
APC	<i>activated protein C</i>
APCs	professionell antigenpräsentierende Zellen
aPL	Antiphospholipidantikörper
aPI	Antihosphatidylinositol-Antikörper
apo-H	Apolipoprotein H
APS	Antiphospholipid-Syndrom
aPS	Antiphosphatidylserine-Antikörper
aPS/PT	Antiphosphatidylserine/ prothrombin-AKs
aPTT	<i>activated partial thromboplastin time</i>
ARF	Akutes rheumatisches Fieber
ASM	<i>Acid sphingomyelinase</i>
ATP	Adenosintriophosphat
AU	<i>arbitrary units</i>
AVA/CL	Antivimentin/Cardiolipin-Komplex-Antikörper
aβ2GPI	Anti- Beta 2-Glykoprotein I-Antikörper
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bes.	besonders
BFP	<i>biological flase-positive</i>
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BR	<i>Broad Range</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bspw.	Beispielsweise
CAPS	katastrophales APS
CCL26	<i>CC-chemokine ligand 26</i>
CCP	<i>Complement Control Protein</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Chron.	chronisch
CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CRP	C-reaktives Protein
CTEPH	chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie
CV	<i>coefficient of variation</i>
dendr.	dendritisch
dest.	Destilliert
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase1	Desoxyribonuklease 1
DOAKs	Direkte Orale Antikoagulanzen
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
dRTVVV	<i>Dilute Russel's viper venom time Test,</i>
dsRNA	<i>double stranded ribonucleic acid</i>
ECAT	<i>external quality control of diagnostic assays and tests (with focus on thrombosis an heamostasis)</i>

ED	Encephalomyelitis disseminata (siehe MS)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Engl.	Englisch
entspr.	Entsprechend
EPCR	<i>Endothelial Protein C Receptor</i>
EQA	<i>external quality assessment</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
ET-1	Endothelin-1
EULAR	<i>Eurpean League Against Rheumatism</i>
Fab-Fragment	<i>Fragment antigen binding</i>
FOCUS BioSeq	<i>Biochemical and Genetic Biomarkers in Sequelae of Acute Pulmonary Embolism Study</i>
GABHS	Gruppe A beta-hämolisierende Streptokokken
GHS	<i>Gutenberg Health Study</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GMP-VTE	<i>Genotyping and Molecular phenotyping of Venous thromboembolism project</i>
GPC	Gelpermeationschromatographie
GPL	<i>G-class Phospholipid Unit; IgG aCL</i>
GPR11	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 11
GRADE	<i>Grading of Recommendations, Assesment, Deveelopment and Evaluation</i>
h	Stunde
H0	Nullhypothese
H1	Alternativhypothese
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure (synonym: Chlorwasserstoffsäure)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
i. d. R.	In der Regel
IBM	<i>International Business Machines Corporation</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecul-1</i>
ICD	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IFN	Interferon
IFNAs	<i>Interferon alpha (coding) genes</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INR	<i>International Normalized Ratio</i> (standardisierter Quick-Wert)
insb.	Insbesondere
ISTH	<i>International Society of Thrombosis and Hemostatsis</i>
kDa	Kilodalton
KUS	Kompressionssonographie
LA	Lupus- Antikoagulans
LBPA	Lysobisphosphatidsäure
LDA	<i>Low Dose Aspirin</i>
LK	Lymphknoten
Log	Logarithmisch
LPS	Lipopolysaccharide
LPS	Lipopolysaccharid
Lymphat.	Lymphatisch
M.	Morbus
MAC	<i>membrane attack complex</i>

MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
Max.	Maximal
MFI	Multiplex-Flow-Immunoassay
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mind.	Mindestens
MS	Multiple Sklerose (siehe ED)
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
N	Stoffmenge
NADPH	Nicotinamidenindinukleotidphosphat
NETs	<i>neutrophile extracellular traps</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMH	Niedermolekulares Heparin
NOX	Nicotinamidenindinukleotidphosphat-Oxidase
o.	oder
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
OD	Optische Dichte
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PAR-1	<i>protease-activated receptor 1</i>
PAR2	<i>protease-activated receptor 2</i>
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PDGF	<i>platelet-derived growth fact</i>
periph.	peripher
PF4	Plättchenfaktor 4
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase / Protein Kinase B
prim.	primär
proinflammator.	Proinflammatorisch
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PS	Phosphatidylserin
PSRA	poststreptokokkenreaktive Arthritis
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q-Q-Diagramm	Quantil-Quantil-Diagramm
QS	Quadratsumme
RA	Rheumatoide Arthritis
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RCT	<i>randomized controlled trial</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPGN	<i>Rapidly progressive glomerulonephritis</i>
S1PR1	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor 1</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sek.	sekundär
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SN-APS	Seronegatives APS
ssDNA	<i>single stranded desoxyribonucleic acid</i>
ssRNA	<i>single stranded ribonucleic acid</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STSS	Streptokokken-induziertes toxisches Schock-Syndrom
Tab.	Tabelle
TAFI	<i>Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor</i>
TBM-Substrat	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat

TF	<i>Tissue factor</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math>1</i>
TG- $\beta$	$\beta$ -Thromboglobulin
TIA	transitorische ischämische Attacke
TLR	Toll-Like Rezeptor
TM	<i>Unregistered Trademark</i>
TM	Thrombomodulin
TNF	Tumornekrosefaktor
TTI	<i>Thromboplastin Inhibiting Test</i>
TVT	Tiefe Beinvenenthrombose
u.	und
u. a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
UCUM	<i>The Unified Code for Units of Measure</i>
UFH	Unfraktioniertes Heparin
UM	Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
usw.	und so weiter
v.	von bzw. vom
v. a.	vor allem
V. a.	Verdacht auf
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
versch.	Verschieden
VKA	Vitamin K Antagonisten
VTE	Venöses Thromboembolie
vWF	von Willebrand Faktor
WPBs	<i>Weibel-Palade Bodies</i>
WW	Wechselwirkung
x	Abszisse, grafische Achse
y	Ordinate, grafische Achse
z. B.	Zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
$\beta$ 2GPI	Beta 2-Glykoprotein I
$\mu$	Micro
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

## Formelsammlung

Formel 1 z-Standardisierung .....	51
Formel 2 arithmetisches Mittel.....	51
Formel 3 transformierte Zufallsvariable .....	52
Formel 4 Effektstärke r .....	53
Formel 5 punktbiseriale Korrelation .....	53
Formel 6 Varianz .....	53
Formel 7 Standardabweichung.....	54
Formel 8 Cut-off .....	54
Formel 9 Chi-Quadrat-Berechnung.....	54
Formel 10 Effektstärke Phi .....	55
Formel 11 Effektstärke des Mann-Whitney-U-Tests bei einer asymptotischen Signifikanz von 0,027 .....	65
Formel 12 Effektstärke der punktbiserialen Korrelation bei einem Korrelationskoeffizienten von ca. -0,154 .....	66
Formel 13 Quadrierung von Eta .....	67
Formel 14 Cut-off-Berechnung anhand der Lagemaße der Negativkontrollen .....	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 klinische Manifestationen von 1.000 APS-Patient*innen zum Zeitpunkt des Ausbruches der Krankheit, vereinfacht nach Cervera et al. (30) .....	10
Tabelle 2 mögliche „non-criteria“-Manifestationen des APS .....	10
Tabelle 3 Auswahl verschiedener sog. "non-criteria" APS-Antibodies -Ant .....	12
Tabelle 4 additiv gewichtete klinische Kriterien zur Diagnosestellung des APS: Insgesamt acht Domänen, die in sechs klinische und zwei labortechnische Bereiche unterteilt sind. Vereinfacht nach Barbhaiya et al. (17) .....	15
Tabelle 5 additiv gewichtete laborchemische Kriterien zur Diagnosestellung des APS: Insgesamt acht Domänen, die in sechs klinische und zwei labortechnische Bereiche unterteilt sind. Vereinfacht nach Barbhaiya et al. (17) .....	16
Tabelle 6: vorläufige Klassifikationskriterien des CAPS, 2002, Taormina. Vereinfacht nach Asherson et al. (84) .....	16
Tabelle 7 Für die Thematik der sog. Kofaktorabhängigkeit relevanten Antikörperuntergruppen .....	19
Tabelle 8 Vereinfachte Übersicht der Subgruppen dendritischer Zellen.....	27
Tabelle 9 Thrombozytengranula: Untergruppen und Vesikelinhalt.....	30
Tabelle 10 Effekte von Mediatoren und Adhäsionsmolekülen aktivierter Endothelzellen .....	31
Tabelle 11 Effekte von APC.....	36
Tabelle 12 Abweichende Therapiestrategie einer Phlebothrombose bei APS-Patient*innen im Vergleich zur Standardtherapie .....	39
Tabelle 13 verwendete Laborgeräte .....	41
Tabelle 14 Verbrauchsmaterialien .....	42
Tabelle 15 Reagenzien.....	43
Tabelle 16 Antikörper .....	43
Tabelle 17 Puffer und Lösungen.....	43
Tabelle 18 Fertigsysteme (Kits) .....	43
Tabelle 19 Verwendete Computer-Softwares und Assistenzsysteme .....	44
Tabelle 20 Auftragung des Probenmaterials auf die Kavitäten der ELISA-Mikrotiterplatte ...	48
Tabelle 21 Interpretation der z-Werte .....	51
Tabelle 22 Effektgrenzen nach Cohen (1988) bzw. Cohen (1992).....	53
Tabelle 23 Messwerte der z-Werte der Negativkontrollen oberhalb der gängigen Konfidenzintervallgrenzen .....	58
Tabelle 24 Definierte Ausreißer im Kollektiv der Negativkontrollen .....	58
Tabelle 25 Lagemaße AU: Negativkontrollen .....	60
Tabelle 26 Lagemaße AU: Studienproben.....	60
Tabelle 27 (trendbereinigte) Q-Q-Diagramme zur Testung auf Normalverteilung .....	63
Tabelle 28 Analytische Methodik: Tests auf Normalverteilung .....	63
Tabelle 29 Rangbildung: Mann-Whitney-U-Test .....	64
Tabelle 30 Mann-Whitney-U-Testergebnis .....	65
Tabelle 31 punktbiseriale Korrelation: Vergleich AU und Gruppenzuteilung .....	65
Tabelle 32 Eta-Koeffizient als Richtungsmaß .....	66
Tabelle 33 Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test.....	68
Tabelle 34 Chi-Quadrat-Test .....	69
Tabelle 35 EPCR-vermittelte Modulation der PAR-2-Aktivität.....	85
Tabelle 36 (trendbereinigte) Q-Q-Diagramme zur Testung auf Log-Normalverteilung .....	91
Tabelle 37 analytische Tests auf Log-Normalverteilung.....	91

# 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

## 1.1 Grundlagen der (Auto-)Immunität

Ein intaktes Immunsystem ist für das Überleben des Menschen essenziell. Es schützt den Organismus vor Infektionen durch Mikroorganismen und Viren sowie vor der Entartung körpereigener Zellen. Zentrale Aufgabe des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ sowie zwischen gesunden und mutierten Zellen (1, 2).

### 1.1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem gliedert sich in angeborene und adaptive Anteile (3). Diese Unterteilung entspringt eher einem deskriptiven Interesse, tatsächlich sind beide Anteile des Immunsystems eng miteinander verwoben.

Aus evolutionärer Sicht ist das angeborene Immunsystem deutlich älter. Es umfasst physikalische Barrieren (bspw. Epithelien, Haut, Nägel), chemischen Komponenten (bspw. (Magen-)Säure) und (kontinuierlichen) Transportmechanismen (bspw. Hustenreflex, Zilienschlag, Tränen, Urin etc.). Zusätzlich wirken zelluläre (bspw. Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Granulozyten, Mastzellen) und humorale Komponenten (bspw. Lysozym, Komplementsystem, proinflammatorische Zytokine, Defensine (4, 5)). Eine vereinfachte Zusammenfassung bietet die Abbildung 1 Komponenten des angeborenen Immunsystems.

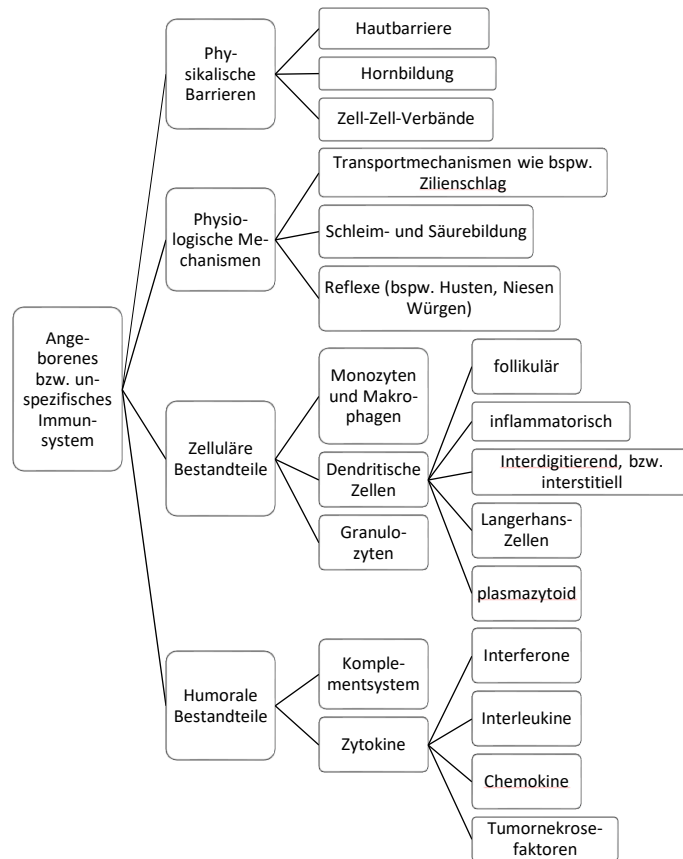


Abbildung 1 Komponenten des angeborenen Immunsystems

Charakterisierend für das angeborene Immunsystem ist eine unspezifische Immunantwort, die nur eine geringe Vorlaufzeit erfordert. Diese Immunantwort fußt auf der Erkennung konservierter Pathogenstrukturen (sog. PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*)) durch sog. PRRs (*pattern recognition receptors*), wie u. a. Toll-like-Rezeptoren (TLR) (6-9).

Das adaptive Immunsystem reagiert verzögert, ermöglicht jedoch eine hochspezifische Abwehr. Auch dieses System lässt sich in zelluläre und humorale Bestandteile gliedern (siehe Abbildung 2 Komponenten des adaptiven Immunsystems).

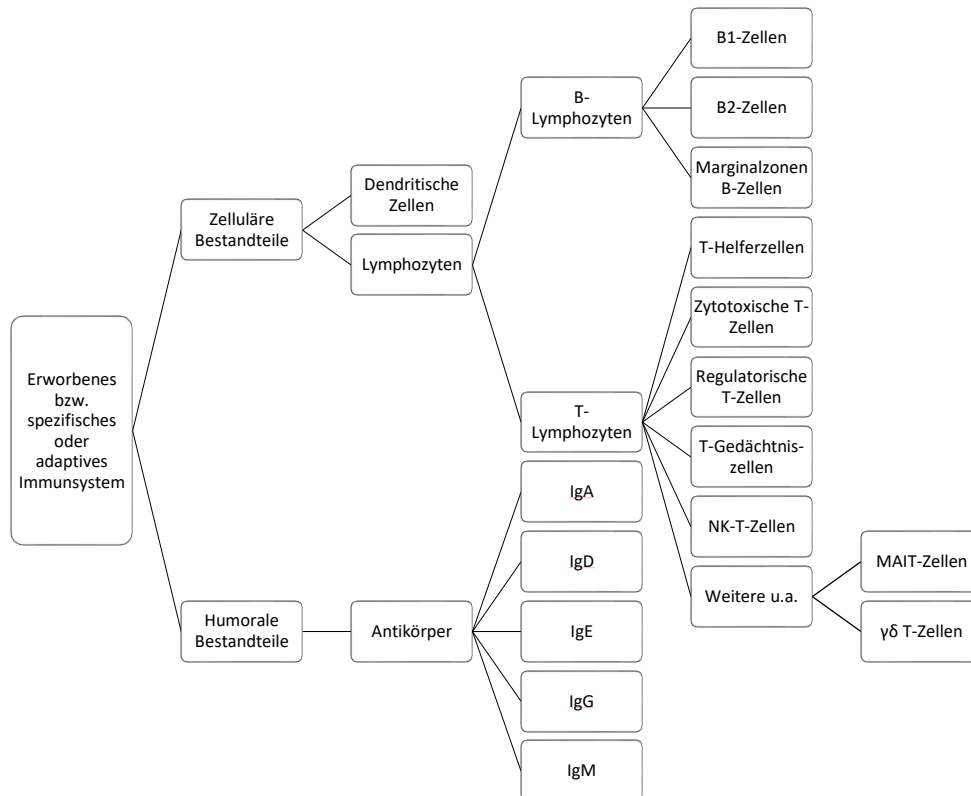


Abbildung 2 Komponenten des adaptiven Immunsystems

Diese Spezifität des adaptiven Immunsystems wird durch Rekombination und somatische Mutation erlangt, wodurch eine breite Vielfalt an Lymphozyten entsteht, die auf unterschiedlichste Antigene spezialisiert sind (10). Voraussetzung für die Aktivierung ist die Antigenpräsentation durch u. a. dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Lymphozyten (sog. (professionell) antigenpräsentierende Zellen (APCs)). Das adaptive Immunsystem ist exklusiv in der Lage, durch Gedächtnis-B- und -T-Zellen sowie Antikörper-produzierende Plasmazellen ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln (siehe 6.1 Weiterführende Informationen zu dem immunologischen Gedächtnis).

### 1.1.2 Definition der Autoimmunität

Autoimmunität bezeichnet eine adaptive Immunreaktion gegen körpereigene Antigene (10). Pathophysiologisch liegt ein Verlust der immunologischen Toleranz zugrunde, wodurch die Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst gestört ist (11).

### 1.1.3 Grundlagen der Autoimmunität

Die Entstehung von Autoimmunität ist multifaktoriell. Neben genetischer Prädisposition spielen Umweltfaktoren und Infektionen eine Rolle. Ein wichtiger Mechanismus ist das sog. molekulare Mimikry, bei dem strukturelle Ähnlichkeiten zwischen mikrobiellen und körpereigenen Antigenen zu autoreaktiven Immunantworten führen können. Ein klassisches Beispiel sind Post-Streptokokken-Erkrankungen nach Infektionen mit  $\beta$ -hämolyzierenden Streptokokken

der Gruppe A ((GABHS) siehe 6.2 Weiterführende Informationen zu Autoimmunität (12-15)). Daneben können autoreaktive T-Zellen direkt zur Initiierung von Autoimmunerkrankungen beitragen (11, 16).

## 1.2 Das Antiphospholipid-Syndrom

### 1.2.1 Definition

Das Antiphospholipid-Syndrom (APS) gehört zu den systemischen Autoimmunerkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Es ist durch rezidivierende venöse oder arterielle Thrombosen und/oder Schwangerschaftskomplikationen charakterisiert, die mit einem persistierenden Nachweis von Antiphospholipidantikörpern (aPL) assoziiert sind (17).

### 1.2.2 Epidemiologie

Die Inzidenz des APS liegt bei etwa 5 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen pro Jahr, die Prävalenz bei 40-50 pro 100.000. Aufgrund einer vermuteten hohen Dunkelziffer sind die tatsächlichen Werte unklar. Frauen sind häufiger betroffen als Männer (18, 19).

Das APS ist eine wesentliche Ursache erworbener Thrombophilien. Schätzungen zufolge ist es bei Patient\*innen unter 50 Jahren an etwa jedem sechsten Hirninfarkt, jedem neunten Myokardinfarkt und jeder elften TVT beteiligt (20-22).

### 1.2.3 Unterteilungs- und Abgrenzungsmöglichkeiten

#### 1.2.3.1 Primäres APS vs. sekundäres APS

Es wird das primäre vom sekundären APS unterschieden. Das primäre APS tritt isoliert auf, während das sekundäre APS in Kombination mit anderen Autoimmunerkrankungen, vor allem mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) vorkommt (23-25).

#### 1.2.3.2 Catastrophic APS (CAPS)

Katastrophales APS (*Catastrophic Antiphospholipid Syndrome (CAPS)*) ist eine seltene, lebensbedrohliche Sonderform des APS mit rascher Progredienz und disseminierter Thrombose, insbesondere der Mikrozirkulation (26). CAPS kann sich als komplexes Syndrom präsentieren, bis hin zum multiplen Organversagen (27, 28). Betroffen sind v. a. Nieren (ca. 74 %), Gehirn (ca. 56 %), Lunge (ca. 55 %) und Herz (ca. 53 % (28, 29)). Die Letalität liegt bei etwa einem Drittel der Fälle (29). Das CAPS betrifft ca. 1 % der APS-Patient\*innen (30).

#### 1.2.3.3 Seronegatives APS (SN-APS)

Unter SN-APS versteht man Verläufe mit klinischer Symptomatik, aber fehlendem Nachweis klassischer aPL. Häufig sind non-criteria antibodies nachweisbar (31, 32). Ein wahrhaftig seronegatives APS kann per definitionem nicht existieren, sofern die pathophysiologische Relevanz der aPL als ursächlicher Faktor des APS vorausgesetzt wird.

### 1.2.4 Symptomatik und Klinik

Hauptmanifestationen des APS sind rezidivierende venöse und arterielle Thrombosen sowie Schwangerschaftskomplikationen ((33), vgl. Abschnitt 1.2.1 Definition). Die größte Datengrundlage basiert auf einer 2002 von Cervera et al. durchgeführten Studie, die die klinischen Manifestationen von 1.000 Proband\*innen mit APS analysierte (30). Generell lässt sich sagen, dass Phlebothrombosen häufiger beobachtet werden als arterielle Okklusionen (25). Tiefe Beinvenenthrombosen (TVT) stellen mit 31,7 % das häufigste Symptom eines APS dar (siehe Tabelle 1 klinische Manifestationen von 1.000 APS-Patient\*innen zum Zeitpunkt des Ausbruches der Krankheit, vereinfacht nach Cervera et al. (30).

*Tabelle 1 klinische Manifestationen von 1.000 APS-Patient\*innen zum Zeitpunkt des Ausbruches der Krankheit, vereinfacht nach Cervera et al. (30)*

<b>Klinische Manifestation</b>	<b>Prozentualer Anteil der Patient*innen</b> Einige Patient*innen wiesen > 1 Symptom gleichzeitig auf
TVT	31,7
Thrombozytopenie (< 100.000 / $\mu$ l)	21,9
Livedo racemosa	20,4
apoplektische Insulte	13,1
oberflächliche Thrombophlebitis	9,1
Lungenembolie (LAE)	9,0
Fehlgeburten	8,3
transitorische ischämische Attacke (TIA)	7,0
hämolytische Anämie	6,6
Hautgeschwüre (Ulzerationen)	3,9

Das APS kann als erworbene autoimmunbedingte Thrombophilie eingeordnet werden (34). Zusätzlich wurden sog. „non-criteria“-Manifestationen beschrieben, die nicht allein durch Hyperkoagulabilität erklärt werden können (siehe Tabelle 2 mögliche „non-criteria“-Manifestationen des APS (24, 30, 32, 35, 36)).

*Tabelle 2 mögliche „non-criteria“-Manifestationen des APS*

<b>Organ(system)</b>	<b>„non-criteria“-Manifestationen des APS</b>
Nervensystem	Demenz, unspezifische Epilepsie, Chorea, Myelitis, <i>Multiple sclerosis (MS)-like illness</i> , Ataxie
Herz	Libman-Sacks-Endokarditis
Blut	Hämolytische Anämie
Nieren	Chron. vaso-okklusive Läsionen: Atherosklerose, arterielle fibrose Intimahyperplasie, glomeruläre Ischämie, interstitielle Fibrose
Lunge	Alveolarfibrosierung, pulmonale Hypertonie

Schwangerschaftskomplikationen umfassen (Prä-)Eklampsie, Plazentainsuffizienz, intrauterine Wachstumsrestriktion, Frühgeburten und gehäufte Fetalverluste (30, 37, 38).

### 1.2.5 Forschungshistorie des APS

1983 wurde das APS erstmalig von Graham Hughes als eigenständiges Krankheitsbild beschrieben (39). Hughes konnte einen Zusammenhang zwischen den laborchemisch nachgewiesenen aPL und den klinisch beobachteten Thrombosen und Aborten aufzeigen. Im Folgenden werden die wichtigsten Entwicklungen des serologischen Antikörpernachweises und der Kofaktoren dargestellt.

#### 1.2.5.1 Forschungshistorie des serologischen Antikörpernachweises bei APS

Für die Diagnostik des APS sind drei Antikörper von zentraler Bedeutung: Anti-Cardiolipin-Antikörper (aCL), Lupus-Antikoagulanz (LA) und Anti- $\beta$ 2-Glykoprotein I (a $\beta$ 2GPI).

##### 1.2.5.1.1 Anti-Cardiolipin-Antikörper

Erste Hinweise auf aCL stammen aus der Syphilis-Diagnostik (sog. Wassermann-Reaktion, 1906 (40)). Das dabei verwendete Antigen wurde 1941 als Cardiolipin identifiziert, ein Diphosphatidylglycerin der bakteriellen und mitochondrialen Membran (siehe 6.3.1 Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie der aCL (22, 41, 42)).

Antikörper gegen Cardiolipin waren auch in Seren von Patient\*innen nachweisbar, die nie an einer Syphilis erkrankt waren (falsch-positive Testergebnisse (sog. BFP = *biological false-positive* (22)). In dieser Patient\*innenkohorte wurde eine hohe Korrelation mit verschiedenen Autoimmunkrankheiten, darunter SLE, festgestellt (43). Man schlussfolgerte, dass BFP Wassermann-Reaktionen mit Autoimmunität assoziiert sein könnten (22).

##### 1.2.5.1.2 Lupus-Antikoagulanz

Seit den 1950er-Jahren wurde wiederholt ein paradoxes Phänomen beschrieben: Patient\*innen zeigten *in vitro* eine verlängerte Gerinnungszeit, entwickelten jedoch *in vivo* thrombotische Ereignisse, teils mit letalem Verlauf (22). Zunächst wurde ein „*circulating anticoagulant*“ vermutet, bis später IgG- und IgM-Antikörper identifiziert wurden, die Phospholipide binden und dadurch Gerinnungstests beeinflussen (44-46). Der Begriff „Lupus-Antikoagulanz“ wurde 1972 geprägt (vertiefend siehe 6.3.2 Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie des LA (47)).

##### 1.2.5.1.3 Anti- $\beta$ 2GPI

Ursprünglich wurde angenommen, dass alle aPL direkt an anionische Phospholipide binden. Untersuchungen von McNeil et al. zeigten jedoch, dass eine messbare Interaktion im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) erst nach Zugabe von Serum- oder Plasmaproteinen nachweisbar war (48). Dies führte zu der Hypothese, dass bestimmte Plasmaproteine als sog. Kofaktoren für die Bindung erforderlich sind (vertiefend siehe 6.3.3 Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie der a $\beta$ 2GPI). Als wichtigster Kandidat wurde  $\beta$ 2-

Glykoprotein I ( $\beta$ 2GPI) identifiziert, das seither als zentrales Antigen in diesem Kontext betrachtet wird und die Antikörpersubgruppe der sog. kofaktorabhängigen aCL definierte (49, 50). In weiteren Arbeiten wurden auch Antikörper direkt gegen  $\beta$ 2GPI (a $\beta$ 2GPI) nachgewiesen (51).

#### 1.2.5.1.4 Non-criteria antibodies

Zusätzlich wurden weitere Antikörper beschrieben, darunter IgA-Isotypen der sog. *criteria antibodies* sowie Antikörper gegen Annexin A5, Prothrombin oder Phosphatidylserin (52-55). Ihre pathophysiologische Bedeutung ist Gegenstand aktueller Forschung (52, 56-59). Die Tabelle 3 Auswahl verschiedener sog. "non-criteria" APS-Antibodies soll einen vereinfachten Überblick über einige der bekannten sog. „non-criteria“ antibodies geben.

Tabelle 3 Auswahl verschiedener sog. "non-criteria" APS-Antibodies

Abkürzung	Bezeichnung	Klinische Assoziation u. a.	Quellen
aANX bzw. aA5	Annexin A5-Antikörper	Thrombosen, Schwangerschaftskomplikationen	(60-63)
aPS/PT	Antiphosphatidylserine/prothrombin-AKs	Thrombosen, Schwangerschaftskomplikationen	(62, 64-66)
aPS	Antiphosphatidylserine-AKs	Fetaltod, prothrombotisch	(67, 68)
aPA	Antiphosphatidsäure-AKs	Fetaltod	(69)
aPI	Antiphosphatidylinositol-AKs	Fetaltod	(63)
AVA/CL	Antivimentin/Cardiolipin-Komplex-AKs	arterielle Thrombosen	(70-72)

#### 1.2.5.2 Forschungshistorie der sog. Kofaktoren des APS

Seit den 1990er-Jahren gilt  $\beta$ 2GPI als zentraler Kofaktor in der Pathogenese des APS (48, 50). Weitere mit dem APS-assoziierte sog. Kofaktoren sind bspw. Prothrombin, Annexin II und Annexin V.  $\beta$ 2GPI wurde erstmals 1961 beschrieben (73). Über die Funktion von  $\beta$ 2GPI ist heute über 60 Jahre später wenig bekannt. Bereits 1968 wurden erstmals Personen mit einem  $\beta$ 2GPI-Mangel beschrieben. Dieser Mangel schien allerdings nicht mit gesundheitlichen Folgen für diese Personen einherzugehen (74).

Ein Großteil der bisherigen Erkenntnisse existiert bislang nur *in vitro*, während der *in vivo* Nachweis noch aussteht. Es werden sowohl direkte als auch indirekte Effekte auf die Gerinnung vermutet. Zur weiteren Darstellung wird u. a. auf die Quellen (75-81) sowie das Unterkapitel 6.5 Weiterführende Informationen zu  $\beta$ 2GPI verwiesen.

#### 1.2.6 Diagnostik

Die Diagnosestellung des APS gelingt durch ein duales System aus charakteristischer Klinik und dem Vorliegen eines typischen Antikörperprofils.

#### 1.2.6.1 Klassifizierungskriterien

Bereits 1998 wurden die vorläufigen Klassifizierungskriterien des APS während des *Eighth International Symposium on Antiphospholipid Antibodies* in Sapporo, Japan, festgelegt (82). Eine Überarbeitung dieser *Sapporo-Kriterien* erfolgte etwa acht Jahre später im Rahmen des *Eleventh International Congress on antiphospholipid antibodies* in Sydney, Australien (33). 2023 folgte eine erneute Revision durch das *American College of Rheumatology (ACR)* bzw. die *European League Against Rheumatism (EULAR)*. Basis dieser Revision stellte eine internationale Kohorte von rund 900 APS-Patient\*innen dar (17). Anders als die Sapporo-/Sydney-Kriterien verfolgen die ACR/EULAR-Kriterien ein streng auf Spezifität ausgerichtetes System. Diese Schwerpunktsetzung verbessert die Vergleichbarkeit von Studienkohorten, geht jedoch mit einer reduzierten Sensitivität einher. Das Nichterfüllen der Kriterien schließt die Diagnose APS daher nicht aus, führt aber in der Regel zum Ausschluss aus klinischen Studien.

Wie ihre Vorgänger beruhen auch die ACR/EULAR-Kriterien auf einem dualen System aus klinischen und laborchemischen Manifestationen. Neu ist die risikostratifizierte, gewichtete und hierarchisch geclusterte Struktur (17). Das Verfahren erfolgt zweistufig: Zunächst müssen Eingangskriterien erfüllt sein. Anschließend erfolgt eine gewichtete Analyse, bei der klinische und laborchemische Kriterien in acht Domänen zusammengeführt werden. Die Diagnose APS gilt als gesichert, wenn sowohl die klinischen (Domänen 1-6) als auch die laborchemischen Kriterien (Domänen 7-8) jeweils mindestens drei Punkte erreichen (siehe Abbildung 3 Flussdiagramm (Work flow) zur Diagnosestellung des APS, vereinfacht nach Barbhaiya et al. (17) sowie Tabelle 4 sowie Tabelle 5 additiv gewichtete laborchemische Kriterien zur Diagnosestellung des APS: Insgesamt acht Domänen, die in sechs klinische und zwei labortechnische Bereiche unterteilt sind. Vereinfacht nach Barbhaiya et al. (17) (83)).

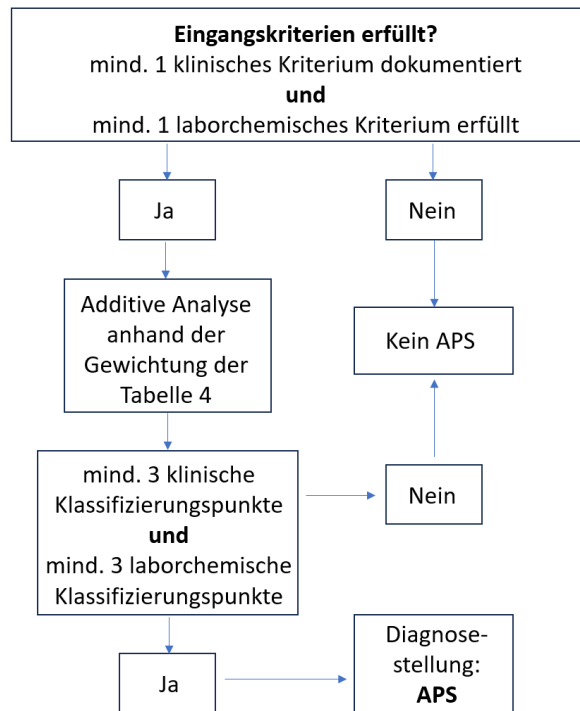


Abbildung 3 Flussdiagramm (Work flow) zur Diagnosestellung des APS, vereinfacht nach Barbhaiya et al. (17)

Tabelle 4 additiv gewichtete klinische Kriterien zur Diagnosestellung des APS: Insgesamt acht Domänen, die in sechs klinische und zwei labortechnische Bereiche unterteilt sind. Vereinfacht nach Barbhaiya et al. (17)

<b>Klinische Kriterien</b>		
Pro Unterkategorie darf nur ein Kriterium addiert werden (es ist die höhere Wertung zu wählen). Klinische Manifestationen, denen eine andere Ätiologie als das APS mind. genauso wahrscheinlich zugrunde liegen könnten, dürfen <u>nicht</u> gewichtet werden.		
<b>Klinische Unterkategorie</b>	<b>Kriterium/Manifestation</b>	<b>Ge- wichtung</b> In Summe mind. 3 Punkte
<b>1. Venös- makro- vaskulär</b>	Z.n. venöser Thrombose bei gleichzeitigem thrombotischen Hochrisikoprofil <sup>(a)</sup>	1
	Z.n. venöser Thrombose ohne gleichzeitigem Vorliegen eines thrombotischen Hochrisikoprofils <sup>(a)</sup>	3
<b>2. Arteriell- makro- vaskulär</b>	Z.n. arterieller Thrombose bei gleichzeitigem thrombotischen Hochrisikoprofil <sup>(a)</sup>	2
	Z.n. arterieller Thrombose ohne gleichzeitigem Vorliegen eines thrombotischen Hochrisikoprofils <sup>(a)</sup>	5
<b>3. Mikro- vaskulär</b>	V.a. mind. eine der klinischen Manifestationen: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Livedo racemosa (klinisch)</li> <li>○ Livediodpathologische Hautläsionen (klinisch)</li> <li>○ Akute o. chron. aPL-Nephropathie (klinisch o. laborchemisch)</li> </ul> Pulmonale hämorrhagische Diathese (klinisch o. in der Bildgebung)	2
	Gesicherter Z.n. mind. einer der klinischen Manifestationen: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Livediode Vaskulopathie (pathologisch gesichert)</li> <li>○ Akute o. chron. aPL-Nephropathie (pathologisch gesichert)</li> <li>○ Pulmonale hämorrhagische Diathese (mittels bronchoalveoläre Lavage (BAL) oder pathologisch gesichert)</li> <li>○ Myokardiopathie (pathologisch gesichert o. typische Bildgebung)</li> </ul> Adrenale Hämorrhagie (pathologisch gesichert o. typische Bildgebung)	4
<b>4. Herz- klappen</b>	Verdickung	2
	Vegetation	4
<b>5. Schwanger- schaft</b>	Mind. 3 spontane, aufeinanderfolgende Schwangerschaftsabbrüche vor der 16. SSW	1
	Spontane Schwangerschaftsabbrüche zwischen der 16. und vor der 34. SSW ohne Hinweise auf eine schwere Präeklampsie oder einer schwerwiegenden Plazentainsuffizienz	1
	Schwerwiegende Präeklampsie (nach der 34. SSW) <u>oder</u> eine schwerwiegende Plazentainsuffizienz mit/ohne Fetaltod	3
	Schwerwiegende Präeklampsie (nach der 34. SSW) <u>und</u> eine schwerwiegende Plazentainsuffizienz mit/ohne Fetaltod	4
<b>6. Hämatologie</b>	Thrombozythopenie ( $20-130 \times 10^9/L$ )	2

(a) Zur detaillierten Risikostratifizierung wird auf die Primärquelle (17) verwiesen.

Tabelle 5 additiv gewichtete laborchemische Kriterien zur Diagnosestellung des APS: Insgesamt acht Domänen, die in sechs klinische und zwei labortechnische Bereiche unterteilt sind. Vereinfacht nach Barbhaiya et al. (17)

<b>Laborchemische Kriterien</b> Pro Unterkategorie kann nur ein Kriterium addiert werden.			
<b>Laborchemische Unterkategorie</b>	<b>Antikörpertiter</b>		<b>Ge- wichtung</b> In Summe mind. 3 Punkte
<b>7. LA-Nachweis</b>	Funktioneller, hämatologischer (gerinnungsbasierter) LA-Assay	Einmaliger LA-Nachweis	1
		Persistierender LA-Nachweis <sup>(a)</sup>	5
<b>8. aCL- bzw. a<math>\beta</math><sub>2</sub>GPI-Nachweis</b>	ELISA-basierter persistierender <sup>(b)</sup> Antikörpernachweis	Moderat <sup>(b)</sup> oder hochpositiver <sup>(c)</sup> IgM-Titer (aCL und/o. a $\beta$ <sub>2</sub> GPI)	1
		Moderat <sup>(b)</sup> positiver IgG-Titer (aCL und/oder a $\beta$ <sub>2</sub> GPI) <sup>(d)</sup>	4
		Hochpositiver <sup>(c)</sup> IgG-Titer (aCL <u>oder</u> a $\beta$ <sub>2</sub> GPI)	5
		Hochpositiver <sup>(c)</sup> IgG-Titer (aCL <u>und</u> a $\beta$ <sub>2</sub> GPI)	7

(a) mind. 12 Wochen zwischen den aufeinanderfolgenden Nachweisen (b) moderat positiv entspricht einer Range zwischen 40-79 Units (c) hochpositive Titer ab einem Wert > 80 Units (d) bei zwei aufeinanderfolgenden Testverfahren mit einmalig moderat und einmalig hochpositiven AK-Titer soll eine Zuordnung zu der Kategorie „moderat positiv“ erfolgen

Für das CAPS, die seltene, lebensbedrohliche Unterform des APS, wurden 2002 vorläufige Klassifikationskriterien beschrieben (10th International Congress on aPL in Taormina, Italien (84)). Die Diagnose setzt die Erfüllung aller vier Kriterien voraus (siehe Tabelle 6 Tabelle 6: vorläufige Klassifikationskriterien des CAPS, 2002, Taormina. Vereinfacht nach Asherson et al. (84)). Bei Teilerfüllung kann eine hohe Wahrscheinlichkeit für CAPS angenommen werden (84). 2018 wurden die Kriterien mithilfe der GRADE (Grading Recommendations Assessment, Development and Evaluation) -Methodik in diagnostische Leitlinien überführt (27, 85).

Tabelle 6: vorläufige Klassifikationskriterien des CAPS, 2002, Taormina. Vereinfacht nach Asherson et al. (84)

<b>Klassifikationskriterien für das CAPS</b>
1. Belege für die Beteiligung von mind. drei Organen, Systemen und/oder Geweben
2. Gleichzeitige Entwicklung der Manifestationen oder Entwicklung in unter einer Woche
3. Histopathologische Bestätigung von Verschlüssen kleiner Gefäße in mind. einem Organ oder Gewebe
4. Nachweis von aPL (LA und/oder aCL bzw. a $\beta$ <sub>2</sub> GPI)

#### 1.2.6.2 Das APS im ICD-10 und im ICD-11

In der *International Classification of Diseases* (ICD)-10 war APS den „Sonstigen Thrombophilien“ (D68.6) zugeordnet (86). Seit der ICD-11 (Einführung 2022) wird es als „*Non-organ-specific systemic autoimmune disorder*“ (4A45) geführt (87). Damit erfolgt eine Abgrenzung von organspezifischen Autoimmunerkrankungen; APS und Vaskulitiden sind nun eigenständige Kategorien innerhalb der „*Diseases of the immune system*“.

### 1.2.6.3 Möglichkeiten der Antikörperdiagnostik

Da eine der beiden Säulen der Klassifikationskriterien des APS auf der Persistenz von aCL, LA und/oder a $\beta$ 2GPI fußt (entsprechend 1.2.6.1 Klassifizierungskriterien), ist eine korrekte Bestimmung der aPL essenziell (33, 88). Nachfolgend wird auf die aktuellen ACR/EULAR-Empfehlungen eingegangen (17).

#### 1.2.6.3.1 Lupus-Antikoagulans-Nachweis

Die *International Society of Thrombosis and Hemostasis* (ISTH) empfiehlt für den Nachweis von LA zwei Screening-Systeme in einem dreistufigen Verfahren (Screening - Mischstudie - Bestätigung). Ein positives Ergebnis erfordert in mindestens einem Testsystem die Positivität aller drei Schritte (17, 89). Aufgrund der Heterogenität von LA ist ein einzelner Screening-Test nicht ausreichend sensitiv (90). Empfohlen werden dRVVT und aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), letztere idealerweise mit Phospholipid- und Silika-Aktivatoren. Die Blutabnahme sollte vor Beginn einer Antikoagulation erfolgen (90).

Die funktionelle LA-Testung ist störanfällig. Antikoagulation, erhöhte Akute-Phase-Proteine (bspw. Faktor VIII, CRP) und Schwangerschaft können die Ergebnisse erheblich beeinflussen.

#### 1.2.6.3.2 Anti-Cardiolipin-Antikörper-Nachweis

Die neuen ACR/EULAR Kriterien empfehlen zur Bestimmung von aCL sog. Festphasen-Immunassays (17, 88, 91). Alternative Methoden wie Durchflusszytometrie, Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA), Multiplex-Flow-Immunoassay (MFI) oder Assays mit variierter fester Phase werden nicht mehr berücksichtigt. Für die Klassifikationskriterien sind ausschließlich standardisierte ELISA-basierte Verfahren zugelassen.

#### 1.2.6.3.3 Anti- $\beta$ 2GPI-Antikörper-Nachweis

Wie auch für aCL stehen kommerziell erhältliche ELISA-Kits zur a $\beta$ 2GPI-Detektion zur Verfügung (88). Ein Nachweis in flüssiger Phase ist aufgrund sterischer Eigenschaften des  $\beta$ 2GPI-Moleküls nicht möglich (92).

Auch hier gilt, dass alternative Testverfahren (Durchflusszytometrie, CLIA, MFI, Variationen der festen Phase) laut den aktuellen Empfehlungen nicht mehr in die Diagnosestellung einbezogen werden sollten (17, 93). Diese Einschränkung ist umstritten, da eine erhebliche Intra- und Inter-Assay- sowie Inter-Labor-Variabilität zwischen ELISA-Kits beschrieben ist. Befürchtet wird eine Einschränkung der Sensitivität (94-99). Eine detaillierte Analyse erfolgt in Kapitel 4.3 Systemische Grenzen aktueller aPL-Testsysteme.

#### 1.2.6.4 Proteinaffinitätschromatografie und $\beta$ 2GPI

Frühere Studien nutzten Affinitätschromatografie zur Reduktion der aPL-Heterogenität und um eine Fokussierung auf aCL zu ermöglichen (48, 50). Es gibt Hinweise darauf, dass  $\beta$ 2GPI in der Lage ist, diesen Reinigungsprozess zu beeinflussen. Daher werden im Folgenden Chromatografieverfahren und die molekulare Struktur von  $\beta$ 2GPI dargestellt.

Die Proteinaffinitätschromatografie basiert auf einer inerten Matrix (z. B. Dextran, Agarose) und einem Liganden (100). Zielmoleküle binden spezifisch, unerwünschte Proteine werden ausgewaschen. Anschließend wird das zu isolierende Molekül mittels Elution aus der Säule gelöst, wodurch die Aufreinigung abgeschlossen ist. Ein gängiger Ligand zur Aufreinigung von Ig, insbesondere IgG, ist Protein A (101-104).

$\beta$ 2GPI ist ein anionisches, phospholipidbindendes, glykiertes Serumprotein, das strukturell in fünf sog. *Complement Control Protein* (CCP)-Domänen organisiert ist (105). Es liegt überwiegend in einer geschlossenen zirkulären Konformation vor. Nach Kontakt mit anionischen Oberflächen wechselt es in die offene sog. „Hockeyschläger“-Konformation (106).

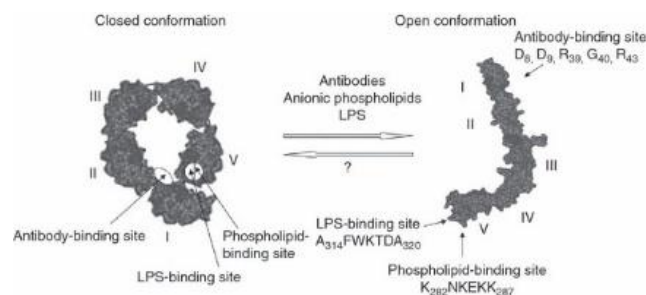





Abbildung 4 Konformation und Bindungsstellen von  $\beta$ 2GPI. Bildquelle: P.G. DE GROOT, J.C.M. MEIJERS,  $\beta$ 2-Glycoprotein I: evolution, structure and function, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Volume 9, Issue 7, 2011, Pages 1275-1284, ISSN 1538-7836

Da  $\beta$ 2GPI mit Phospholipiden interagiert, können konkurrierende Bindungen die Zusammensetzung von Aufreinigungsprodukten verändern. Dies wird in Kapitel 1.2.7.3 Affinitätsaufreinigung als Ursache einer möglichen Proben- bzw. Ergebnisverfälschung vertieft dargestellt.

#### 1.2.7 Sog. Kofaktorabhängigkeit: Mögliche Mechanismen und deren Evidenz

Forschung und klinische Praxis konzentrieren sich bislang vor allem auf sog. kofaktorabhängige aCL und a $\beta$ 2GPI, während andere Subgruppen weniger Beachtung finden. Diese Schwerpunktsetzung prägt das derzeitige Verständnis des APS, hat aber auch Konsequenzen für Diagnostik und Therapie. Vor diesem Hintergrund ist eine kritische Analyse der postulierten Kofaktorabhängigkeit erforderlich. Thematisch wird nachfolgend auf die drei AK-Gruppen eingegangen, die in der Tabelle 7 Für die Thematik der sog. Kofaktorabhängigkeit relevanten Antikörperuntergruppen übersichtlich zusammengefasst werden.

Tabelle 7 Für die Thematik der sog. Kofaktorabhängigkeit relevanten Antikörperuntergruppen

Antikörper-Gruppe	Kofaktor	In den nachfolgenden Abb. 5, 6, 8 und 9 schematisch dargestellt als:
Kofaktor <u>un</u> abhängige aCL	-	
Kofaktorabhängige aCL	$\beta$ 2GPI	
a $\beta$ 2GPI	-	

### 1.2.7.1 Hintergrund der sog. Kofaktorabhängigkeit

Der Begriff „Kofaktorabhängigkeit“ impliziert, dass  $\beta$ 2GPI nicht als eigenständiges Epitop fungiert, sondern die Bindung von aCL an ihr Epitop erst ermöglicht. (107). McNeil und Galli et al. zeigten, dass APS-Seren ohne zusätzliche Serumproteine keine Bindung an Cardiolipin aufwiesen, wohl aber nach Zugabe von  $\beta$ 2GPI (siehe 6.4 Weiterführende Informationen zur historischen Begründung des Konzepts der sog. Kofaktorabhängigkeit von aCL (48, 50). Diese Beobachtung begründete die Hypothese einer kofaktorabhängigen aCL-Aktivität.

Diesbezüglich existieren drei Erklärungsmodelle die nachfolgend vorgestellt werden (siehe Abbildung 5 Möglichkeiten der Funktion von  $\beta$ 2GPI bei sog. kofaktorabhängigen aCL).

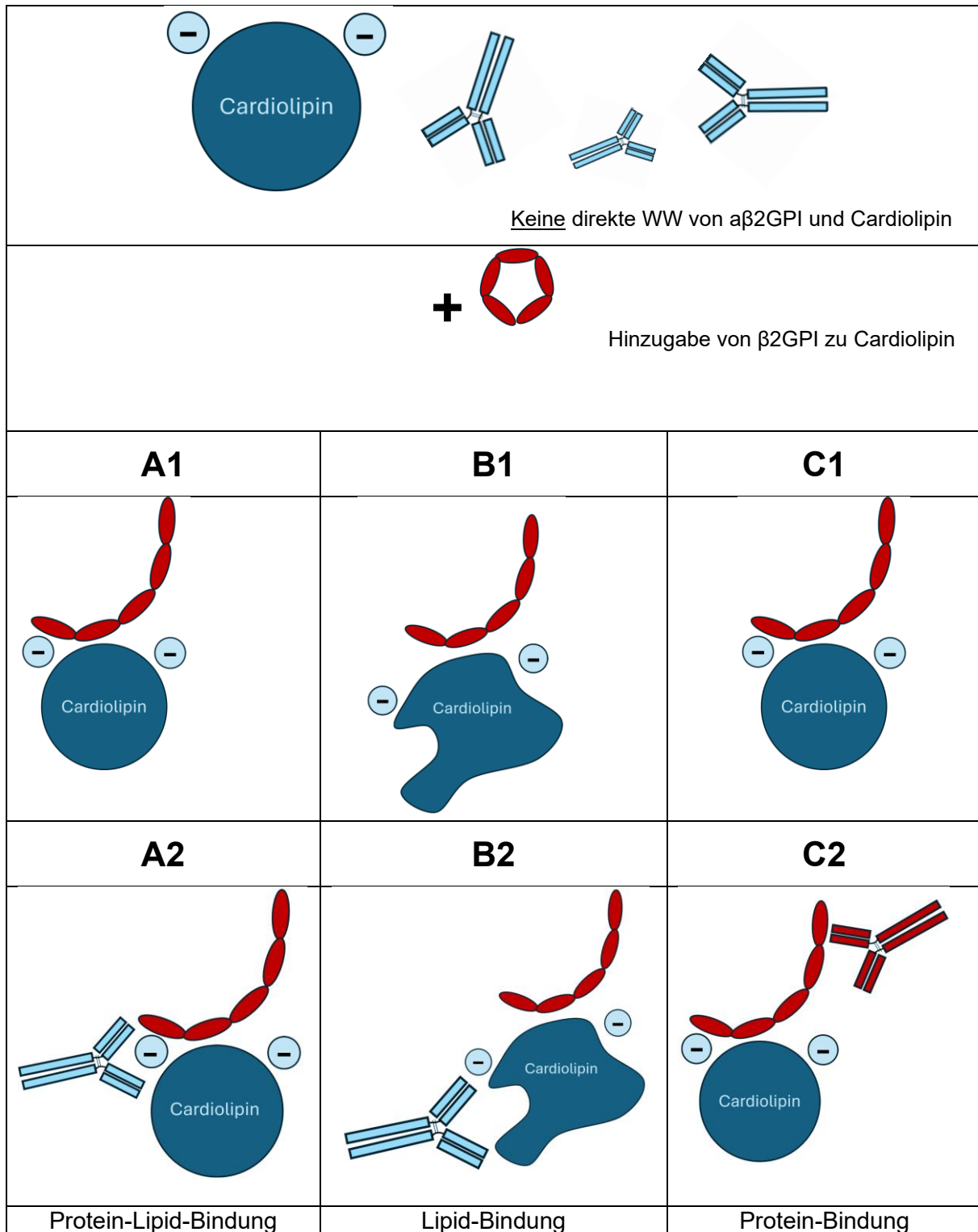


Abbildung 5 Möglichkeiten der Funktion von  $\beta$ 2GPI bei sog. kofaktorabhängigen aCL

Dargestellt wird in der oberen Bildhälfte die geschlossene, zirkuläre Konformation von  $\beta$ 2GPI und in der unteren Bildhälfte (A1-C2) die offene, sog. „Hockeyschläger“-Konformation (entsprechend der Abbildung 4 Konformation und Bindungsstellen von  $\beta$ 2GPI). Bildquelle: P.G. DE GROOT, J.C.M. MEIJERS,  $\beta$ 2-Glycoprotein I: evolution, structure and function, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Volume 9, Issue 7, 2011, Pages 1275-1284, ISSN 1538-7836).  $\beta$ 2GPI wechselt nach Kontakt mit anionischen Oberflächen von der zirkulären Form in die offene Form.

#### 1.2.7.1.1 Protein-Lipid-Bindung: Das Fusionsepitop

$\beta$ 2GPI bindet an Phospholipide (A1 aus Abbildung 5). Dies lässt sich aufgrund der Polarität der beiden Moleküle erklären (siehe 1.2.6.4 Proteinaffinitätschromatografie und  $\beta$ 2GPI). Erst

das Aufeinandertreffen von Protein ( $\beta$ 2GPI) und Lipid (bspw. Cardiolipin) soll laut diesem Modell ein Epitop für aCL generieren (siehe A2 in Abbildung 5). Zwar ist die  $\beta$ 2GPI-Phospholipid-Affinität gut dokumentiert (81, 108-114), ein entsprechendes Fusionsepitop wurde bislang jedoch nicht nachgewiesen.

#### 1.2.7.1.2 Lipid-Bindung nach Konformationsänderung

Die Interaktion von  $\beta$ 2GPI mit Phospholipiden (B1 in Abbildung 5) induziert eine strukturelle Veränderung, die ein Epitop freilegt (B2 in Abbildung 5). Bisher fehlt jeder experimentelle Nachweis für eine solche  $\beta$ 2GPI-abhängige Konformationsänderung.

#### 1.2.7.1.3 Protein-Bindung

Das Modell der Proteinbindung impliziert, dass  $\beta$ 2GPI nach Bindung an das Phospholipid (C1 in Abbildung 5) selbst als Epitop fungiert (C2 in Abbildung 5). Die als „kofaktorabhängige aCL“ beschriebenen Antikörper wären in diesem Fall tatsächlich a $\beta$ 2GPI (siehe Farbcodierung entsprechend der Tabelle 7 Für die Thematik der sog. Kofaktorabhängigkeit relevanten Antikörperuntergruppen). Diese Hypothese wird durch mehrere Studien unterstützt, u. a. durch Blot-Experimente, in denen Antikörper nur in Anwesenheit von  $\beta$ 2GPI nachweisbar waren (107, 115-117).

#### 1.2.7.2 Validität bzw. Problematik des Konzepts der sog. Kofaktorabhängigkeit

Von den beschriebenen Modellen zur Antikörperbindung ist bisher ausschließlich die Protein-Bindungshypothese durch experimentelle Daten gestützt (117).  $\beta$ 2GPI wirkt damit nicht als Kofaktor im engeren biochemischen Sinn, sondern stellt ein Epitop dar (C2). Die postulierte Unterteilung in „kofaktorabhängige“ und „kofaktorunabhängige“ aCL erscheint daher problematisch. Für eine echte sog. Kofaktorabhängigkeit existiert bislang weder ein experimenteller Nachweis noch ein biochemisch schlüssiges Konzept (107).

#### 1.2.7.3 Affinitätsaufreinigung als Ursache einer möglichen Proben- bzw. Ergebnisverfälschung

Sowohl McNeil et al. als auch Galli et al. verwendeten im Rahmen ihres Versuchsaufbaus affinitätsaufgereinigtes Ig. Das Prinzip dieses Laborverfahrens wurde bereits in dem Abschnitt 1.2.6.4 Proteinaffinitätschromatografie und  $\beta$ 2GPI beschrieben (siehe vertiefend 6.4 Weiterführende Informationen zur historischen Begründung des Konzepts der sog. Kofaktorabhängigkeit von aCL). Neben den aCL können im Rahmen der Aufreinigung womöglich auch  $\beta$ 2GPI und a $\beta$ 2GPI erfasst werden. Wie in 1.2.7.1.3 Protein-Bindung beschrieben, erklärt sich dies durch die Bindungseigenschaften von  $\beta$ 2GPI, das zugleich als Ligand für a $\beta$ 2GPI fungiert. Folglich können aCL,  $\beta$ 2GPI und a $\beta$ 2GPI während der Affinitätsaufreinigung in der Säule zurückgehalten und im Eluat nachgewiesen werden (veranschaulicht in Abbildung 6 mögliche Kontaminationsquelle im Rahmen der

Affinitätsaufreinigung und in 6.4 Weiterführende Informationen zur historischen Begründung des Konzepts der sog. Kofaktorabhängigkeit von aCL).

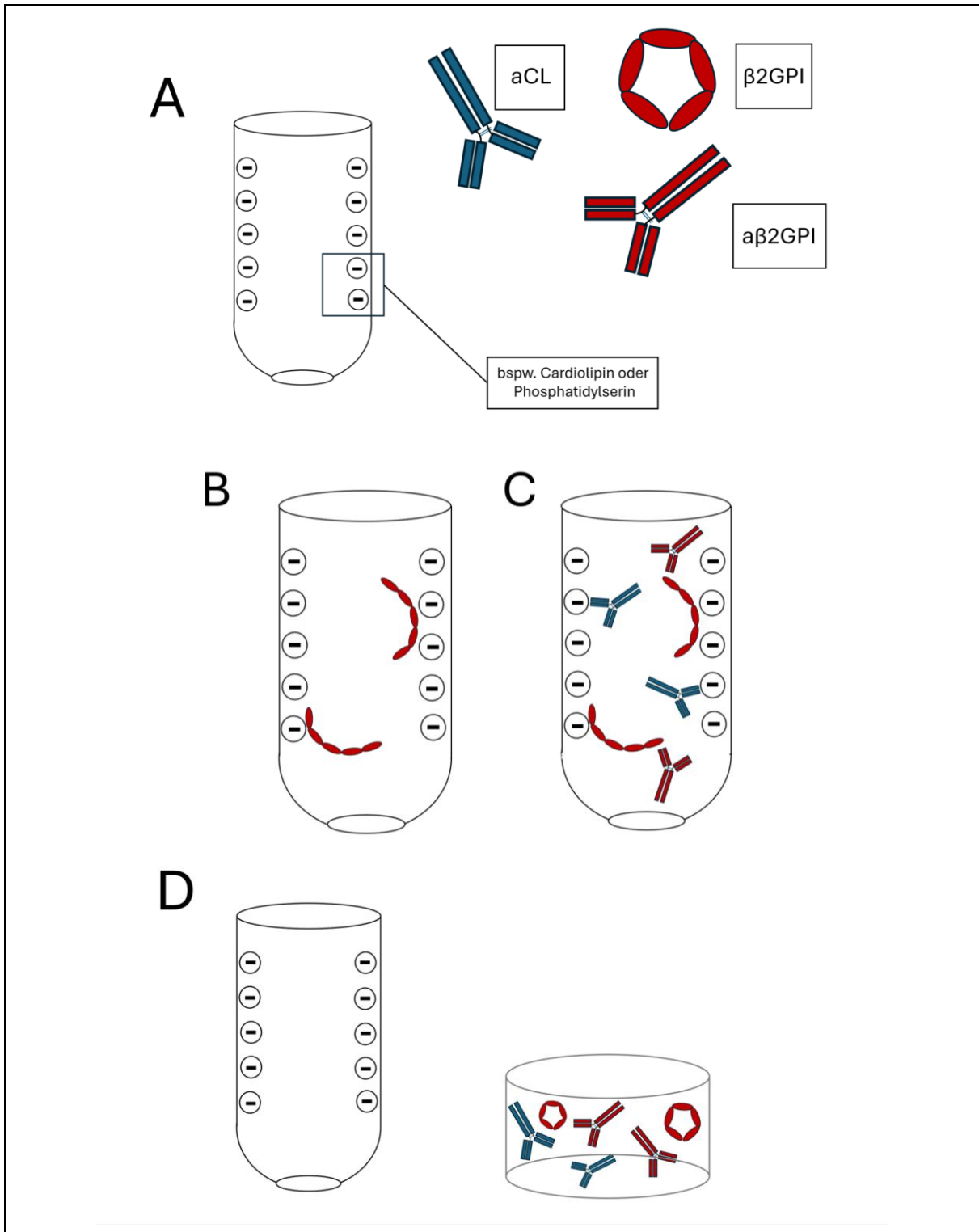
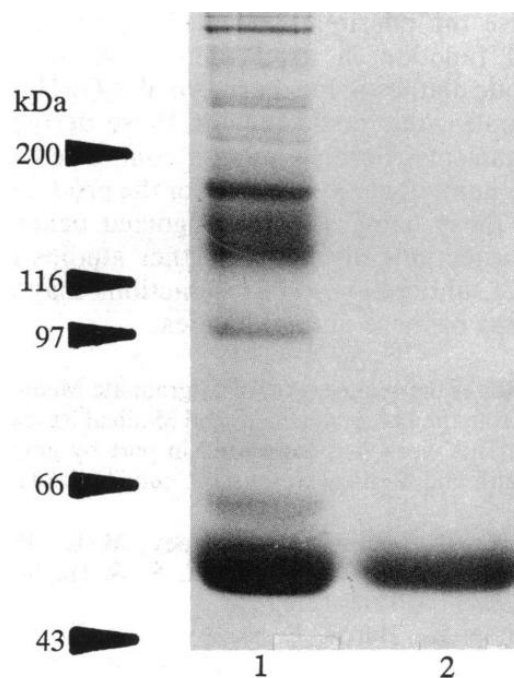


Abbildung 6 mögliche Kontaminationsquelle im Rahmen der Affinitätsaufreinigung

Dargestellt wird in der oberen Bildhälfte die geschlossene, zirkuläre Konformation von  $\beta$ 2GPI und in der unteren Bildhälfte (A1-C2) die offene, sog. „Hockeyschläger“-Konformation (entsprechend der Abbildung 4 Konformation und Bindungsstellen von  $\beta$ 2GPI). Bildquelle: P.G. DE GROOT, J.C.M. MEIJERS,  $\beta$ 2-Glycoprotein I: evolution, structure and function, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Volume 9, Issue 7, 2011, Pages 1275-1284, ISSN 1538-7836).  $\beta$ 2GPI wechselt nach Kontakt mit anionischen Oberflächen von der zirkulären Form in die offene Form.

Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass auch McNeil et al. 1990 in ihrem Eluat mittels SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) -Analyse den sog. Kofaktor  $\beta$ 2GPI nachweisen konnten (48), siehe Abbildung 7 Eluat-Analyse, Bildquelle: McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl A.



**FIG. 4.** SDS/PAGE on a 5–15% linear gradient gel under nonreducing conditions stained with Coomassie blue. Lane 1, eluant from CL affinity column chromatography of aCL antibody-positive plasma containing a broad band of IgG aCL (150 kDa) and cofactor (50 kDa). Lane 2, purified cofactor obtained from normal plasma following sequential CL affinity, gel filtration (Fig. 2), and cation-exchange chromatography (Fig. 3).

*Abbildung 7 Eluat-Analyse, Bildquelle: McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl A*

#### 1.2.7.4 Effekt von Hinzugabe bzw. Ausschluss von sog. Kofaktoren auf den aCL-ELISA

Mit dem Wissen aus Kapitel 1.2.7.3 Affinitätsaufreinigung als Ursache einer möglichen Proben- bzw. Ergebnisverfälschung lässt sich der nächste Schritt der möglichen weiteren Ergebnisverfälschung nachvollziehen.

In ELISA-Experimenten ohne Zusatz von Serumproteinen wurde eine Bindung lediglich für Lipid-bindende aCL beobachtet, nicht jedoch für  $\alpha\beta 2\text{GPI}$  (siehe Abbildung 8 Cardiolipin-ELISA unter Ausschluss von  $\beta 2\text{GPI}$ ). Nach Hinzugabe von Serum konnte  $\beta 2\text{GPI}$  an die mit Cardiolipin beschichtete Oberfläche binden und diente dadurch selbst als Epitop für  $\alpha\beta 2\text{GPI}$  (siehe Abbildung 9 Cardiolipin-ELISA in Anwesenheit von  $\beta 2\text{GPI}$ ). Auf diese Weise entstand ein indirektes Bindungssignal, das im Testsystem messbar war.

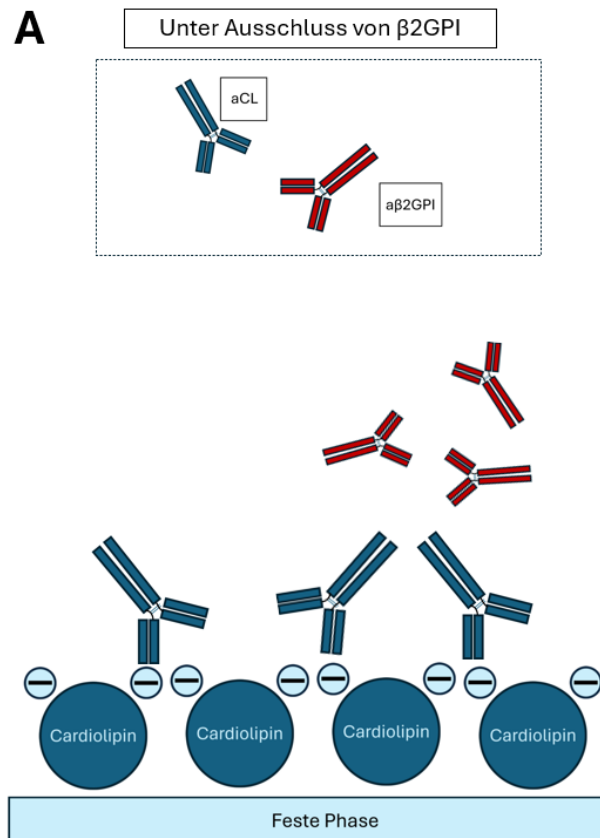


Abbildung 8 Cardiolipin-ELISA unter Ausschluss von  $\beta 2\text{GPI}$

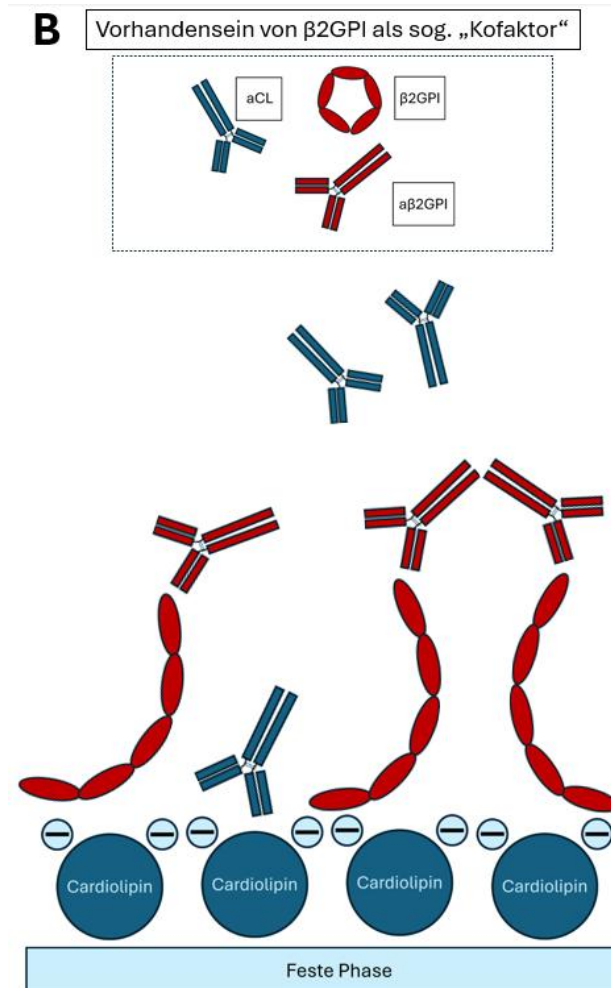


Abbildung 9 Cardiolipin-ELISA in Anwesenheit von  $\beta$ 2GPI

Dargestellt wird in der oberen Bildhälfte die geschlossene, zirkuläre Konformation von  $\beta$ 2GPI und in der unteren Bildhälfte (A1-C2) die offene, sog. „Hockeyschläger“-Konformation (entsprechend der Abbildung 4 Konformation und Bindungsstellen von  $\beta$ 2GPI. Bildquelle: P.G. DE GROOT, J.C.M. MEIJERS,  $\beta$ 2-Glycoprotein I: evolution, structure and function, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Volume 9, Issue 7, 2011, Pages 1275-1284, ISSN 1538-7836).  $\beta$ 2GPI wechselt nach Kontakt mit anionischen Oberflächen von der zirkulären Form in die offene Form.

#### 1.2.7.5 Studienlage zur sog. Kofaktorabhängigkeit

Die Arbeiten von Galli et al. und McNeil et al. aus dem Jahr 1990 stellten die Grundlage für die Annahme einer sog. Kofaktorabhängigkeit dar (48, 50). Beide Untersuchungen basierten jedoch auf einer sehr geringen Probenzahl (jeweils zwei Patient\*innen). Angaben zu den exakten Antikörpermustern der untersuchten Seren liegen nicht vor. Ob in diesen Proben eine Dominanz von  $\alpha\beta$ 2GPI vorlag, lässt sich daher retrospektiv nicht beurteilen.

#### 1.2.8 Pathophysiologie

Antikörper bei antikörpervermittelten Autoimmunkrankheiten lassen sich grundsätzlich in zwei Gruppen unterteilen: In solche mit ausschließlich diagnostischem Wert und solche mit pathophysiologischer Relevanz. Diese Unterscheidung ist jedoch nicht strikt, sondern dient eher der Vereinfachung. Ein bekanntes Beispiel für Antikörper mit primär diagnostischem Wert sind die sog. antinukleären Antikörper (ANAs) bei SLE (118, 119). Antikörper, die

insbesondere pathophysiologisch relevant sind, finden sich bspw. bei Morbus Basedow (120, 121) und Myasthenia gravis (122).

Bereits in den 1980er-Jahren konnte im Tiermodell durch den Transfer von aPL das APS induziert werden (123-127). Seither gilt die mechanistische Beteiligung der aPL an der Pathophysiologie des Krankheitsbildes als etablierter Konsens. Dennoch bleibt der genaue Mechanismus weitgehend ungeklärt. Es existieren zahlreiche Theorien, Erklärungsansätze und Forschungshinweise, die so heterogen sind wie die Gruppe der aPL selbst. Im Folgenden werden einige dieser Theorien präsentiert. Es wird kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit erfolgt die Gliederung der Thematik anhand der im Kapitel 1.1.1 Das Immunsystem dargestellten Unterteilung des Immunsystems in zelluläre und humorale Komponenten.

#### 1.2.8.1 Zelluläre Mechanismen der Pathophysiologie

Aus der Untergruppe der sog. APCs sind insbesondere die dendritischen Zellen und die Monozyten in die Pathophysiologie des APS involviert. Weitere beteiligte Zelltypen umfassen insbesondere Thrombozyten, Trophoblasten, Endothelzellen und neutrophile Granulozyten. Die aPL tragen durch die Aktivierung dieser Immunzellen zu einer proinflammatorischen bzw. prokoagulanten Imbalance bei (128-130).

##### 1.2.8.1.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen können in verschiedene Subgruppen unterteilt werden (siehe Abbildung 1 Komponenten des angeborenen Immunsystems sowie Tabelle 8 Vereinfachte Übersicht der Subgruppen dendritischer Zellen). Nachfolgend wird ausschließlich auf die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) eingegangen. Diese Zellpopulation zirkuliert im Blut sowie in den Lymphorganen der Peripherie (131).

Tabelle 8 Vereinfachte Übersicht der Subgruppen dendritischer Zellen

Subgruppe	Vorwiegende Lokalisation	Vorwiegende Funktion
Follikuläre dendr. Zellen	Prim.- u. Sek.-Lymphfollikel	Zytokinproduktion (insb. zur B-Lymphozyten-Steuerung), unverarbeitete Ag-Präsentation u. a. über Ag-AK-Komplexe
Inflammatorische dendr. Zellen,	Entzündungsgebiete (akut u. chron.)	Nach Phagozytose Migration in lymphath. Organe und Ag-Präsentation (insb. T-Lymphozyten)
Interdigitierende dendr. Zellen	Ubiquitär, insb. in LKs	Ag-Präsentation, bes. wichtig für naive T-Zellen, insb. virale Ag-Präsentation
Interstitielle dendr. Zellen	Interstitium	u. a. beteiligt an Abstoßungsreaktion allogener (Organ-)Transplantationen
Langerhans-Zellen	Epidermis, Schleimhäute	prim. inaktiv; Aktivierung durch Ag-Kontakt, daraufhin Migration in regionäre LK und Ag-Präsentation (insb. T-Lymphozyten)
Plasmazytoide dendr. Zellen	Blut, periph. Lymphorgane	Nach TLR-Aktivierung: Ausschüttung v. a. IFN- $\alpha$ und - $\beta$ mittels Hochregulierung u. a. sog. <i>Interferon alpha (coding) genes</i> (IFNAs)
<b>Quellen</b>	(6, 132-140)	

pDCs exprimieren in ihren Endosomen TLR, genauer TLR-7 und TLR-9 (141). Beide Rezeptoren dienen der intrazellulären Detektion von Nukleinsäuren, wobei TLR-7 spezifisch für einzelsträngige RNA (ssRNA – *single stranded ribonucleic acid*) und TLR-9 spezifisch für einzelsträngige DNA (ssDNA – *single stranded desoxyribonucleic acid*) ist. Virale Genome bestehen häufig aus ssRNA, ssDNA und dsRNA (*double stranded desoxyribonucleic acid*), wodurch die TLR die pDC befähigen, Virusinfektionen auf zellulärer Ebene zu erkennen. Die Bindung aktiviert pDCs und führt zur Sekretion großer Mengen an Typ-I-Interferonen (IFN), insbesondere IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  (142-145). IFN verstärken über parakrine und autokrine Signalwege die Expression antiviraler Proteine, *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse-I-Moleküle und Proteasomen, wodurch infizierte Zellen effizienter von T-Lymphozyten erkannt werden (146-149). Zudem werden NK-Zellen aktiviert (150).

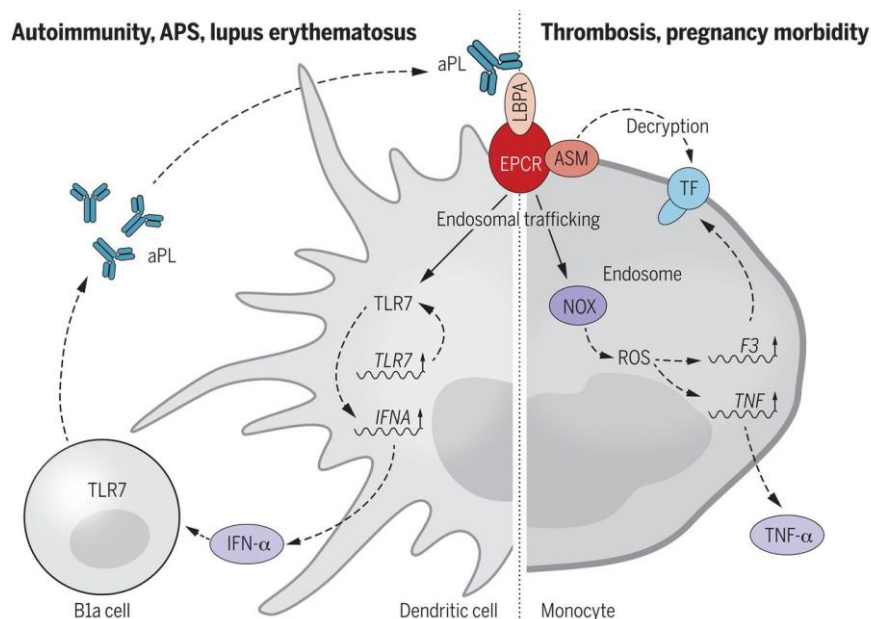


Abbildung 10 aPL-vermittelte Signalkaskade in dendr. Zellen und Monozyten, Bildquelle: N. Müller-Calleja et al. Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity. *Science* 371, eabc0956 (2021)

Müller-Calleja et al. zeigten, dass aPL pDCs über den endothelialen Protein-C-Rezeptor (EPCR) aktivieren können, wenn dieser in Komplex mit Lysobisphosphatidsäure (LBPA) vorliegt (151). aPL binden den EPCR/LBPA-Komplex, der daraufhin in Endosomen internalisiert wird und als Vehikel für den Transport der Antikörper dient (151, 152). In der Folge werden pDCs durch aPL aktiviert und tragen so zur proinflammatorischen und prokoagulanten Imbalance beim APS bei (128).

Ein zentraler Mechanismus ist die Aktivierung der endosomalen NADPH-Oxidase (NOX). Diese induziert die Translokation von TLR-7 und TLR-9 aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in Endosomen und steigert die Empfindlichkeit der pDCs gegenüber entsprechenden Liganden (128, 153).

Es entsteht Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das NF- $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) aktiviert und eine vermehrte Expression proinflammatorischer Gene, einschließlich Tissue Factor (TF) und TLR, auslöst (107, 128, 151, 154). Dies resultiert in einer verstärkten IFN- $\alpha$ -Produktion (128, 155).

Die erhöhte IFN- $\alpha$ -Ausschüttung führt zu einer Aktivierung von B1a-Zellen, die ihrerseits aPL produzieren. Dadurch entsteht ein Verstärkungszyklus aus pDC-Aktivierung, Interferonfreisetzung und erneuter aPL-Produktion (151, 156-158). Die Hochregulation von TLR, insbesondere TLR-7, könnte somit zur Persistenz von aPL beitragen und die Entwicklung des APS begünstigen (8, 128, 151, 159-162). Studien deuten darauf hin, dass die Retention von TLR im ER normalerweise eine Schutzfunktion vor Autoimmunreaktionen erfüllt. aPL können diesen Mechanismus der Selbsttoleranz stören (128, 151, 155, 161-168).

Eine anschauliche Zusammenfassung der oben genannten mechanistischen Zusammenhänge der EPCR/LBPA/aPL-initiierten Signalkaskade bietet die linke Bildhälfte der Abbildung 10 aPL-vermittelte Signalkaskade in dendr. Zellen und Monozyten, Bildquelle: N. Müller-Calleja et al. Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity. *Science* 371, eabc0956 (2021).

#### 1.2.8.1.2 Monozyten

Monozyten entstehen aus myeloiden Vorläuferzellen, zirkulieren wenige Tage im Blut und differenzieren zu gewebständigen Makrophagen oder dendritischen Zellen (169, 170). Sie exprimieren verschiedene PRRs, darunter TLR, und sind nach Aktivierung zur Sekretion proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , Interleukin (IL)-1 $\beta$ , reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Komplementfaktoren fähig (171, 172). Damit tragen Monozyten sowohl zur antimikrobiellen Abwehr als auch zur Pathogenese entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen bei (173, 174).

Gewebe- und entzündungsspezifische Funktionen ergeben sich u. a. aus der Regulation von TF. Auf ruhenden Monozyten liegt TF inaktiv komplexiert mit seinem Inhibitor TFPI (*Tissue Factor pathway inhibitor*) vor (151, 175). Nach Aktivierung bildet TF einen hochaffinen Komplex mit Gerinnungsfaktor VIIa, der die Faktoren IX und X proteolytisch aktiviert (176-179). Dies initiiert die Gerinnungskaskade und führt zusätzlich über Faktor Xa zu einer Aktivierung von *Protease-activated Receptor-2* (PAR-2). Außerdem wird Xa-vermittelt eine EPCR-basierte und TF-abhängige Signalkaskade initiiert (180-184). Erwähnt sei an dieser Stelle, dass EPCR nicht über eigene enzymatische Aktivität mit PAR-2 interagiert, sondern über die Mechanismen, die vereinfacht in der Tabelle 35 EPCR-vermittelte Modulation der PAR-2-Aktivität zusammengefasst werden.

Insbesondere wenn EPCR LBPA als Liganden an der Zelloberfläche präsentiert, ist dieser Rezeptor eng mit der Pathophysiologie des APS verzahnt ((151, 185) siehe 1.2.8.1.1 Dendritische Zellen). Auf der Monozytenoberfläche binden aPL den EPCR/LBPA-Komplex, stören dadurch die TFPI-vermittelte Inhibition von TF und verstärken sowohl die Gerinnungsaktivierung als auch die PAR-2-Signalübertragung. Dies führt zur Translokation und Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (ASM), die Sphingomyelin zu Ceramid hydrolysiert. Nachgeschaltete Flippasen verlagern Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Zellmembran, wodurch die prokoagulatorische Aktivität der Monozyten zunimmt (151, 180, 186-188).

Zusätzlich aktivieren aPL NOX in Monozyten, was - analog zu pDCs - die Expression von TF, proinflammatorischen Mediatoren wie TNF- $\alpha$  und eine persistente prokoagulatorische Aktivierung fördert (128, 151, 180, 189-196). Das mechanistische Zusammenspiel aus EPCR,

LBPA, TF und TNF in Monozyten wird anschaulich auf der rechten Bildhälfte der Abbildung 10 aPL-vermittelte Signalkaskade in dendr. Zellen und Monozyten, Bildquelle: N. Müller-Calleja et al. Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity. Science371, eabc0956 (2021) zusammengefasst.

### 1.2.8.1.3 Thrombozyten

Thrombozyten nehmen eine zentrale Rolle in der Hämostase ein (197). Darüber hinaus sind sie in die Immunabwehr involviert und können eine proinflammatorische Funktion übernehmen (198-201). Bei Gefäßverletzung binden sie über Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen und die freiliegende extrazelluläre Matrix. Diese Interaktion wird insbesondere durch den von Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt (202-204). Nach Adhäsion erfolgt die Aktivierung der Thrombozyten durch Mediatoren wie Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen, Thrombin und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub> (205-207)). Aktivierte Thrombozyten verändern ihre Morphologie und setzen den Inhalt intrazellulärer Granula frei (siehe orientierend zusammengefasst in Tabelle 9 Thrombozytengranula: Untergruppen und Vesikelinhalt (208-214)). Zusätzlich exprimieren aktivierte Thrombozyten u. a. Integrin αIIbβ<sub>3</sub>, das die Aggregation weiterer Thrombozyten ermöglicht (215, 216). So wird eine positive Rückkopplung der Plättchenaktivierung etabliert.

Tabelle 9 Thrombozytengranula: Untergruppen und Vesikelinhalt

Bezeichnung	Vesikelinhalt u. a.		Funktion u. a.
<b>α-Granula</b>	- β-Thromboglobulin (TG-β)		Chemokin (insb. Fibroblasten, teilw. Neutrophile)
	- Fibrinogen		Adhäsionsmolekül
	- Fibronectin		Adhäsionsmolekül
	- Gerinnungsfaktoren V und XIII		Gerinnungskaskade
	- <i>platelet-derived growth factor</i> (PDGF)		Wachstumsfaktor (vermehrte Mitose)
	- Plättchenfaktor 4 (PF4)		Chemokin (insb. Neutrophile und Fibroblasten)
	- P-Selektin		Membranprotein: Zelladhäsion
	- <i>Transforming growth factor-β1</i> (TGF-β1)		Zytokin (Differenzierung, Adhäsion, und Heilung)
	- vWF		Adhäsionsmolekül
<b>σ-Granula,</b> auch elektronendichte Granula genannt	- ADP		Positive Rückkopplung
	- Adenosintriphosphat (ATP)		Positive Rückkopplung
	- Calcium (Ca <sup>2+</sup> )		Gerinnungsfaktor
	- Serotonin		Positive Rückkopplung und Vasokonstriktion
<b>λ-Granula</b>	Ähnlich zu Lysosomen	- Arylsulfatase - β-Galaktosidase - β-Glucuronidase - Cathepsine - Hexosaminidase - Saure Phosphatase	Unklar, ggf. Lyse des Krankheitserregers
<b>Quellen</b>	(210-214, 217-219)		

Im Kontext des APS interagieren aPL spezifisch über anti-β2GPI-Antikörper (aβ2GPI) mit Thrombozyten (220). Diese binden an β2GPI und aktivieren intrazelluläre Signalwege, unter anderem über mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*). Die aβ2GPI-vermittelte Aktivierung führt zu einer erhöhten Expression und Sekretion von Integrin αIIbβ3, P-Selektin und TXA<sub>2</sub> (221-223). Durch Hochregulation dieser Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle sowie durch die Ausschüttung des Eikosanoides wird die positive Rückkopplung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation unterstützt, was die prokoagulatorischen und proinflammatorischen Eigenschaften des APS begünstigt.

#### 1.2.8.1.4 Endothelzellen

Endothelzellen regulieren unter physiologischen Bedingungen Gefäßtonus, Hämostase und Immunantwort (224, 225). Aktivierung wird u. a. durch Gefäßverletzung, Scherkräfte, Infektionen, lösliche Mediatoren oder PAMP-Erkennung ausgelöst (226-228). Funktionelle Folgen sind Vasodilatation, gesteigerte Gefäßpermeabilität und die Induktion von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, welche die Leukodiapedese fördern (siehe Tabelle 10 Effekte von Mediatoren und Adhäsionsmolekülen aktivierter Endothelzellen).

Tabelle 10 Effekte von Mediatoren und Adhäsionsmolekülen aktivierter Endothelzellen

Mediator bzw. Adhäsionsmolekül	Effekt u. a. auf		Quelle
Angiopoeitin-2	Inhalt sog. <i>Weibel-Palade Bodies</i> (WPBs) (229) intrazelluläre Granula, die u. a. über (multi-granuläre) Exozytose freigesetzt werden können	Embryonale und postnatale Angiogenese	(230)
<i>CC-chemokine ligand 26</i> (CCL26)		Proinflammatorisch (WW u. a. mit Eosinophilen und Basophilen)	(231)
Endothelin-1 (ET-1)		Fließfähigkeit des Blutes (+/-)	(232)
IL-8		Leukodiapedese (v. a. Neutrophile)	(233)
P-Selektin		Leukodiapedese, Thrombozytenadhäsion und -aggregation	(234)
vWF		Thrombozytenadhäsion und -aggregation	(235)
E-Selektin	Leukodiapedese (WW v. a. mit Granulozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Monozyten)	(236)	
IL-1β	Proinflammatorisch und prokoagulant (WW u. a. mit Neutrophilen, Thrombozyten, Akute-Phase-Proteinen), Fieberinduktion	(237, 238)	
<i>intercellular adhesion molecule-1</i> (ICAM-1)	Adhäsionsmolekül zur Leukodiapedese (WW v. a. mit Neutrophilen)	(239)	
TF	Prokoagulant (Gerinnungsfaktor)	(240-242)	
TNF-α	Prokoagulant, vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, Leukodiapedese	(243, 244)	
<i>vascular cell adhesion molecule-1</i> (VCAM-1)	Leukodiapedese (WW u. a. mit Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten)	(245)	

Bei Kontakt mit aPL werden Endothelzellen experimentell aktiviert. Dies geht mit einer prokoagulatorischen Verschiebung einher: erhöhter Tissue-Factor (TF) sowie vermehrte Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 (246, 247). Zusätzlich steigt die Synthese von CCL26 und IL-8 (248).

#### 1.2.8.1.5 Trophoblasten

Trophoblasten entstehen aus embryonalem Gewebe und bilden die Schnittstelle zwischen Blastozyste und Plazenta. Sie durchlaufen nach der Einnistung Proliferation, Differenzierung, Invasion und Migration, die für eine normale Plazentabildung erforderlich sind (249). Störungen dieser Prozesse sind mit Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie oder Fehlgeburten assoziiert (250-253).

Bei APS wird eine aPL-vermittelte Beeinträchtigung der Trophoblastenfunktion beschrieben. Nach Kontakt mit aPL produzieren Trophoblasten vermehrt proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 $\beta$ , IL-8 und CCL26 (siehe Tabelle 10 Effekte von Mediatoren und Adhäsionsmolekülen aktivierter Endothelzellen). Hohe aPL-Titer führen *in vitro* zur Apoptose in Trophoblasten (254). Zudem sind Migration und Invasion der Trophoblasten eingeschränkt, was die Einnistung und die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft beeinträchtigen kann (255, 256).

#### 1.2.8.1.6 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile sind zentrale Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Ihre antiinfektiven Mechanismen umfassen Phagozytose, die Freisetzung granulozytärer Vesikel sowie die Bildung neutrophiler *extracellular traps* (NETs). NETs bestehen überwiegend aus DNA mehrerer Neutrophiler (257). Sie tragen zur Thrombogenese bei, indem das extrazelluläre Chromatin ein Gerüst für Fibrin bildet und proteolytische Enzyme die Gerinnungskaskade verstärken (258-261). Gewisse Krankheitserreger werden von NETs gebunden und abgetötet (262).

Die Granula der Neutrophilen enthalten u. a. ROS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Stickstoffmonoxid (NO), deren Freisetzung zu Gewebeschädigung und einer ausgeprägten Entzündungsreaktion, dem sog. oxidativen *Burst*, führen kann (263).

Durch ein enges Zusammenspiel mit aktivierten Endothelzellen gelangen Neutrophile zum Entzündungsherd. Die durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  hochregulierten Adhäsionsmoleküle vermitteln Wechselwirkungen mit den Oberflächenantigenen der Neutrophilen, insbesondere mit L-Selektin. Dabei kommt es zunächst zu einer sog. Selektin-Selektin-Wechselwirkung. Im Verlauf werden Integrin-Bindungen ermöglicht, sowie eine gesteigerte Expression von ICAM-1 bzw. VCAM-1 (264, 265), siehe Tabelle 10 Effekte von Mediatoren und Adhäsionsmolekülen aktivierter Endothelzellen.

Bei APS-Patient\*innen wurde eine erhöhte Neigung zur NETose beobachtet, die mit hohen aPL-Titern korreliert (266). Der Neologismus NETose beschreibt den programmierten Zelltod Neutrophiler zur Generierung von NETs (257). Der Abbau von NETs erfolgt primär durch Desoxyribonuklease 1 (DNase1). Hinweise deuten auf eine aPL-vermittelte Hemmung dieser Enzymaktivität hin, was den Abbau verzögert und die thrombogene Wirkung von NETs verstärkt. Ein vergleichbarer Mechanismus ist auch bei SLE beschrieben (267).

*In vitro* führen aPL zur direkten Aktivierung von Neutrophilen mit gesteigerter Granula-Ausschüttung, oxidativem *Burst* und vermehrter IL-18-Produktion (129, 268). Da Neutrophile wesentlich durch das Komplementsystem aktiviert werden, wird ihre Rolle dort ergänzend dargestellt (siehe 1.2.8.2.1 Komplementsystem).

#### 1.2.8.2 Humorale Mechanismen der Pathophysiologie

Diverse Zytokine und andere Bestandteile der humoralen Immunabwehr wurden bereits im Kapitel 1.2.8.1 Zelluläre Mechanismen der Pathophysiologie beschrieben. Um Wiederholungen zu vermeiden, wird an dieser Stelle auf die zuvor behandelten Abschnitte verwiesen und lediglich das Komplementsystem und das Protein C-/bzw. S-System näher thematisiert.

##### 1.2.8.2.1 Komplementsystem

Das Komplementsystem kann über vier Mechanismen die Immunabwehr beeinflussen. Komplementfaktoren dienen der Opsonierung von Pathogenen, rekrutieren über Chemotaxis weitere Immunzellen, wirken proinflammatorisch und können über die Bildung des sog. *membrane attack complex* (MAC) die direkte Lyse von Pathogenen hervorrufen.

Tierexperimentelle Modelle zeigen, dass Komplement-defiziente Mäuse weitgehend vor aPL-induzierten prokoagulatorischen Prozessen geschützt sind (192, 269-271). Auch bei APS-assoziierten Schwangerschaftskomplikationen wurden protektive Effekte sowohl durch genetischen Komplementmangel (insbesondere C3) als auch durch medikamentöse Blockade der Aktivierung des Komplementsystems durch Heparin nachgewiesen (272-274). Diese Befunde sprechen für eine zentrale Rolle von Komplementfaktoren in der Pathophysiologie des APS.

Besonders bedeutsam ist die Interaktion von Komplementfaktor C5a mit seinem Rezeptor auf Neutrophilen. Über eine TF/VIIa/ PAR-2-vermittelte Signalachse kann C5a zu einer aPL-induzierten Aktivierung führen, die fetale Schädigungen in APS-Modellen begünstigt (181, 275, 276). PAR-2 (auch GPR11 (G-Protein-gekoppelter Rezeptor 11) genannt) wirkt in verschiedensten Geweben immunmodulatorisch (siehe 6.6 Weiterführende Informationen zu der PAR-2-Signalvermittlung).

### 1.2.8.2.2 Protein C-Signalkaskaden

Protein C ist ein Vitamin-K-abhängiges Serumprotein, das in der Leber synthetisiert wird. Es zirkuliert als inaktive Vorstufe im Blut und entfaltet nach Aktivierung zur Serinprotease (*activated protein C*, APC) antikoagulatorische, antiinflammatorische und zytoprotektive Effekte ((277-280).

Grundlegend können zwei Mechanismen der Aktivierung unterschieden werden. Einerseits Thrombin/Thrombomodulin (TM)-vermittelt, wobei APC in löslicher Form vorliegt. Andererseits EPCR-gebunden (siehe Abbildung 11 Aktivierungskontext von Protein C zu APC (281-283)).

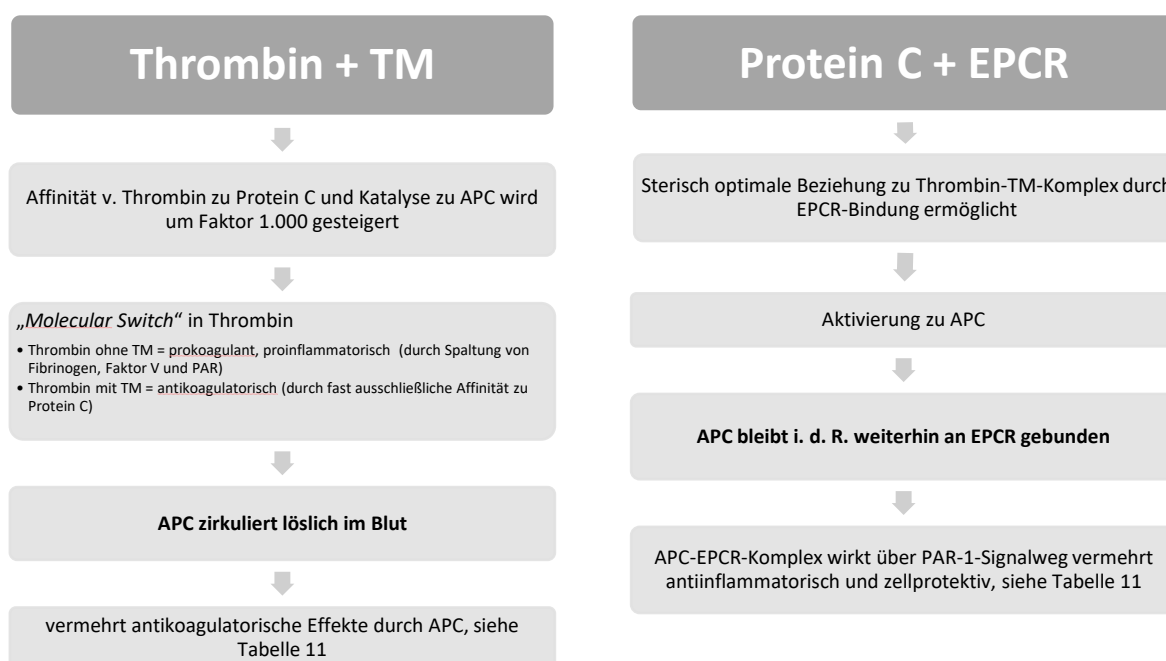


Abbildung 11 Aktivierungskontext von Protein C zu APC

Die Wirkung von APC ist kontextabhängig. Freies APC hemmt vorwiegend die Gerinnung, EPCR-gebundenes APC steuert insbesondere zellprotektive und immunmodulatorische Signalwege. Zentral ist die Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR), insbesondere PAR-1. Während EPCR-gebundenes APC die PAR-1-Signalweiterleitung zugunsten von Zellschutz und Antiinflammation verschiebt, führt thrombinabhängige PAR-1-Aktivierung zu Prokoagulation, Inflammation und erhöhter Gefäßpermeabilität (siehe Abbildung 12 zelluläre PAR-1-Signalkaskade je nach grundlegendem Aktivierungsmechanismus (284-291).

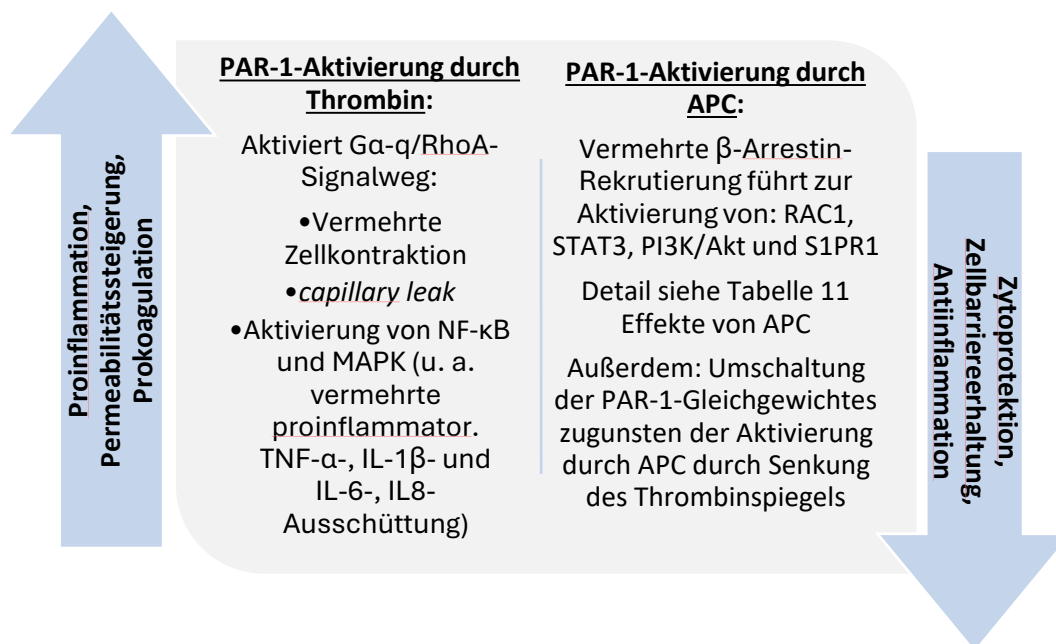


Abbildung 12 zelluläre PAR-1-Signalkaskade je nach grundlegendem Aktivierungsmechanismus

Die Wirkweise von APC im jeweiligen Aktivierungskontext mit konsekutiver PAR-1-Signalkaskade wird vereinfacht in der Tabelle 11 Effekte von APC zusammengefasst.

Tabelle 11 Effekte von APC

Effekt	Kofaktoren	Signalkaskade	Resultat	Quellen
Anti-koagulation	Protein S, Thrombin, TM, EPCR	TM-vermittelter <i>Molecular Switch</i> von Thrombin zur vermehrten APC-Generierung, siehe Abb. 11	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteolytische Spaltung von Va, entspr. Verlust der Prothrombinase-Aktivität, entspr. weniger Thrombin-Aktivität und insg. niedrigerer Thrombin-Spiegel</li> <li>- Verminderte Thrombin-Bildung</li> <li>- Spaltung von VIIIa, entspr. Hemmung des Tenase-Komplexes</li> </ul>	(283, 284, 292-301)
Antiinflammation	EPCR-vermittelt	PAR-1 Aktivierung, führt zu vermehrter $\beta$ -Arrestin-Expression, führt u. a. zur Aktivierung von PI3K/Akt, STAT3 ( <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> ) und RAC1 ( <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> ), siehe Abb. 11	<p>u. a. Hemmung von NF-<math>\kappa</math>B und MAPK (<i>mitogen activated protein kinase</i>):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Stabilisierung der Endothelbarriere</li> <li>- Verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. ICAM-1, VCAM-1), folglich: Verminderte Leukozytenadhäsion und -migration</li> <li>- Förderung einer antiinflammatorischen Polarisierung versch. Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten), u. a. durch vermehrte IL-10-Synthese</li> <li>- Verminderte proinflammator. Transkription und Zytokinfreisetzung von TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6, IL-8</li> </ul>	(159, 184, 281, 284, 288, 302-321)
Zytoprotektion	EPCR-vermittelt	Entspr. der Antiinflammation, außerdem über vermehrte indirekte S1RP1 ( <i>Sphingosine-1-phosphate receptor 1</i> ) Aktivierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hemmung proapoptotischer Signalwege (u. a. durch S1PR1-Modulation)</li> <li>- Verbesserung der Mikrozirkulation (u. a. durch verminderte, Fibrinbildung, Endothelstabilisierung, Antikoagulation, Antiinfektion s.o.)</li> <li>- Stabilisierung von VE-Cadherinen und Tight-Junctions: Mindert Ödembildung</li> <li>- Verminderte ROS-Produktion</li> <li>- Unterstützung der Reparaturfähigkeit und Regeneration des Endothels</li> </ul>	

Bei APS-Patient\*innen liegen Protein C und Protein S meist in normwertigen Konzentrationen vor, dennoch ist der Signalweg funktionell gestört (318, 322-327).

Mehrere Mechanismen tragen zur Störung des Protein-C-Signalwegs im APS bei. aPL hemmen sowohl die Bindung von Protein C an EPCR als auch die Thrombin-vermittelte Aktivierung zu APC (328, 329).

Darüber hinaus beeinträchtigt eine gestörte APC/EPCR-Interaktion die Signalweiterleitung über PAR-1. Infolgedessen verschiebt sich die Balance zugunsten thrombinabhängiger, proinflammatorischer Effekte. Dieser Mechanismus wird durch die im APS nachgewiesene beschleunigte Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin zusätzlich verstärkt (330).

Auch die antikoagulatorische Funktion von APC selbst ist durch aPL eingeschränkt. Beschrieben sind eine verminderte Inaktivierung von Faktor Va sowie eine mögliche Beeinträchtigung von Kofaktoren wie Protein S (195, 331, 332).

Schließlich können aPL EPCR, wie bereits beschrieben, direkt aktivieren, wenn dieser LBPA präsentiert (107, 151, 159, 180, 333). Dies löst die NOX-vermittelte Signalkaskade mit Translokation von TLR-7 und TLR-9 aus (siehe 1.2.8.1.1 Dendritische Zellen und 1.2.8.1.2 Monozyten).

### 1.2.9 Therapieansätze

Auf kausaler Ebene gibt es bislang keine spezifischen Therapieansätze. Die Therapiestrategie konzentriert sich auf die Akutbehandlung thromboembolischer Komplikationen sowie der Sekundärprophylaxe weiterer Ereignisse und Schwangerschaftskomplikationen.

#### 1.2.9.1 Allgemeine Herausforderungen der Therapie

Obwohl das APS zu den antikörpervermittelten Autoimmunkrankheiten zählt, konnten mit Immunsuppressiva nur begrenzte Therapieerfolge erzielt werden (22, 334). Die Therapie wird zusätzlich durch das breite klinische Spektrum erschwert: Neben thromboembolischen Ereignissen und Schwangerschaftskomplikationen treten zahlreiche „non-criteria“-Manifestationen auf, die eine standardisierte Behandlung erschweren (siehe Tabelle 2 mögliche „non-criteria“-Manifestationen des APS). Substanzen, die aPL neutralisieren oder mit ihnen kompetitiv interagieren, sind derzeit nicht verfügbar, könnten jedoch zukünftig neue Therapieoptionen darstellen.

#### 1.2.9.2 Primärprophylaxe

Die Prophylaxe des APS umfasst sowohl medikamentöse als auch nicht-medikamentöse therapeutische Maßnahmen. Zentrale Strategie ist die Reduktion individueller Thromboserisikofaktoren wie Rauchen, Immobilisation, Adipositas, Hypertonie, Diabetes mellitus, Dyslipidämie oder hormonelle Therapie (335-338). Auch Komorbiditäten wie SLE oder erhöhen rheumatoide Arthritis (RA) erfordern eine konsequente Krankheitskontrolle, da sie das Thromboserisiko zusätzlich erhöhen.

Prinzipiell stellt der Nachweis von aPL nicht automatisch eine Indikation einer Therapie dar. Vielmehr müssen zunächst Risikogruppen definiert werden. Als Risikopatient\*innen für thromboembolische Ereignisse gelten im Rahmen des APS v. a. jene Patient\*innen, die einen dreifach positiven Antikörper-Titer vorweisen (d. h. aCL und LA und a $\beta$ 2GPI positiv).

Die Evidenzlage ist jedoch limitiert. Studien konnten für Low-Dose-Aspirin (LDA) keinen konsistenten protektiven Effekt nachweisen (339-343). Eine Metaanalyse aus 10 Beobachtungsstudien und einer randomisierten kontrollierten Studie (RCT) von 2014 zeigte zwar einen möglichen Nutzen, die Aussagekraft war jedoch aufgrund methodischer Heterogenität eingeschränkt (343-348). Eine generelle Primärprophylaxe sollte nur nach entsprechender Risikostratifikation initiiert und individuell abgewogen werden (343, 349, 350). Zu berücksichtigen sind potenzielle unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) wie Blutungen oder ulzerogene Effekte im Gastrointestinaltrakt (341, 350).

### 1.2.9.3 Therapie und Sekundärprophylaxe

Die Standardtherapie des APS sowie die Sekundärprophylaxe bei persistierenden aPL-Titern basieren auf Vitamin-K-Antagonisten (VKA), ggf. in Kombination mit LDA (17).

#### 1.2.9.3.1 Antikoagulation bei venösen Thrombosen

Ein differenzierter Vergleich zur Therapie venöser Thromboembolien (VTE) in der Allgemeinbevölkerung verdeutlicht die Besonderheiten im Management von APS. In der Allgemeinbevölkerung wird die Therapie venöser Thromboembolien (VTE) in eine Initial- und eine Erhaltungsphase unterteilt. Die Initialphase umfasst eine therapeutische Antikoagulation für fünf bis 21 Tage (351). Insbesondere niedermolekulares Heparin (NHM) oder Fondaparinux werden angewendet, ggf. direkte orale Antikoagulanzen (DOAKs) oder unfraktioniertes Heparin (UFH). Für die Erhaltungsphase über mindestens drei, häufig sechs Monate oder länger, gelten DOAKs (insbesondere Apixaban und Rivaroxaban) als Medikamente der ersten Wahl.

Für APS-(Hochrisiko-)Patient\*innen gelten andere Empfehlungen. Hier stellen VKA die Standardtherapie dar, da DOAKs in diesem Kollektiv kein sicheres Wirkprofil zeigen. Eine 2018 publizierte randomisierte multizentrische Studie wurde wegen erhöhter thromboembolischer Ereignisse unter Rivaroxaban bei APS vorzeitig beendet (352). Daraufhin wurde in Deutschland ein sog. „Rote-Hand-Brief“ für DOAKs im Kontext APS veröffentlicht (353): DOAKs werden bei APS-Patient\*innen mit Hochrisikoprofil (dreifach positiver AK-Status, Z.n. arterieller Thrombosen, Herzklappenerkrankungen) nicht empfohlen. Ob Apixaban ein sicherer Vertreter dieser Substanzgruppe sein könnte, ist Gegenstand aktueller Studien (354-357).

Eine Therapie mit DOAKs kann in Einzelfällen nach individueller Risikostratifizierung, insbesondere bei noch nicht bestätigter Antikörperpersistenz, bei VKA-Intoleranz oder ausschließlich venösen Ereignissen mit niedrigem Antikörperprofil erwogen werden (349, 358-362). Alternativ können bspw. NMH verwendet werden. Weitere potenzielle Therapieoptionen umfassen Immunsuppressiva, Statine und Komplementsysteminhibitoren (siehe u. a. (350, 363-372)).

Auch die Festlegung des INR-Zielbereichs unterscheidet sich. In der Allgemeinbevölkerung wird bei venösen Thrombosen ein Zielwert von 2,0-3,0 empfohlen. Für APS-Patient\*innen wurde zeitweise eine intensiviertere Antikoagulation mit 3,0-4,0 diskutiert. Zwei RCTs konnten jedoch keinen Vorteil belegen, sodass heute ebenfalls ein INR-Bereich von 2,0-3,0 als ausreichend gilt (373, 374).

Der letzte Vergleich soll auf Ebene der Therapiedauer vollzogen werden. Während in der Allgemeinbevölkerung eine Erhaltungsphase von mindestens drei, häufig aber sechs Monaten vorgesehen ist, reicht diese Dauer bei APS-Patient\*innen oft nicht aus. Abhängig vom Risikoprofil muss eine lebenslange Sekundärprophylaxe in Betracht gezogen werden (350, 375). Wichtige Kriterien der Risikostratifizierung sind neben dem bereits erwähnten Antikörperprofil u. a. das Vorliegen vermeidbarer Risikofaktoren sowie eine Lungenbeteiligung im Rahmen der VTE (350).

Die zentralen Unterschiede zwischen Standardtherapie und APS-spezifischem Vorgehen werden in Tabelle 12 Abweichende Therapiestrategie einer Phlebothrombose bei APS-Patient\*innen im Vergleich zur Standardtherapie.

*Tabelle 12 Abweichende Therapiestrategie einer Phlebothrombose bei APS-Patient\*innen im Vergleich zur Standardtherapie*

	<b>Allgemeinbevölkerung</b>	<b>APS-Patient*innen</b> Zwecks Übersichtlichkeit hier keine Unterteilung in Low- bzw. High-Risk-APS-Patient*innen
<b>Wirkstoffe</b>	1. Wahl: DOAKs 2. Wahl: VKA <u>Alternative</u> : NMH	1. Wahl: VKA <u>Alternative</u> : LDA, NMH, Immunsuppressiva, Komplementsysteminhibitoren <b>Rote Hand Brief für DOAKs!</b>
<b>Ziel-INR</b>	2,0 – 3,0	2,0 – 3,0 (ggf. 3,0 – 4,0)
<b>Dauer</b>	Mind. 3 (i. d. R. 6) Monate	Risikostratifizierte Abwägung, ggf. lebenslängliche Antikoagulation

#### 1.2.9.3.2 Antikoagulation bei arteriellen Thrombosen

Auch bei arteriellen thromboembolischen Ereignissen wird die Antikoagulation mit VKA (INR 2,0-3,0) empfohlen. Ergänzend kann LDA eingesetzt oder eine höhere INR-Zielspanne (3,0-4,0) in Erwägung gezogen werden. Bei Therapieversagen kann auf NMH gewechselt werden. DOAKs sind insbesondere bei arteriellen Ereignissen kontraindiziert, da Rivaroxaban den VKA klar unterlegen war (352).

### 1.3 Zielsetzung dieser Dissertation

Das APS ist durch thromboembolische Ereignisse und Schwangerschaftskomplikationen charakterisiert. aPL gelten als zentrale pathophysiologische Faktoren, ihre Heterogenität erschwert jedoch die differenzierte Bewertung. Eine Untergruppe der aPL stellen aCL dar. Insbesondere die sog. kofaktorunabhängigen aCL wurden historisch nur selten mit einer relevanten Pathogenität in Verbindung gebracht und fanden daher in der Forschung bislang wenig Beachtung. Da die postulierte Kofaktorabhängigkeit nicht durch belastbare Evidenz gestützt ist (siehe 1.2.7.2 Validität bzw. Problematik des Konzepts der sog. Kofaktorabhängigkeit), wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit überwiegend auf das Adjektiv *Lipid-bindend* zurückgegriffen. Der Fokus liegt somit auf den Lipid-bindenden aCL als potenziell relevante Subgruppe. Vorausgehende Forschungsansätze dieser Arbeitsgruppe machten die Teilhabe der Lipid-bindenden aCL an der Pathogenität des APS deutlich (107, 116, 128, 151, 155, 192, 196, 333, 376-384).

aCL aus Seren zweier unabhängiger Kohorten werden laborchemisch aufgereinigt. Eingeschlossen sind Patient\*innen mit venöser Thrombose und nachgewiesenem aCL-Titer. Gesunde Personen ohne thrombotische Anamnese dienen als Kontrollgruppe. Ein monoklonaler Lipid-bindender aPL wird als Referenzstandard eingesetzt. Die Standardisierung der Testbedingungen ermöglicht eine quantitative Vergleichbarkeit der Antikörperaktivität zwischen den Gruppen.

Die Arbeit prüft, ob eine verstärkte Antikörper-Antigen-Interaktion von Lipid-bindenden aCL mit dem Auftreten behandlungsbedürftiger venöser Thrombosen assoziiert ist und ob sie gesunde Kontrollen unterscheidet. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass Patient\*innen mit APS eine erhöhte Lipid-bindende aCL-Aktivität im Vergleich zu Kontrollproben aufweisen. Ziel ist die Validierung bisheriger Annahmen zur pathogenetischen Rolle von Lipid-bindenden aCL und die Identifikation möglicher Ansatzpunkte für zukünftige Therapien.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 13 verwendete Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	V-75	Systemec
Eismaschine	AF124	Scotsman
ELISA-Reader	Sunrise Basic Tecon bzw. Azure	Tecan bzw. Biozym
ELISA-Washer	hydroFLEX	Tecan
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr Premium	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	-86C ULT Freezer	Thermo Fisher Scientific
Geschirrspülmaschine	Miele professional G7883	Miele
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Kühlschrank (+ 4°C)	Economic Cooler	Bosch
Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph
Mikroliterspritze (Hamilton)	Serie 700 MICROLITER®-Spritzen, Modell 1, Spitzentyp 2, 702 N	Roth
NanoDrop	ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Pipetten	Reference Research (100-1000 µL, 10-100 µL, 0,5-10 µL)	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann
Sterilarbeitsplatz an Laminar flow-Werkbank	HS18	Heraeus
Vortexmischer	Reagenzglas-Vortex-Schüttler	VWR
Vortexmischer	Vortex-T Genie2	Scientific Industries
Waage	MC1 Analytic AC 210S	Sartorius
Waage	MC1 Laboratory LC 2200S	Sartorius
Wasserdeionisierungsanlage	Purelab Flex ELGA	Veolia
Zentrifuge	Centrifuge 5425 R	Eppendorf
Zentrifuge	GS-15R	Beckman
Zentrifuge	Micro Star 17R	VWR
Zentrifuge	Rotina 420 R	Hettich
Zentrifuge	Mikro 200	Hettich
Zentrifuge	Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 14 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Bechergläser	25 mL, 150 mL, 250 mL, 600 mL	Schott Duran
Chromatographiesäulen	Sephadex G-25 Resin (PD Mini Trap G-25)	GE Healthcare
Combitips	Combitips® advanced 10 ml, 5 ml, 1 ml, 0,5 ml	Eppendorf
Glasflaschen	100 mL, 250 mL, 500 mL	Schott Duran, VWR
Monovetten	Citrat-Monovetten	Sarstedt
Parafilm	Parafilm® M	Roth
Pipettenspitzen	0,1-10 µl TXL-10	Axygen
Pipettenspitzen	10/20 µl XL Graduated Filter Tip	Starlab
Pipettenspitzen	200 µl und 1000 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen	100 µl Bevelled Filter Tip	Starlab
Pipettenspitzen	1000 µl Filter Tip	Starlab
Reagiergefäße	Safe-Lock Tubes 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Säulen Ig		
Stabpipetten	Cellstar® Serologische Pipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL	Greiner Bio-One
Ultrafiltrationseinheit	Ultra-0,5 Centrifugal Filter Devices	Amicon
Verschleißfolien	Clear Seal Strong	Peqlab
Well-Platten (96er)	Nuclon™ Delta Surface (96 Wells)	Thermo Scientific

### 2.1.3 Reagenzien

Tabelle 15 Reagenzien

Substanz	Hersteller
Ammoniumsulfat	Roth
Cardiolipin (98%-Lösung)	Sigma-Aldrich
(Dulbecco's) phosphate buffered saline ((D)PBS)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Applichem
Glycin-Salzsäure (HCl)	Roth
Natrium-Phosphat	Roth
Schwefelsäure, konzentriert 96%	Roth
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat	Sigma-Aldrich
Terralin® <i>Liquid</i>	Schülke
Terralin® <i>Protect</i>	Schülke
Tris-HCl	Roth
Tween 20	Applichem

Tabelle 16 Antikörper

Antikörper	Verwendung	Markierung	Hersteller
anti-human IgG (Fab specific), peroxidase antibody produced in goat	ELISA	HRP	Sigma-Aldrich
HL5B	Standard	Keine	Eigene Arbeitsgruppe

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 17 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Hersteller/Zusammensetzung
Ammoniumsulfatlösung, gesättigt	500 g Ammoniumsulfat in 850 mL aqua dest., auf 150°C erhitzen, 3 h rühren, über Nacht 4°C, filtrieren
ELISA Waschpuffer	0,1 % Tween20 in PBS
ELISA Blockpuffer	1 % Tween20 in PBS
PBS	Sigma-Aldrich

### 2.1.5 Fertigsysteme (sog. Kits)

Tabelle 18 Fertigsysteme (Kits)

Kit	Hersteller
BR Protein Assay	Qubit™ bzw. Invitrogen™

## 2.1.6 Software

Tabelle 19 Verwendete Computer-Softwares und Assistenzsysteme

Software	Entwickler	Verwendung
Endnote20	Clarivate™	Literaturverwaltung
Excel 2021	Microsoft Corporation	Datenerhebung
ChatGPT	OpenAI	Unterstützung der sprachlichen und strukturellen Textoptimierung
Duden Mentor	Cornelsen Verlag GmbH	Grammatik-, Stil- und Rechtschreibprüfung
deepL	deepL SE	Übersetzungshilfe
PowerPoint 2019	Microsoft Corporation	Schaubildgestaltung
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation	Fließtextgestaltung
Microsoft Word 2019	Microsoft Corporation	Fließtextgestaltung
SPSS Statistics 23	IBM	Statistische Auswertung
SPSS Statistics 27	IBM	Statistische Auswertung

Alle automatisierten Assistenzsysteme wurden ausschließlich unterstützend verwendet; die inhaltliche Verantwortung liegt vollständig bei der Autorin.

## 2.2 Methoden

Zur Bearbeitung der zentralen Fragestellung wurde ein experimentelles Studiendesign gewählt, das gezielt mit unterschiedlichen Patient\*innengruppen arbeitete. Die nachfolgenden Abschnitte erläutern das methodische Vorgehen vom Studiensetting bis zur Datenauswertung.

### 2.2.1 Studienvorbereitung

Nachfolgend soll erläutert werden, mithilfe welcher Ein- und Ausschlusskriterien die Wahl der Negativkontrollen und der Studienproben vollzogen wurde.

#### 2.2.1.1 Auswahl der Negativkontrollen

Wie sich der Fragestellung bereits entnehmen lässt, war es für den Versuchsaufbau essenziell, aufseiten der Negativkontrollen ein Kollektiv an Personen mit einer leeren thromboembolischen Anamnese zu kreieren (siehe 1.3 Zielsetzung dieser Dissertation). Hierfür wurden Blutproben der Gutenberg Gesundheitsstudie (GHS engl. *Gutenberg Health Study*, ehemals „Gutenberg-Herz-Studie“, Umbenennung Februar 2011) gewählt. Die GHS gilt als eine der größten prospektiven, repräsentativen, monozentrischen Bevölkerungsstudien der Rhein-Main-Region. Sie ist ein interdisziplinäres Forschungskonsortium aus Einrichtungen der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (UM). Ziel der Studie ist ein

besseres Verständnis für die Entstehung und den Verlauf von sog. „Volkskrankheiten“, wie bspw. Herz-Kreislauf-Erkrankungen, zu gewinnen (385, 386). Genauere Details zum Auswahlverfahren und dem *Biobanking* können dem Unterkapitel 6.7.1 Weiterführende Informationen zur Auswahl der Negativkontrollen entnommen werden.

#### 2.2.1.2 Auswahl des suspekten Probenmaterials

Die Auswahl der Studienproben richtete sich nach einer positiven thromboembolischen Krankheitsanamnese. Ausgewählt wurden Patient\*innen mit einer stattgehabten TVT und/oder einer LAE. Das Kollektiv entstammt der GMP-VTE-Studie (*Genotyping and Molecular phenotyping of Venous thromboembolism project*), einer prospektiven Kohortenstudie u. a. der UM (387). Einschlusskriterien waren das Erreichen der Volljährigkeit sowie eine gesicherte VTE-Diagnose mittels bildgebendem Standardverfahren (387, 388). Bildgebendes Standardverfahren bei VTE-Patient\*innen stellte die Kompressionssonographie (KUS) mit Farbdoppler dar. Bei LAE-Patient\*innen wurde die Diagnose mittels computertomographischer Lungenangiographie oder Ventilation/Perfusion-Szintigraphie sowie einer zusätzlichen Ultraschalluntersuchung gesichert (387, 388).

Für diese Dissertation wurden aus diesem Studienkollektiv ausschließlich Serumproben gewählt, die in einer zuvor durchgeführten Routineuntersuchung der UM als positiv für aPL gewertet wurden. Nähere Details zu der GMP-VTE-Studie können dem Unterkapitel 6.7.2 Weiterführende Informationen zur Auswahl der Studienproben: GMP-VTE-Studie entnommen werden.

#### 2.2.1.3 Auswahl des Standards

Um das kofaktorunabhängige bzw. Lipid-bindende Bindungsverhalten der Antikörper des Probenmaterials sinnvoll zu quantifizieren, war ein Vergleich mit einem gut charakterisierten humanen monoklonalen aCL notwendig, dessen Bindungsverhalten nicht auf der Anwesenheit von sog. Kofaktoren fußt. Gewählt wurde der aPL HL5B eines zum Abnahmezeitpunkt 51-jährigen Mannes mit diagnostiziertem primären APS, welches sich klinisch durch rezidivierende cerebrale Mikroinfarkte manifestiert (191).

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Mikrotiterplatten untereinander herzustellen, erfolgte die Vorbereitung des Standards und seiner Verdünnungsreihe für alle Platten an einem Arbeitstag unter identischen Voraussetzungen. Die Verdünnungsreihen beinhalteten stets die folgenden Konzentrationen: 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml.

#### 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

Da es für den Versuchsaufbau essenziell war, die Autoantikörper des Patient\*innenkollektivs isoliert, sprich ohne die Anwesenheit von möglichen Kofaktoren zu erhalten, galten die ersten

labortechnischen Schritte der Aufreinigung der Ig-Fraktion aus dem Serum. Alle Schritte der Proteinaufreinigung erfolgten unter sterilen Bedingungen an der Werkbank.

#### 2.2.2.1 Proteinfällung mittels Aussalzung

Pro Testperson wurden 600 µl Probenmaterial (Patient\*innenserum) mit 240 µl gesättigter Ammoniumsulfatlösung (siehe Tabelle 17 Puffer und Lösungen) für drei Stunden unter gelegentlichem Vortexen (siehe Tabelle 13 verwendete Laborgeräte) auf Eis inkubiert und danach mittels Zentrifugation (5 min, 10.000 xg, Raumtemperatur) pelletiert. Im Anschluss konnte der Überstand abpipettiert und verworfen werden und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert werden. Auf diese Weise gelang eine starke Anreicherung der Immunglobuline aus den Serumproben.

Zwecks Entsalzung und damit einhergehender Verbesserung der Lagerfähigkeit wurden Chromatographiesäulen der Marke GE Healthcare unter Verwendung von Sephadex G-25 Resin präpariert (PD Mini Trap G-25). Diese Säulen fußen auf dem Prinzip der sog. Größenausschluss-Chromatographie (auch Gelpermeationschromatographie (GPC) genannt). Die GPC beruht wiederum auf dem Prinzip der Flüssigchromatographie. Mittels GPC lassen sich Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Volumen fraktionieren. Die unterschiedlichen Diffusionsverhalten basieren auf spezifischen Moleküleigenschaften und beeinflussen die jeweilige Retentionszeit. Kleinere Moleküle dringen tiefer in die Poren der stationären Phase ein, wodurch ihnen ein größeres effektives Verteilungsvolumen zur Verfügung steht. Daraus resultiert eine längere Retentionszeit im Vergleich zu größeren Molekülen. Letztere eluieren daher früher und finden sich in den initialen Eluatfraktionen, während kleinere Moleküle erst in späteren Fraktionen auftreten (389, 390). Bezogen auf den hier angewendeten Testaufbau repräsentieren kleinere Moleküle die Salzionen des Aussalzungsprozesses und die Ig des Probenmaterials stellen die größeren Moleküle dar.

Zunächst mussten die Säulen äquilibriert werden, was durch Spülen der Gelmatrix mit 2,5 – 3 ml sterilem PBS erfolgte. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Durch eine darauffolgende Zentrifugation (2 min, 1.000 xg, Raumtemperatur) wurde der Spülvorgang abgeschlossen. Das durch die Proteinfällung gewonnene Probenmaterial konnte nun auf die vorbereiteten Säulen (Kapazität: 0,2 – 0,5 ml Probenmaterial; resuspendiert in PBS) aufgetragen werden. Die Elution gelang durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (2 min, 1.000 xg, Raumtemperatur). Auf diese Weise gewonnenes Material konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingelagert werden.

#### 2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop

Zur Verifizierung der Protein-Selektion wurden alle Proben orientierend in einem Spektralphotometer (NanoDrop (Vollspektrum-Spektrumphotometer (250-750 nm), siehe: Tabelle 13 verwendete Laborgeräte) auf ihren jeweiligen Proteingehalt hin untersucht.

Das grundlegende Prinzip des NanoDrops basiert darauf, die Probe als Flüssigkeitssäule zwischen zwei Glasfaserkabeln zu platzieren, die daraufhin von dem Licht einer gepulsten Xenon Lampe durchleuchtet wird. Die gemessene Absorption ist proportional zur Proteinkonzentration und kann in der Spektralphotometrie maschinell ausgewertet werden.

Vorteilhaft war, dass die Konzentrationsbestimmung ohne vorherige Verdünnung des Probenmaterials erfolgen konnte und dass der NanoDrop in der Lage ist, kleine Mengen von Proteinen in Lösung (PBS) zu messen. Messwerte werden ab Überschreiten der 1 µg-Grenze angegeben. Außerdem benötigt der NanoDrop zur Durchführung der Messung nur ein Mikrovolumen von 0,5 – 2 µl. Alle Messungen wurden mit einem Probenvolumen von 1,5 µl und bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt.

#### 2.2.3 Konzentrationsbestimmung mittels Qubit™ Protein BR Assay Kit

Zur Optimierung der Vergleichbarkeit der einzelnen Proben miteinander wurde der Proteingehalt in einem zweiten Messverfahren präziser bestimmt. Verwendet wurde hierfür das Qubit™ Protein BR Assay Kit der Marke Invitrogen™ (siehe Tabelle 18 Fertigsysteme (Kits)). Im Vergleich zum Messverfahren mittels NanoDrop weist dieses Verfahren eine höhere Reproduzierbarkeit der Messwerte auf und verfügt ebenso über einen breiten dynamischen Messbereich (0,1 – 20 mg/ml).

Dieses Kit erlaubt eine photometrische Proteinbestimmung des Probenmaterials, kalibriert anhand von zwei (dem Kit beiliegenden) Standards. Das Messverfahren wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (siehe 6.8 Gebrauchsanweisung des verwendeten Qubit™-Kits). Es erfolgten keine Abweichungen vom Protokoll.

#### 2.2.4 Cardiolipin-ELISA Typ *home made*

Um die Bindungsspezifität der in der Ig-Fraktion der Proband\*innen enthaltenen Autoantikörper zu prüfen, wurde ein indirekter ELISA durchgeführt. Hierfür wurde in Annäherung an den verwendeten Standard angenommen, dass die Farbintensität des umgesetzten TMB-Substrates proportional zu dem spezifischen Bindungsverhalten der Autoantikörper sei.

Herkömmliche kommerzielle ELISA-Systeme zum Nachweis von aCL basieren i. d. R. auf einem Testaufbau in Anwesenheit von sog. Kofaktoren (β2GPI als Serumprotein der Patient\*innenproben, siehe 1.2.6.4 Proteinaffinitätschromatografie und β2GPI). Da diese

Arbeit das kofaktorunabhängige bzw. Lipid-bindende Antikörperaktivität der aCL untersuchen soll, wurde ein abgewandelter nicht-kommerzieller Cardiolipin-ELISA verwendet (Typ “*home made*”).

#### 2.2.4.1 Vorbereitungen der ELISA-Platten

Als Basis fungierte eine 96-Well-Platte des Herstellers Thermo Scientific (siehe Tabelle 14 Verbrauchsmaterialien) die über Nacht mit 2,5 µg Cardiolipin in Ethanol pro Well bei + 4 °C inkubiert wurde. Die darauffolgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Proben wurden zwecks besserer Vergleichbarkeit der Messwerte auf eine Konzentration von 50 µg/ml mit PBS verdünnt. Die Proben der Patient\*innen wurden für eine Testung in Doppelbestimmung vorbereitet. Proben des Kontrollkollektivs wurden in Einfachbestimmung aufpipettiert (ebenfalls auf 50 µg/ml verdünnt).

#### 2.2.4.2 Durchführung Cardiolipin-ELISA Typ *home made*

Alle nun folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur und (wenn nicht anders angegeben) unter Verwendung von Volumina von 100 µl.

Die wie 2.2.4.1 Vorbereitungen der ELISA-Platten präparierte, mit Cardiolipin gecoatete Mikrotiterplatte wurde mit einem hierfür angesetzten ELISA-Waschpuffer (PBS + 0,1 % Tween20) am ELISA-Washer von der überstehenden Cardiolipin-Ethanol-Lösung gereinigt. Zur Vermeidung einer unspezifischen Bindung wurden die Wells für eine Stunde geblockt (PBS + 1 % Tween20, 300 µl je Well). Die *Blockingsolution* wurde im Anschluss nicht mittels ELISA-Washer entfernt, sondern lediglich aus der Mikrotiterplatte ausgeklopft. Daraufhin wurden die Antikörperlösungen aus dem Probenmaterial aufpipettiert (je 50 µl pro Well) und für eine Stunde inkubiert. Die Tabelle 20 Auftragung des Probenmaterials auf die Kavitäten der ELISA-Mikrotiterplatte stellt das grundsätzlich angewendete Schema orientierend dar.

Tabelle 20 Auftragung des Probenmaterials auf die Kavitäten der ELISA-Mikrotiterplatte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	S1		P		P		P		P		NeKo	NeKo
<b>B</b>	S2		P		P		P		P		NeKo	NeKo
<b>C</b>	S3		P		P		P		P		NeKo	NeKo
<b>D</b>	S4		P		P		P		P		NeKo	NeKo
<b>E</b>	S5		P		P		P		P		NeKo	NeKo
<b>F</b>	S6		P		P		P		Blank	Blank	NeKo	NeKo
<b>G</b>	P		P		P		P		NeKo	NeKo	NeKo	NeKo
<b>H</b>	P		P		P		P		NeKo	NeKo	NeKo	NeKo

S1-S6 = Standardverdünnungsreihe, P = Proben, PBS = Pufferblank, NeKo = Negativkontrollen

Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper (1:10.000 in PBS) im Sinne eines indirekten ELISAs aufgetragen. Dieser Sekundärantikörper ist in der Lage, die Fc-Region der gebundenen Antikörper aus dem Probenmaterial zu

detektieren. Sekundärantikörper, die nach einstündiger Inkubationszeit keine Bindung eingehen konnten, wurden in einem letzten Waschschrift entfernt.

Der Sekundärantikörper ist aufgrund seiner Kopplung an eine Peroxidase namensgebend für dieses Laborverfahren (engl. *enzyme linked*). Diesem Enzym wird nach Abschluss des letzten Waschriffes sein Substrat (TMB-Substrat) angeboten. Während einer fünfminütigen Inkubationszeit in Dunkelheit setzt die Peroxidase ihr Substrat in einen blauen Farbstoff um. Diese Katalyse wurde nach Überschreiten der Fünfminutenmarke mittels einer 2N Schwefelsäure-Lösung gestoppt, was einen Farbwechsel des Produktes von Blau zu Gelb bewirkte. Durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 450 nm (Referenz 620 nm) im ELISA-Reader wurde die Quantifizierung des spezifischen Bindungsverhaltens der aufgereinigten Autoantikörper des Patient\*innenprobenmaterials möglich (siehe Tabelle 13 verwendete Laborgeräte).

#### 2.2.4.3 Auswertung

Der ELISA-Reader bestimmt die optische Dichte (OD) der in 2.2.4.2 Durchführung erläuterten Farbreaktion. Diese Rohdaten wurden in Microsoft Excel (Version 16.69) gesichert. Um eine Vergleichbarkeit der Platten untereinander zu gewährleisten, wurden die ODs mitmilfe der jeweiligen Standardreihe in *arbitrary units* (AU) umgerechnet (vertiefend, siehe 2.2.5.1 Messgröße der Optischen Dichte).

#### 2.2.5 Methoden der statistischen Analyse

Dieses Kapitel bietet einen Überblick über die statistischen Methoden und Messgrößen, die zur Auswertung der experimentellen Daten herangezogen wurden. Die Ausführungen dienen der methodischen Vorbereitung; die konkreten Ergebnisse und deren Interpretation folgen in Kapitel 3 Ergebnisse.

##### 2.2.5.1 Messgröße der Optischen Dichte

Wie bereits in 2.2.4.3 Auswertung liefert der Versuchsaufbau als Messgröße die OD. Sie fungiert als Maß für die Abschwächung von Licht aufgrund der Passage durch Materie. Rechnerisch fußt die OD auf dem dekadischen Logarithmus der Opazität. Die Opazität kann in der Lehre der Optik als Gegenstück zur Transparenz betrachtet werden. Es gilt: Je opaker die Materie, desto lichtundurchlässiger ist sie (391).

Das dekadische Logarithmieren der Opazität gibt demnach an, auf welchen Bruchteil der ursprünglichen Beleuchtungsstärke das Licht durch den Durchtritt durch die Materie abgeschwächt wird. Eine OD von 1 entspricht demnach einem Zehntel der ursprünglichen Beleuchtungsstärke, eine OD von 2 demnach einem Hundertstel usw. (392).

### 2.2.5.2 Vergleichbarkeit Schaffen: Messgröße der *Arbitrary Units*

Um eine Vergleichbarkeit verschiedener Testdurchläufe des ELISA-Verfahrens über mehrere Mikrotiterplatten hinweg zu kreieren, wurde die Verwendung der AU angestrebt. Diese willkürliche Einheit (als Übersetzung aus dem Englischen *arbitrary unit*: willkürliche Einheit) fußt auf der Verwendung eines einheitlichen, gut untersuchten Standards, dessen Messergebnisse aus einer Verdünnungsreihe als Orientierungspunkte genutzt werden (393). Die Verdünnungsreihen des Standards konnten mittels einer linearen Gleichung grafisch dargestellt werden. Die Abbildung 13 beispielhafte Verdünnungsreihe des Standards HL5B zeigt die grafische Darstellung einer solchen Verdünnungsreihe und die daraus resultierende lineare Gleichung.

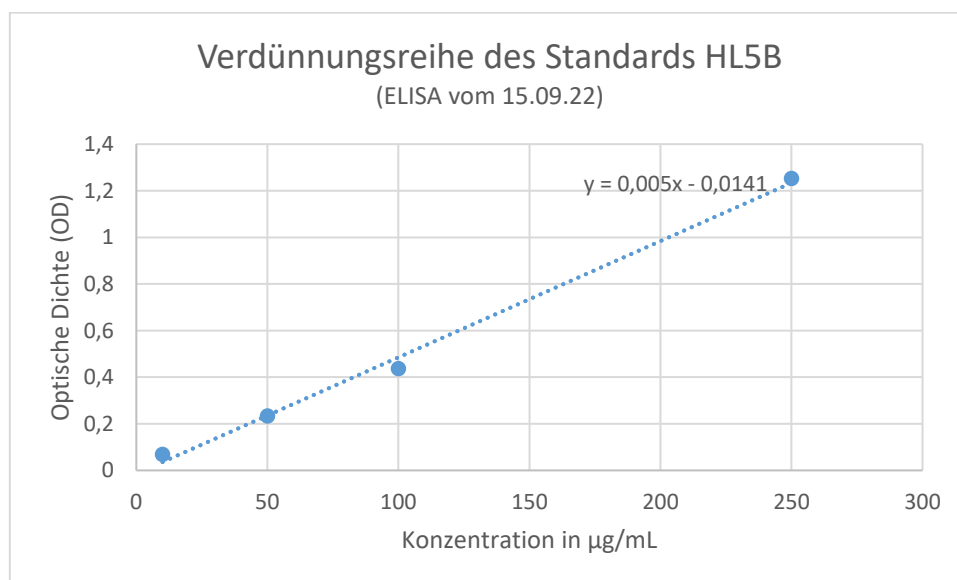


Abbildung 13 beispielhafte Verdünnungsreihe des Standards HL5B

Nachfolgend wird das Augenmerk auf die Analyse der Werte der AU gerichtet, da dies dazu beitragen kann, Bias der verschiedenen Testdurchläufe zu minimieren.

### 2.2.5.3 Abgrenzung der Studienkollektive

Das Studienkollektiv der Negativkontrollen und jene der Studienproben sollten möglichst klar abgegrenzt sein, damit die zugrunde liegende Fragestellung der Dissertation bearbeitet werden kann. Folglich wurden alle Analysen der deskriptiven Statistik unter Beachtung der Subgruppen durchgeführt.

### 2.2.5.4 z-Standardisierung

Nachfolgend werden die Werte der Negativkontrollen auf Ausreißer hin untersucht. Sprich, auf Datenpunkte, die so stark von Ihrem erwarteten Ergebnis abweichen, dass ihre Plausibilität infrage gestellt werden muss. Ein gängiges Verfahren, um diese Prüfung durchzuführen, ist die sog. z-Standardisierung.

Mittels Standardnormalverteilung wurde die Analyse auf Ausreißer initiiert. Hierfür wurde laut Gauß davon ausgegangen, dass 95 Prozent der Werte zwischen -1,96 und 1,96 dieses Analysetools liegen und 99 Prozent der Werte zwischen -2,58 und 2,58. Zunächst wird jeder einzelne Wert der zu untersuchenden Variable z-standardisiert (siehe Formel 1 z-Standardisierung, wobei  $\mu$  den Stichprobenmittelwert darstellt (siehe Formel 2 arithmetisches Mittel)).

*Formel 1 z-Standardisierung*

$$z_{xi} = \frac{x_i - \mu}{\sigma}$$

*Formel 2 arithmetisches Mittel*

$$\bar{x} = \mu = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Die gängigen Grenzen des Konfidenzintervalls wurden zur Einschätzung der Ausreißerwahrscheinlichkeit herangezogen. Die Tabelle 21 Interpretation der z-Werte fasst besagte Grenzen zusammen (394).

*Tabelle 21 Interpretation der z-Werte*

	<b>z-Werte</b>	<b>Interpretation</b>
1.	$\geq -1,96$ und $\leq 1,96$	unbedenkliche, plausible Werte
2.	$< -1,96$ und $> 1,96$	potenzielle Ausreißer
3.	$< -2,58$ und $> 2,58$	wahrscheinliche Ausreißer
4.	$< -3,29$ und $> 3,29$	sehr wahrscheinliche Ausreißer

#### 2.2.5.5 Testung auf Normalverteilung

Um sich Zugang zu weiteren parametrischen Testverfahren der Statistik zu verschaffen, wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft.

##### 2.2.5.5.1 Grafische Methode

Orientierend wurde zunächst ein Histogramm hinzugezogen, um einen ersten Eindruck der Verteilung zu gewinnen. Genauere Einblicke ermöglichte das Erstellen von (trendbereinigten) Quantil-Quantil-Diagrammen (Q-Q-Diagrammen).

##### 2.2.5.5.2 Analytische Methode

Nach orientierender grafischer Darstellung wurden die Werte rechnerisch mittels Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorow-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet werden. Prinzipiell wird bei diesen statistischen Signifikanztests von dem Vorliegen einer Normalverteilung ( $H_0$ ) ausgegangen.

Bei einer Signifikanz oberhalb des 0,05-Schwellenwertes eines Signifikanzniveaus von 95 Prozent kann die Alternativhypothese ( $H_1$ ) verworfen werden und von einer Normalverteilung

ist auszugehen. Es sei erwähnt, dass der Kolmogorow-Smirnov-Test aktuell kontrovers diskutiert wird und ihm eine geringere Testpower als dem Shapiro-Wilk-Test zu geschrieben wird (395, 396).

#### 2.2.5.6 Testung auf Log-Normalverteilung

Im folgenden Schritt wurde eine Testung auf logarithmische Normalverteilung (kurz Log-Normalverteilung) initiiert, welche sich für viele naturwissenschaftliche Messgrößen eignet, da multiplikative Zufallsprozesse berücksichtigt werden können. Da die AU eine Messgröße darstellt, die sich auf Werte im positiven Bereich beschränkt, waren die Voraussetzungen für dieses Testverfahren erfüllt (die AU beruht auf dem Messwert der OD, die OD stellt ein Maß für die Abschwächung einer Strahlung dar; eine negative Abschwächung kann im angewendeten Testverfahren nicht erfasst werden).

Die Werte der AU wurden mittels Logarithmus transformiert. Genutzt wurde hierfür die folgende mathematische Grundlage (Formel 3 transformierte Zufallsvariable (Y), wobei (x) den Ausgangswert darstellt).

*Formel 3 transformierte Zufallsvariable*

$$Y = \ln(X)$$

Analog zur Vorgehensweise im Kapitel 2.2.5.5 Testung auf Normalverteilung wurden auch bei der Testung auf Log-Normalverteilung ein Histogramm, die (trendbereinigten) Q-Q-Diagramme, der Kolmogorow-Smirnov-Test und der Shapiro-Wilk-Test zurate gezogen.

#### 2.2.5.7 Auswahl der nicht-parametrischen Methoden

In den folgenden Analyseschritten wurden insbesondere sog. nicht-parametrischen Methoden eingesetzt. Solche Methoden setzen keine Normalverteilung oder andere spezifische Verteilungseigenschaften voraus.

##### 2.2.5.7.1 Mann-Whitney-U-Test

Zur Analyse der zentralen Tendenz innerhalb der beiden Subkollektive der Negativkontrollen und der Studienproben eignet sich als nicht-parametrische Methode der Mann-Whitney-U-Test (als Pendant zum parametrischen t-Test). Hierfür werden die beiden Subgruppen als zwei unabhängige Stichproben gewertet. In einem weiteren Schritt kann die Formel 4 Effektstärke angewendet werden, um die Analyseergebnis besser einordnen zu können. N beschreibt die Fallzahl und z den Korrelationskoeffizienten.

Mithilfe der in Tabelle 22 Effektgrenzen nach Cohen (1988) bzw. Cohen (1992) kann für die ermittelte Effektgrenze im Anschluss eine orientierende Einordnung durchgeführt werden (397, 398).

Formel 4 Effektstärke  $r$

$$r = \left| \frac{z}{\sqrt{N}} \right|$$

Tabelle 22 Effektgrenzen nach Cohen (1988) bzw. Cohen (1992)

Orientierende Effektgrenzen	
Ab 0,1	schwach
Ab 0,3	mittel
Ab 0,5	stark
<b>Quellen</b>	(397, 398)

#### 2.2.5.7.2 Punktbiserialer Korrelation

Zur Prüfung, ob die Gruppenzugehörigkeit des Probenmaterials (Negativkontrollen vs. Studienproben) mit einer Zu- oder Abnahme der OD-Werte und damit mit höheren bzw. niedrigeren AU-Werten korreliert, eignet sich unter anderem die punktbiserialer Korrelation. Wie eingangs dieses Kapitels erläutert, wird der AU-Wert als metrische Variable betrachtet, während die Gruppenzuweisung ein nominal skaliertes Merkmal darstellt. Für diese Kombination aus Skalentypen ist die punktbiserialer Korrelation ein geeignetes Verfahren.

Die punktbiserialer Korrelation lässt sich aus der Pearson-Korrelation herleiten und stellt keine eigenständige Maßzahl dar, sondern ist ein Spezialfall dieses gewöhnlichen Korrelationskoeffizienten ((399, 400) siehe Formel 5 punktbiserialer Korrelation; es gilt:  $QS =$  Quadratsumme,  $n =$  Stichprobenumfang,  $p =$  Anteil der Untersuchungseinheiten mit der positiven Ausprägung des dichotomen Merkmals (umgekehrt:  $q =$  negative Ausprägung)). Bei richtiger Merkmalskalierung errechnen neuere SPSS-Versionen automatisch die punktbiserialer Korrelation anstelle der Pearson-Korrelation (399).

Formel 5 punktbiserialer Korrelation

$$\rho = \frac{I_{D=1} - I_{D=0}}{\sqrt{QS(I)}} \cdot \sqrt{n \cdot p \cdot q}$$

#### 2.2.5.7.3 Eta-Koeffizient

Als Zusammenhangsmaß bietet sich der sog. Eta-Koeffizient an. Die Berechnung des Eta-Koeffizienten basiert auf der Bildung von Kreuztabellen. Durch die Wertung des Eta-Koeffizienten als Richtungsmaß (bei Annahme eines (geringen) gerichteten Zusammenhangs) werden Rückschlüsse auf die Abhängigkeit der Varianz ( $\sigma^2$ ) der abhängigen Variable von der unabhängigen nominalen Variable möglich (siehe Formel 6 Varianz). Dies erfolgt mittels Quadrierens des Eta-Koeffizienten.

Formel 6 Varianz

$$\sigma^2 = \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2 p_i$$

#### 2.2.5.7.4 Chi-Quadrat

Eine Zuteilung in positive und negative Testergebnisse des Versuchsaufbaus erlaubt den Zugang zu weiteren statistischen Verfahren und verwendet dementsprechend einen qualitativen Analyseansatz.

Die qualitative Auswertung beruht auf der Erhebung eines Cut-offs bzw. einer sog. Toleranzgrenze, die den Bereich festlegt, in dem Werte eine signifikante Bedeutung jenseits des Zufalls erreichen. Grundlegend zur Cut-off-Ermittlung ist die Berechnung des Mittelwertes (Formel 2 arithmetisches Mittel) mit anschließender Addition der dreifachen Standardabweichung (Formel 7 Standardabweichung), also der Quadratwurzel der Varianz (Formel 8 Cut-off).

*Formel 7 Standardabweichung*

$$s = \sqrt{\sigma^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

*Formel 8 Cut-off*

$$Co = \bar{x} + 3 * s$$

Stellt man die AU-Werte der Studienproben in einem einfachen Punktdiagramm dar und fügt den ermittelten Cut-off als Linie mit entsprechendem Schnittpunkt in der Ordinatenachse (x) ein, so lässt sich orientierend ablesen, welche Studienproben AU-Werte oberhalb der dreifachen Standardabweichung vorweisen. Nach dieser Anwendung des berechneten Cut-offs auf die AU der Studienproben lässt sich dieses Kollektiv in zwei weitere Subkollektive einteilen: Jenen Studienproben mit einem positiven Testergebnis (AU-Werte oberhalb des Cut-offs) und in Studienproben mit negativem Testergebnis (AU-Werte unterhalb des Cut-offs). Die Merkmalsskalierung in positiv und negativ wird in dieser Konstellation als nominale Skalierung gewertet, ebenso die Zuteilung der Testergebnisse auf die Kollektive der Negativkontrollen und der Studienproben.

Folglich bietet sich in dieser Situation die Durchführung des sog. Chi-Quadrat-Tests an. Dieses Testverfahren beruht auf der Bildung von Kreuztabellen und berechnet die quadrierten Abweichungen der tatsächlichen Häufigkeiten ( $O_k$ ) von den erwarteten Häufigkeiten ( $E_k$ ) und setzt dies wiederum mit den erwarteten Häufigkeiten in Verhältnis.

*Formel 9 Chi-Quadrat-Berechnung*

$$X^2 = \sum_{k=1}^n \frac{(O_k - E_k)^2}{E_k}$$

Der Chi-Quadrat-Test zählt zu den Hypothesentests. Die H0 des Chi-Quadrat-Tests lautet, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen erwarteter und beobachteter Häufigkeit gibt. Sollte sich ein signifikanter Unterschied errechnen, so lässt sich im Anschluss die Effektstärke des Chi-Quadrat-Tests mittels *Phi* bzw. *Cramer-V* ermitteln (401). Da es sich in dem vorliegenden Testaufbau um eine sog. 2 x 2 Kreuztabelle handelt, sind die Werte für Cramer-V und Phi identisch. Zwecks Übersichtlichkeit wird nur eine Formel aufgeführt (siehe Formel 10 Effektstärke Phi).

*Formel 10 Effektstärke Phi*

$$\varphi = \sqrt{\frac{X^2}{N}} = w$$

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vorbereitung der Daten: Prüfung der Negativkontrollen

Da sich weitere statistische Verfahren an den Negativkontrollen orientieren, ist es sinnvoll, diese Daten zunächst genauer zu betrachten. Gesunde Personen ohne thrombotische Anamnese dienen als Negativkontrollen und werden verglichen mit Seren von Patient\*innen mit venöser Thrombose und nachgewiesenem aCL-Titer (Studienkollektiv).

Wie im Abschnitt 2.2 Methoden erläutert, wurden pro ELISA-Platte etwa 20 Kontrollseren in Einfachbestimmung aufgetragen. Insgesamt bestand der hier verwendete Pool der Negativkontrollen aus 38 Seren. Da das ELISA-Verfahren fünfmal durchgeführt wurde, wurden die Kontrollseren alle in Mehrfachbestimmung über verschiedene Testplatten hinweg ausgewertet (mind. Zweifachbestimmung, teilweise Dreifachbestimmung).

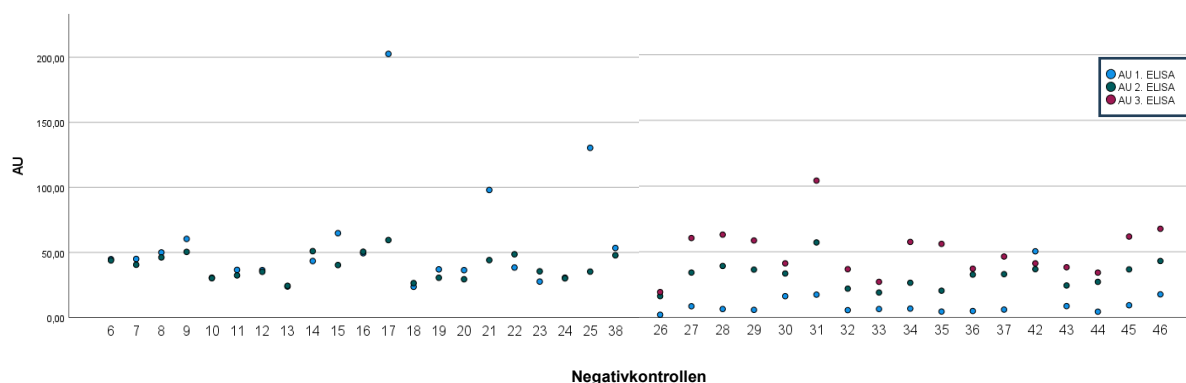


Abbildung 14 Übersicht über die Verteilung der AU aller Negativkontrollen

##### 3.1.1 Akzidentiell fehlerhafte Versuchsdurchführung

Die Negativkontrolle von der Testperson mit dem Kürzel N38 sollte ursprünglich in Dreifachbestimmung in den Testaufbau einfließen. Aufgrund eines Pippettierfehlers wurde der Wert des ELISAs vom 14.09.2022 jedoch von der Auswertung ausgeschlossen. Somit wurde die Negativkontrolle N38 in Zweifachbestimmung ausgewertet, um fehlerhafte Wertebeeinflussungen zu vermeiden. Die übrigen Werte wurden entsprechend dem zuvor beschriebenen Protokolls erhoben.

##### 3.1.2 Mögliche Ausreißer detektieren

Mittels z-Standardisierung kann die Plausibilität der Werte geprüft werden (siehe Abbildung 15 Übersicht über die Verteilung aller z-Faktorwerte der Negativkontrollen sowie 2.2.5.4 z-Standardisierung und Formel 1 z-Standardisierung). Wertet man die gängigen Grenzen des Konfidenzintervalls als Cut-offs, so lassen sich fünf Ergebnisse darstellen, die als nicht uneingeschränkt plausibel gelten. Die nachfolgenden Streudiagramme zeigen die berechneten z-Faktor-Werte und markieren mithilfe der eingezeichneten

Konfidenzintervallgrenzen, welche Werte potenzielle Ausreißer darstellen (siehe Abbildung 16 Streudiagramm der z-Faktorwerte der Negativkontrollen in Zweifachbestimmung und Abbildung 17 Streudiagramm der z-Faktorwerte der Negativkontrollen in Dreifachbestimmung). In der Tabelle 23 Messwerte der z-Werte der Negativkontrollen oberhalb der gängigen Konfidenzintervallgrenzen werden diese potenziellen Ausreißer anschaulich zusammengefasst.

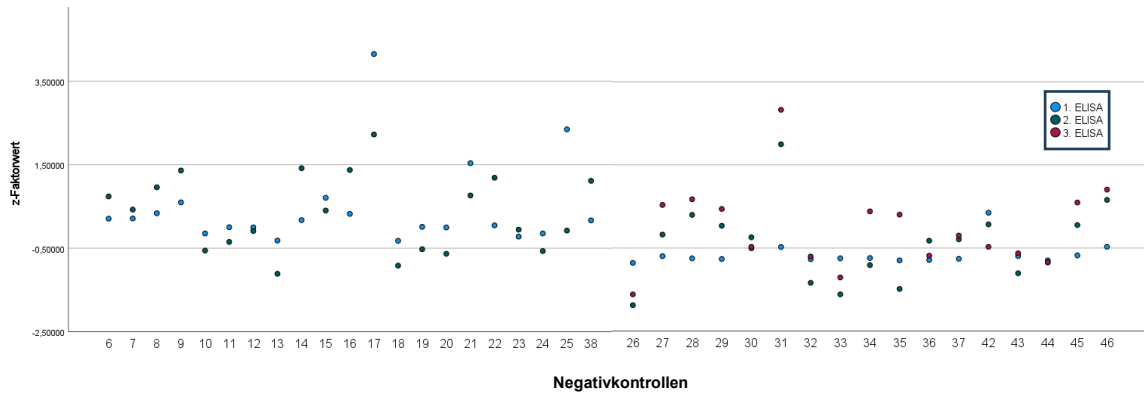


Abbildung 15 Übersicht über die Verteilung aller z-Faktorwerte der Negativkontrollen

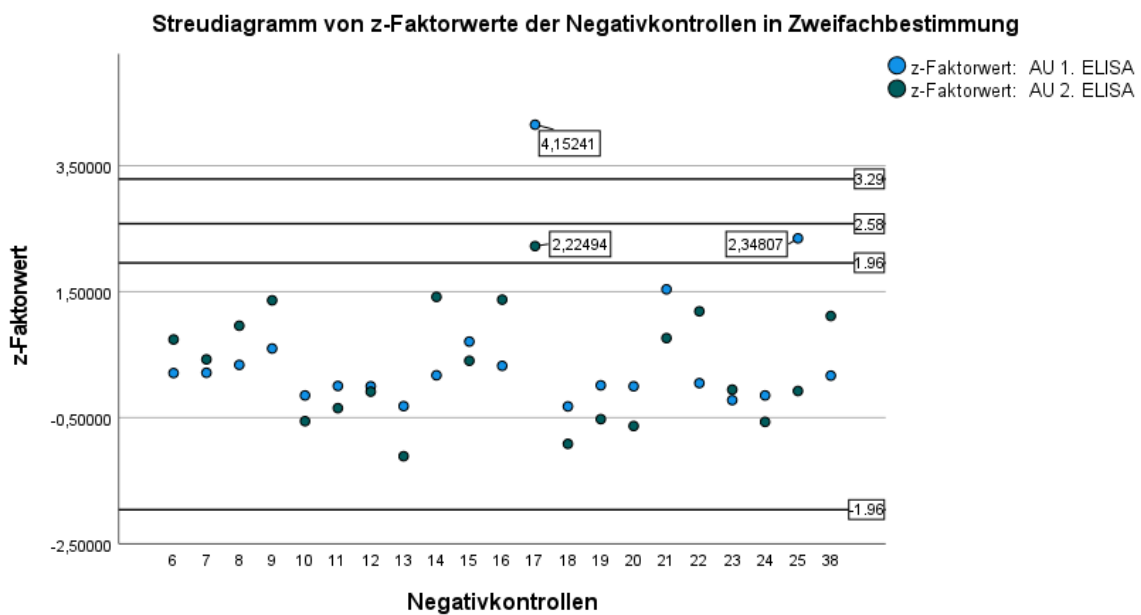


Abbildung 16 Streudiagramm der z-Faktorwerte der Negativkontrollen in Zweifachbestimmung

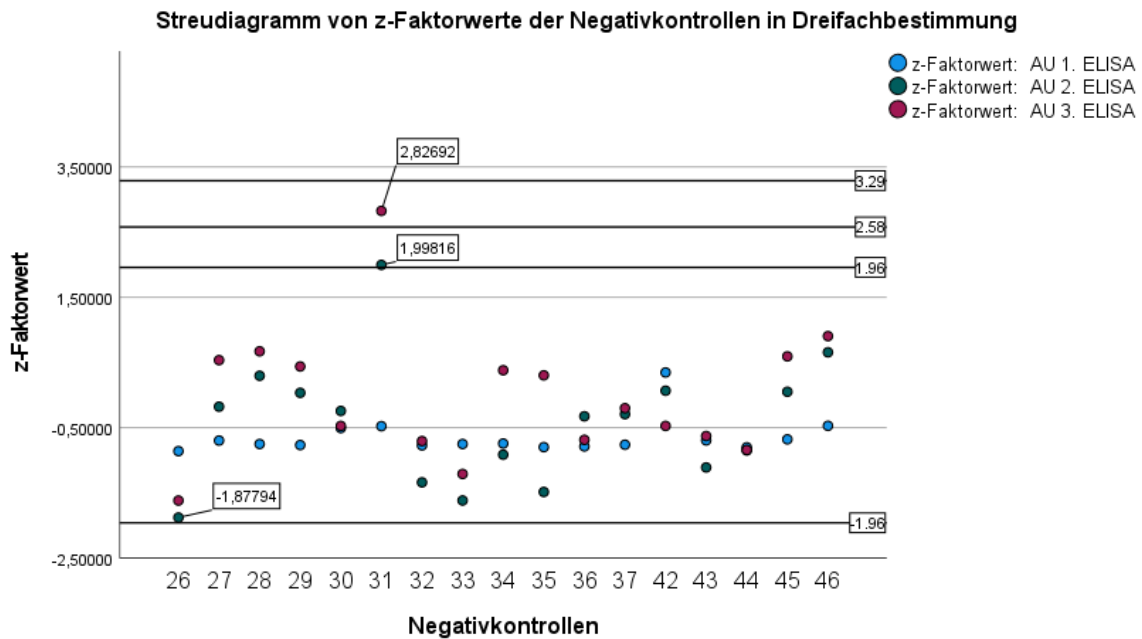


Abbildung 17 Streudiagramm der z-Faktorwerte der Negativkontrollen in Dreifachbestimmung

Tabelle 23 Messwerte der z-Werte der Negativkontrollen oberhalb der gängigen Konfidenzintervallgrenzen

Kürzel	z-Wert	AU	Platten-Nr.	Interpretation
N17	4,15241	202,62	2	sehr wahrscheinlicher Ausreißer
N17	2,22494	59,5287	4	potenzieller Ausreißer
N25	2,34807	130,42	2	potenzieller Ausreißer
N31	2,82697	104,185	5	wahrscheinlicher Ausreißer
N31	1,99816	57,1379	3	potenzieller Ausreißer

### 3.1.3 Ausreißer definieren

Vor der weiteren Datenanalyse wurden zwei Werte als Ausreißer definiert. Basis für diese Wahl stellt die oben beschriebene Vorgehensweise sowie die Tabelle 21 Interpretation der z-Werte dar. Demnach wurden z-Werte, die mind. kleiner -2,58 und mind. größer 2,58 (entsprechende Interpretation = wahrscheinlicher Ausreißer) waren, als valide Ausreißer gewertet, wohingegen z-Werte kleiner -1,96 und größer 1,96 (entsprechende Interpretation = potenzieller Ausreißer) in die Analyseverfahren eingeschlossen wurden. Dies fasst die Tabelle 24 Definierte Ausreißer im Kollektiv der Negativkontrollen final zusammen. Hier wird auch der Messwert aufgeführt, der aufgrund einer akzidentiell fehlerhaften Versuchsdurchführung erhoben wurde und von dem weiteren Analyseverfahren ausgeschlossen wurde (siehe 3.1.1 Akzidentiell fehlerhafte Versuchsdurchführung).

Tabelle 24 Definierte Ausreißer im Kollektiv der Negativkontrollen

Kürzel	z-Wert	AU	ELISA-Platte	Interpretation
N17	4,15241	202,62	2	sehr wahrscheinlicher Ausreißer
N31	2,82697	104,185	5	wahrscheinlicher Ausreißer
N38	-	-	-	akzidentiell fehlerhafte Versuchsdurchführung

### 3.1.4 Argumentation hinter dem Ausschluss der Ausreißer

Diese Entscheidung, einzelne Werte von dem Analyseverfahren auszuschließen, stützt sich auf drei Argumentationsansätze.

Erstens stellt die z-Standardisierung wie im Kapitel 3.1.2 Mögliche Ausreißer detektieren beschrieben, eine etablierte Methode der Datenprüfung dar. Die identifizierten z-Werte überschreiten den festgelegten Schwellenwert von 2,58. Dieser Schwellenwert wurde als Grenze definiert und konsequent angewendet (entsprechende Interpretation = wahrscheinlicher Ausreißer = z-Werte kleiner -2,58 und größer 2,58).

Zweitens hat die Wahl des Schwellenwerts Auswirkungen auf die anschließenden Analyseverfahren (siehe Tabelle 21 Interpretation der z-Werte). Eine zu hohe Schwelle könnte die Power der nachfolgenden statistischen Tests beeinträchtigen, da sie zu viele Werte ausschließt (entsprechende Interpretation = sehr wahrscheinlicher Ausreißer = z-Werte kleiner als -3,29 oder größer als 3,29). Eine zu niedrige Schwelle könnte hingegen die Plausibilität der Messreihe gefährden, da sie zu viele Werte zur Analyse zulässt (entsprechende Interpretation = potenzieller Ausreißer = z-Werte kleiner als -1,96 oder größer als 1,96).

Drittens kann diese Entscheidung auch mithilfe des Versuchsaufbaus argumentativ bestärkt werden: Die Negativkontrollen wurden alle in Zweifach- und teilweise sogar in Dreifachbestimmung ausgewertet, was durch die Redundanz einen zusätzlichen Ansatz zur Überprüfung der Plausibilität der Werte bietet.

## 3.2 Deskriptive Statistik

In diesem Kapitel werden die in 2.2.5 Methoden der statistischen Analyse beschriebenen Verfahren zur deskriptiven Statistik auf die erhobenen AU-Werte angewendet. Die nachfolgenden Auswertungen dienen der strukturierten Darstellung der Verteilungseigenschaften, ohne bereits Rückschlüsse auf die zentrale Hypothese zu ziehen. Letzteres wird im Kapitel 3.3 Explorative Statistik umgesetzt.

### 3.2.1 Lagemaße

Hauptaugenmerk der statistischen Auswertung lag auf der Kenngröße der AU. Zur einführenden Datenanalyse wurden nachfolgend die gängigen Lagemaße der AU in den beiden Subgruppen bestimmt. Grafisch werden diese Daten in der

Abbildung 18 Boxplot: Vergleich der AU-Mittelwerte der beiden Subgruppen zusammengefasst.

Tabelle 25 Lagemaße AU: Negativkontrollen

Mittelwert AU		
N	Gültig	38
	Fehlend	0
Mittelwert		37,5722
Median		34,4678
Std.-Abweichung		14,35900
Varianz		206,181
Minimum		12,58
Maximum		82,85

a. Zuteilung Negativkontrollen vs.  
Proben = Negativkontrolle

Tabelle 26 Lagemaße AU: Studienproben

Mittelwert AU

N	Gültig	132
	Fehlend	0
Mittelwert		45,3594
Median		43,7755
Standardabweichung		22,39289
Varianz		501,442
Schiefe		1,143
Standardfehler der Schiefe		0,211
Kurtosis		2,427
Standardfehler der Kurtosis		0,419
Minimum		6,35
Maximum		139,38
Perzentile	25	30,9276
	50	43,7755
	75	53,7369

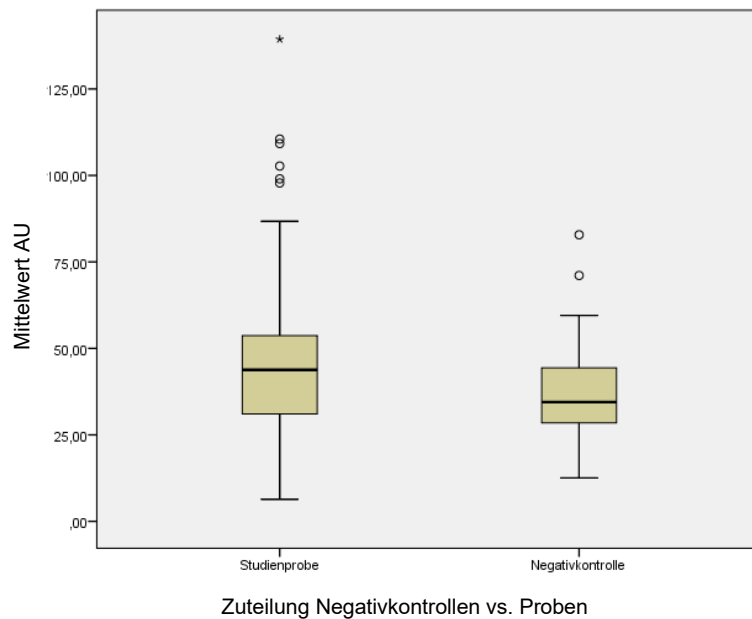


Abbildung 18 Boxplot: Vergleich der AU-Mittelwerte der beiden Subgruppen

### 3.2.2 Testung auf Normalverteilung

Wie bereits im Methodenteil beschrieben, erfolgte Testung auf Normalverteilung zunächst mittels grafischer Methoden und im Anschluss mittels analytischer Methoden (siehe: 2.2.5.5 Testung auf Normalverteilung). Hierbei wurde (aufgrund der Zweifach- bzw. Dreifachbestimmung) i. d. R. der Mittelwert der AU der jeweiligen Probe angewendet.

#### 3.2.2.1 Testung auf Normalverteilung: Grafische Methodik

Zur initialen Einschätzung der Verteilung wurde ein Histogramm erstellt. In Abbildung 19 Histogramm Mittelwert AU beider Subgruppen ist zusätzlich die theoretische Normalverteilungskurve dargestellt.

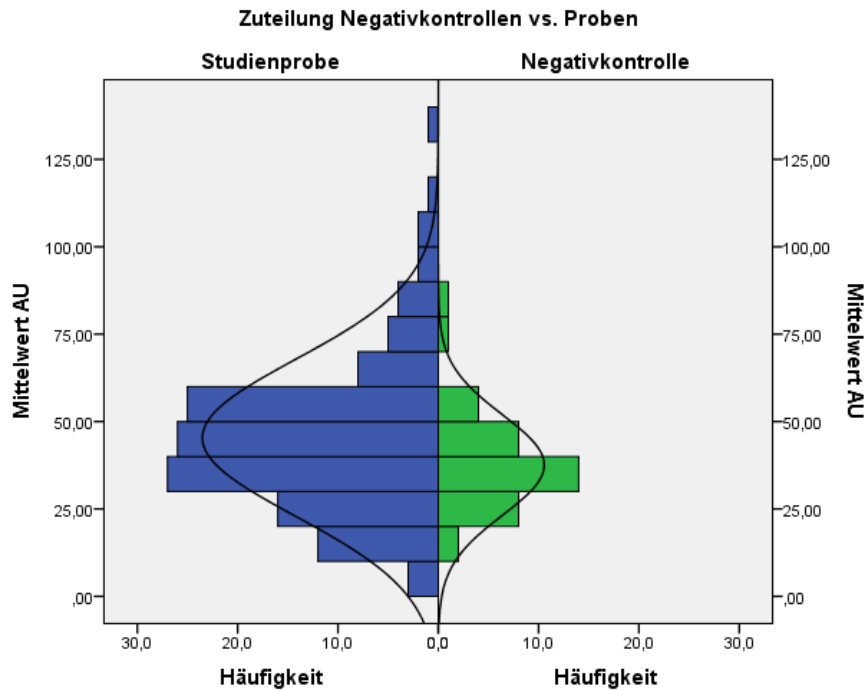
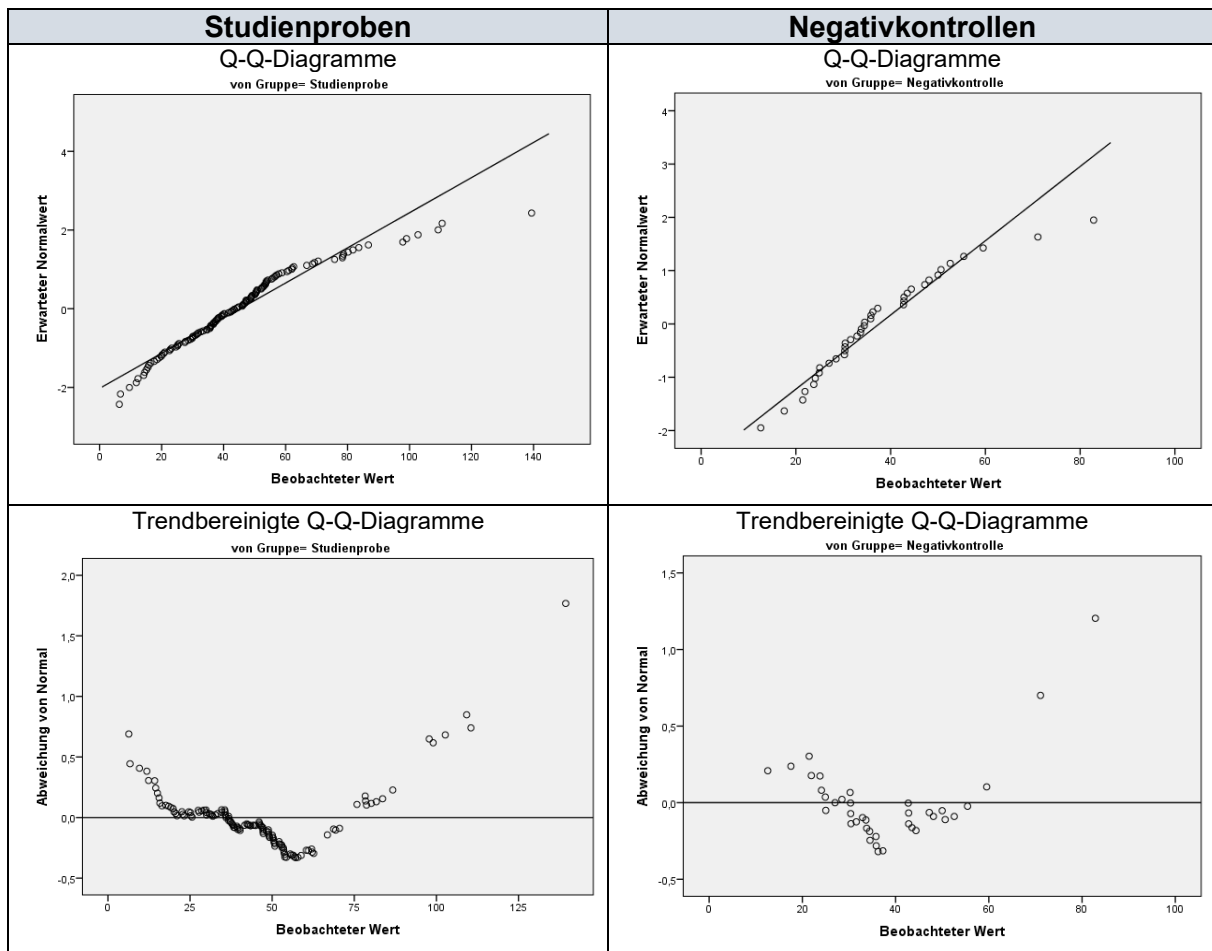


Abbildung 19 Histogramm Mittelwert AU beider Subgruppen

Zur präziseren Interpretation wurden (trendbereinigte) Q-Q-Diagramme erstellt, wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Den Q-Q-Diagrammen ist zu entnehmen, dass stets eine Werteabweichung von der idealen Verteilung vorliegt, was als Hinweis gegen eine Normalverteilung gewertet werden kann.

Tabelle 27 (trendbereinigte) Q-Q-Diagramme zur Testung auf Normalverteilung



3.2.2.2 Testung auf Normalverteilung: Analytische Methodik

Als analytisches Verfahren wurde der Shapiro-Wilk Test zur Testung auf Normalverteilung angewendet. Wie in der nachfolgenden Tabelle farblich unterlegt, konnten beide Subgruppen keine Signifikanz oberhalb der 0,05-Marke nachweisen (siehe Tabelle 28 Analytische Methodik: Tests auf Normalverteilung).

Tabelle 28 Analytische Methodik: Tests auf Normalverteilung

Tests auf Normalverteilung								
	Zuteilung		Kolmogorow-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Negativkontrollen	vs. Proben	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Mittelwert AU	Studienprobe		0,118	132	0,000	0,932	132	0,000
	Negativkontrolle		0,142	38	0,051	0,936	38	0,032

Zusammenfassend konnten weder die grafischen noch die analytischen Methoden eine Normalverteilung in den Subgruppen nachweisen. Demnach wurde die statistische Datenanalyse dieser Dissertation mithilfe von nicht-parametrischen Verfahren durchgeführt.

### 3.2.2.3 Testung auf Log-Normalverteilung

Eine weiterführende Testung auf Log-Normalverteilung wurde ebenfalls durchgeführt, lieferte jedoch keine Ergebnisse, die die nachfolgende Testverfahrenauswahl geändert hätte (es ließ sich kein Zugang zu parametrischen Analyseverfahren erschließen). Details hierzu können dem Anhang im Abschnitt 6.9 Weiterführende Informationen zu der Testung auf Log-Normalverteilung entnommen werden.

## 3.3 Explorative Statistik

Die AU weist als Messniveau eine metrische Skala auf. Dies beruht auf einer sinnvollen Metrik innerhalb der Werteordnung, inklusive eines natürlichen Nullwertes. Dementsprechend ermöglichte sich eine Betrachtung der AU als quantitative Variable.

### 3.3.1 Quantitative Analyse

#### 3.3.1.1 Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-U-Test beruht auf der Bildung von Rängen der abhängigen Variable (AU) und ist dementsprechend verteilungsunabhängig (siehe: Tabelle 29 Rangbildung: Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 29 Rangbildung: Mann-Whitney-U-Test

Ränge				
	Zuteilung Negativkontrollen vs. Proben	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Mittelwert AU	Studienprobe	132	89,97	11876,00
	Negativkontrolle	38	69,97	2659,00
	Gesamt	170		

Wie in Tabelle 30 Mann-Whitney-U-Testergebnis dargestellt, konnte mittels dieser Methode eine asymptotische Signifikanz von 0,027 ermittelt werden. Da beide Subgruppen zusammengenommen mehr als 50 Fälle aufweisen, ist die asymptotische Signifikanz der exakten Signifikanz überlegen (394). Folglich musste bei einer Verwerfungsgrenze von  $\alpha = 0,05$  die Alternativhypothese angenommen werden: Ein Unterschied zwischen der zentralen Tendenz der beiden Gruppen ist anzunehmen.

Tabelle 30 Mann-Whitney-U-Testergebnis

Statistik für Tests	Mittelwert AU
Mann-Whitney-U	1918,000
Wilcoxon-W	2659,000
Z	-2,207
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,027

Nach Anwendung der Formel 4 Effektstärke und Interpretation anhand Tabelle 22 Effektgrenzen nach Cohen (1988) bzw. Cohen (1992) konnte die Effektstärke des vorliegenden Falls als schwach gewertet werden ( $(0,1 \leq r \leq 0,3)$  siehe: Formel 11 Effektstärke des Mann-Whitney-U-Tests bei einer asymptotischen Signifikanz von 0,027 und 2.2.5.7.1 Mann-Whitney-U-Test).

Formel 11 Effektstärke des Mann-Whitney-U-Tests bei einer asymptotischen Signifikanz von 0,027

$$r = \left| \frac{z}{\sqrt{N}} \right| = \left| \frac{-2,206817}{\sqrt{170}} \right| = 0,1692551375793187$$

### 3.3.1.2 Punktbiseriale Korrelation

Die punktbiseriale Korrelation ermittelt für die oben genannten Variablen eine Signifikanz, sprich einen p-Wert, von 0,044 (siehe Tabelle 31 punktbiseriale Korrelation: Vergleich AU und Gruppenzuteilung). Dieser p-Wert liegt unter der Verwerfungsgrenze ( $\alpha = 0,05$ ). Folglich, kann die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angewendet werden (siehe 2.2.5.7.2 Punktbiseriale Korrelation). Das Ergebnis der punktbiserialen Korrelation kann somit als Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Gruppenzuteilung und Werteerhöhung der AU eingeordnet werden.

Tabelle 31 punktbiseriale Korrelation: Vergleich AU und Gruppenzuteilung

#### Korrelationen

		Zuteilung Negativ- kontrollen vs. Proben	Mittelwert AU
Zuteilung Negativkontrollen vs. Proben	Korrelation nach Pearson	1	-0,154
	Signifikanz (2-seitig)		0,044
	N	170	170
Mittelwert AU	Korrelation nach Pearson	-0,154	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,044	
	N	170	170

Der Korrelationskoeffizient  $k$  dieser Methode beträgt in diesem Fall  $k = -0,154$ , ist also negativ. Demnach kann ein negativer linearer Zusammenhang beschrieben werden. D. h. dass mit dem Übergang vom Kollektiv der Studienproben zu dem Kollektiv der Negativkontrollen eine AU-Abnahme erfolgt. Es gilt: Die Zunahme der einen Variable hängt mit der Abnahme der anderen Variable zusammen (die Zuteilung ist wie folgt codiert: 1 = Studienproben, 2 = Negativkontrollen). Wenn ein Gruppenwechsel von der Variable Studienproben zu Negativkontrollen erfolgt (also eine numerische Zunahme von 1 auf 2), dann sinkt folglich die AU (negativer signifikanter Korrelationskoeffizient ( $r = -0,154$  bei  $p < 0,05$ )). Auf das zugrunde liegende Testverfahren projiziert bedeutet dies, dass die optische Signalstärke (als Repräsentation der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung) abnimmt.

Da keine fachspezifischen Effektstärkegrenzen zur Verfügung standen, wurde eine Ermittlung der Effektstärke erneut mittels Tabelle 22 Effektgrenzen nach Cohen (1988) bzw. Cohen (1992) orientierend durchgeführt (siehe Formel 12 Effektstärke der punktbiserialen Korrelation bei einem Korrelationskoeffizienten von ca.  $-0,154$ ). Demnach wird der punktbiserialen Korrelation ein negativer Zusammenhang zwischen AU-Wert und Gruppenzugehörigkeit (Studienproben vs. Negativkontrollen) erhoben, wenngleich bei schwacher Effektstärke ( $r \leq 0,1$ ).

Formel 12 Effektstärke der punktbiserialen Korrelation bei einem Korrelationskoeffizienten von ca.  $-0,154$

$$r = \left| \frac{z}{\sqrt{N}} \right| = \left| \frac{-0,154346}{\sqrt{170}} \right| = -0,0118377978168636$$

### 3.3.1.3 Eta-Koeffizient

Es errechnet sich ein Eta-Koeffizient von ca.  $0,154$  (siehe Tabelle 32 Eta-Koeffizient als Richtungsmaß. Dieser Wert spricht für eine vorhandene, wenn auch geringe Rückschlussmöglichkeit auf den Wert der AU anhand der Gruppenzuteilung.

Tabelle 32 Eta-Koeffizient als Richtungsmaß

Richtungsmaße			Wert
Nominal bezüglich Intervall	Eta	Mittelwert AU abhängig	<b>0,154346</b>
		Zuteilung Negativkontrollen vs. Proben abhängig	1,000

Mittels Quadrierens des Eta-Koeffizienten lässt sich folgende Schlussfolgerung aufstellen: Durch die Gruppenzuteilung lassen sich ca.  $2,34\%$  der Varianz ( $\sigma^2$ ) der metrischen Variable der AU erklären (siehe Formel 13 Quadrierung von Eta). Hier bietet sich ein Hinzuziehen der

Tabelle 25 Lagemaße AU: Negativkontrollen und der Tabelle 26 Lagemaße AU: Studienproben an.

Formel 13 Quadrierung von Eta

$$\text{Eta}^2 = 0,154346^2 = 0,023822687716$$

### 3.3.2 Qualitative Datenanalyse

Die qualitative Datenanalyse wurde parallel zur quantitativen durchgeführt. Beide Ansätze führten zu weitgehend übereinstimmenden Ergebnissen, was die Plausibilität der gesamten Testmethoden unterstreicht.

#### 3.3.2.1 Cut-off definieren

An dieser Stelle sei an die Formel 8 Cut-off aus dem Abschnitt 2.2.5.7.4 Chi-Quadrat verwiesen. Die benötigten Lagemaße sind der Tabelle 25 Lagemaße AU: Negativkontrollen und der

Abbildung 18 Boxplot: Vergleich der AU-Mittelwerte der beiden Subgruppen zu entnehmen. Nach Anwendung der oben genannten Formel ließ sich der Cut-off demnach bei ca. 80,65 berechnen (siehe: Formel 14 Cut-off-Berechnung anhand der Lagemaße der Negativkontrollen).

Formel 14 Cut-off-Berechnung anhand der Lagemaße der Negativkontrollen

$$Co = \bar{x} + 3 * s = 37,572186 + 3 * 14,358997 = 80,649177$$

#### 3.3.2.2 Anwendung des Cut-offs auf die Studienproben

Das nachfolgende Streudiagramm stellt die Mittelwerte der AU-Werte aller Studienproben dar. Zusätzlich ist der errechnete Cut-off von ca. 80,65 als Marke eingezeichnet (siehe: 3.3.2.1 Cut-off definieren). Werte oberhalb des Cut-offs sind im Streudiagramm beschriftet.

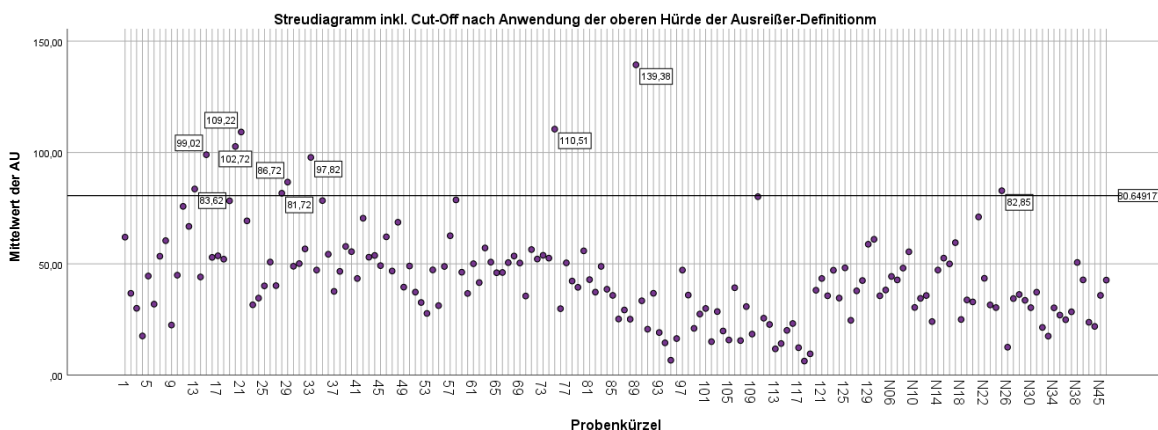


Abbildung 20 Streudiagramm der AU-Mittelwerte mit Cut-off-Markierung

## 3.3.2.3 Chi-Quadrat

Mithilfe dieses Tests wird die Fragestellung behandelt, ob die Unterschiede in den Häufigkeiten „positiver“ bzw. „negativer“ Werte (entsprechend oberhalb oder unterhalb des Cut-offs) stark von den zu erwarteten Werten abweichen oder denen ähneln. Diese Rechnung fußt auf der Bildung einer 2x2-Kreuztabelle (siehe Tabelle 33 Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test).

Tabelle 33 Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test

**Zuteilung Negativkontrollen vs. Proben \* Nominale Variable in Positiv und Negativ Kreuztabelle**

			Nominale Variable in Positiv und Negativ		Gesamt
			negatives Testergebnis (<69,896551)	positives Testergebnis (>69,896551)	
Zuteilung Negativkontrollen vs. Proben	Studienprobe	Anzahl	117	15	132
		Erwartete Anzahl	119,6	12,4	132,0
	Negativkontrolle	Anzahl	37	1	38
		Erwartete Anzahl	34,4	3,6	38,0
Gesamt		Anzahl	154	16	170
		Erwartete Anzahl	154,0	16,0	170,0

Statistisch gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen erwarteter und beobachteter Häufigkeit (siehe: Tabelle 34 Chi-Quadrat-Test). Entsprechend wurde die Nullhypothese beibehalten. Bei einer erwarteten Zählhäufigkeit kleiner fünf wurde der exakte Test nach Fisher herangezogen, wobei die zweiseitige exakte Signifikanz entscheidend ist.

Tabelle 34 Chi-Quadrat-Test

## Chi-Quadrat-Test

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (1- seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,639	1	0,104		
Kontinuitätskorrektur	1,714	1	0,190		
Likelihood-Quotient	3,349	1	0,067		
Exakter Test nach Fisher				0,126	0,087
Zusammenhang linear-mit- linear	2,623	1	0,105		
Anzahl der gültigen Fälle	170				

## 4 Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse im Hinblick auf die in Kapitel 1.3 Zielsetzung dieser Dissertation formulierte Fragestellung analysiert und diskutiert. Im Fokus stand die Frage, ob sich Hinweise auf eine Verbindung zwischen Lipid-bindenden aCL und venösen Thrombosen finden lassen. Entsprechend wurde hypothesengeleitet ein negativer Zusammenhang zwischen einem erhöhten AU-Wert und einer leeren Thromboseanamnese postuliert.

### 4.1 Interpretation und Kontextualisierung der Ergebnisse

Die zentralen Ergebnisse der Arbeit sind in Abbildung 21 Linearer Zusammenhang: Gruppenzugehörigkeit und AU-Wert stark vereinfacht dargestellt. Die Analyse zeigte eine statistisch signifikante, jedoch lediglich schwach ausgeprägte Assoziation zwischen Antikörperbindung und Thromboseanamnese ( $r = -0,154$ ;  $p < 0,05$ ; siehe u. a.: Tabelle 31 punktbiseriale Korrelation: Vergleich AU und Gruppenzuteilung). Damit bleibt die Effektstärke hinter den in der zentralen Hypothese formulierten Erwartungen zurück.

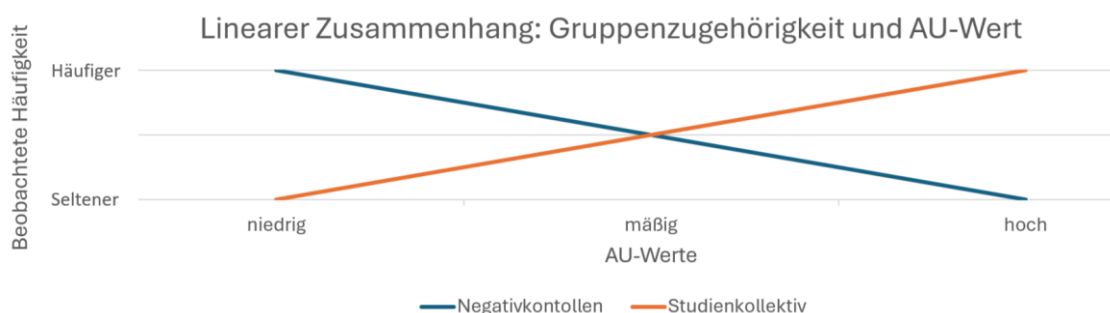


Abbildung 21 Linearer Zusammenhang: Gruppenzugehörigkeit und AU-Wert

Diese Diskrepanz zwischen theoretischer Erwartung und empirischem Befund bildet den Ausgangspunkt der folgenden Diskussion. Grundsätzlich lassen sich zwei Erklärungsrichtungen unterscheiden. Einerseits methodische Ursachen: Die schwache Assoziation könnte auf technische Limitationen des Versuchsdesigns zurückzuführen sein. Andererseits inhaltliche bzw. hypothesenbezogene Ursachen: Die Hypothese selbst könnte in Teilen nicht zutreffen. Dies würde bedeuten, dass Lipid-bindende aCL möglicherweise nicht in dem vermuteten Maße zur Thromboseentstehung beitragen oder dass weitere, bislang nicht berücksichtigte Einflussfaktoren eine größere Rolle spielen.

Vor diesem Hintergrund werden die folgenden Unterkapitel systematisch beide Blickwinkel beleuchten: Zunächst methodische Aspekte mit möglichem Optimierungspotenzial, anschließend inhaltliche Argumente für oder gegen die Hypothese. Ziel ist es, auf dieser Grundlage zu einer differenzierten Bewertung zu gelangen. Sei es im Sinne einer Verwerfung der Hypothese oder einer begründeten Empfehlung für weiterführende Untersuchungen.

## 4.2 Studieninterne Methodenkritik und Limitierung des Versuchsaufbaus

Die Interpretation der Ergebnisse erfordert eine kritische Betrachtung der Methodik, insbesondere des eingesetzten Cardioliplin-ELISAs Typ *home made*, der Probenauswahl und der Datenerhebung. Im Folgenden werden zentrale methodische Limitationen aufgeführt.

### 4.2.1 Ausschluss sog. Kofaktoren als konzeptionelle Limitation

Für den Nachweis Lipid-bindender aCL stehen weder kommerziell verfügbare Assays noch publizierte Protokolle zur Verfügung. Daher war die Entwicklung eines eigenen Testsystems erforderlich. Der hier eingesetzte Cardioliplin-ELISA Typ *home made* stellt eine Methode dar, Lipid-bindende aPL gezielt zu detektieren. Im Gegensatz zu etablierten Routinetests, die vollständiges Patient\*innenserum einsetzen und dadurch  $\beta$ 2GPI als Kofaktor in das System einbringen, basiert dieser Ansatz bewusst auf der isolierten Immunglobulinfraktion. Der gezielte Ausschluss von  $\beta$ 2GPI ermöglicht eine präzisere Analyse Lipid-bindender aCL, markiert jedoch zugleich eine konzeptionelle Limitation, da die Vergleichbarkeit mit Standardassays eingeschränkt bleibt.

### 4.2.2 Technische Limitationen

Cardioliplin ist chemisch instabil und anfällig für Oxidation sowie thermischen Zerfall. Die Eigenbeschichtung der Platten kann zu intra- und interassaybedingter Variabilität führen. Zur Optimierung der Vergleichbarkeit wurde der monoklonale aCL als Standard verwendet (siehe 2.2.1.3 Auswahl des Standards). Eine standardisierte Reproduzierbarkeit ist darüber hinaus nur eingeschränkt gewährleistet.

### 4.2.3 Interferenzen und unspezifische Bindungen

Zur Kontrolle des Hintergrundsignals wurden pro Platte zwei sog. *Blanks* mitgeführt. Spezifitätskontrollen im engeren Sinne (bspw. Isotypkontrollen, kompetitive ELISAs oder sog. *No-Coating*-Kontrollen) erfolgten nicht. Unspezifische Bindungen, etwa durch polyreaktive IgG, können somit nicht ausgeschlossen werden. Zur allgemeinen Reduktion unspezifischer Bindungen wurde eine Standard-*Blocking*-Lösung (PBS) eingesetzt.

### 4.2.4 Validierung und Vergleichbarkeit mit bestehenden Testsystemen

Ein direkter Vergleich des Studienmaterials mit kommerziellen Standardtests wurde nicht durchgeführt. Alle Proben wiesen zuvor im Routinelabor der UM in einem CLIA-basierten Verfahren der Firma *Werfen* einen positiven aPL-Titer auf. Die fehlende Vergleichbarkeit ist relativierbar, da bislang kein anerkannter Goldstandard für die APS-Diagnostik existiert (siehe vertiefend dazu: 4.3 Systemische Grenzen aktueller aPL-Testsysteme). Sämtliche verfügbaren Assays für aCL enthalten  $\beta$ 2GPI und binden deshalb sowohl aCL als auch  $\beta$ 2GPI

(siehe 1.2.7.4 Effekt von Hinzugabe bzw. Ausschluss von sog. Kofaktoren auf den aCL-ELISA).

#### 4.2.5 Limitationen der Probenselektion

Die Gruppenbildung erfolgte anhand klar definierter Ein- und Ausschlusskriterien (siehe Methoden und Anhang). Ein gewisser subjektiver Entscheidungsspielraum bleibt jedoch möglich. Zudem könnten therapiebedingte Einflüsse, individuelle Faktoren oder Komorbiditäten die Messergebnisse beeinflusst haben. Eine stratifizierte Auswertung nach demografischen oder klinischen Variablen erfolgte nicht, könnte jedoch Gegenstand zukünftiger Analysen sein.

### 4.3 Systemische Grenzen aktueller aPL-Testsysteme

Die in Kapitel 4.2 dargestellten methodischen Limitationen beziehen sich primär auf das in dieser Arbeit eingesetzte Testverfahren. Über die studieninternen Aspekte hinaus zeigen jedoch auch etablierte kommerzielle ELISA-Systeme vergleichbare Schwächen. Diese betreffen insbesondere Reproduzierbarkeit, Kalibrierung und Schwellenwertdefinitionen und verdeutlichen, dass die diagnostischen Herausforderungen systemischer Natur sind. Im Folgenden werden diese Grenzen der aktuellen Nachweisverfahren skizziert.

#### 4.3.1 Variabilität zwischen Laboratorien und Testsystemen

Etablierte ELISA-Systeme zur aPL-Diagnostik weisen eine hohe interlaborative Variabilität auf (97, 402-406). Vergleichsstudien und Ringversuche zeigen, dass identische Proben in verschiedenen Laboren zu stark abweichenden Titern führen können (siehe 6.10 Weiterführende Informationen zu den systemischen Grenzen aktueller aPL-Testsysteme). Diese mangelnde Standardisierung limitiert die Vergleichbarkeit von Studien und erschwert die klinische Interpretation.

#### 4.3.2 Kalibrierungsproblematik

Einen international anerkannten Referenzstandard oder einen Goldstandard für die aCL-Testung existiert bislang nicht. Die verfügbaren Kalibrierungsansätze (bspw. Harris- oder Koike-Standards) sind jeweils mit methodischen Einschränkungen behaftet und bilden die polyklonale Vielfalt der Antikörperreaktionen im APS nur unzureichend ab. Details zu diesen Standards und ihren Grenzen sind im Anhang dargestellt (siehe 6.10 Weiterführende Informationen zu den systemischen Grenzen aktueller aPL-Testsysteme).

#### 4.3.3 Schwellenwerte und diagnostische Risiken

Die aktuellen ACR/EULAR-Kriterien setzen feste Schwellenwerte für aPL-Titer. Diese Einteilung beruht jedoch überwiegend auf Untersuchungen mit einzelnen Assay-Systemen

und ist nicht methodenübergreifend validiert. Angesichts der hohen Variabilität und fehlenden Standardisierung besteht die Gefahr von Fehleinschätzungen. Alternative Ansätze wie lokal definierte Referenzbereiche oder Perzentil-basierte Cut-offs erscheinen theoretisch geeigneter, sind jedoch praktisch schwer umzusetzen (siehe 6.10 Weiterführende Informationen zu den systemischen Grenzen aktueller aPL-Testsysteme).

#### 4.3.4 Zwischenfazit

Die diagnostischen Schwächen etablierter ELISA-Verfahren sind systemischer Natur und nicht auf die vorliegende Arbeit beschränkt. Die fehlende Standardisierung betrifft vor allem die quantitative Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Studien. Vor diesem Hintergrund sind die hier erhobenen Befunde im Kontext dieser methodischen Unsicherheiten zu interpretieren.

### 4.4 Hypothetisches optimales Nachweisverfahren Lipid-bindender aCL

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wie ein diagnostisches Verfahren gestaltet sein müsste, das Lipid-bindende aCL zuverlässig und unabhängig von  $\beta$ 2GPI erfasst. Das folgende Kapitel diskutiert mögliche Merkmale eines hypothetischen, optimalen Nachweissystems, das über die methodischen Grenzen etablierter ELISA-Formate hinausgeht.

Ein optimales Nachweisverfahren müsste zwingend den Einfluss von  $\beta$ 2GPI eliminieren, um sicherzustellen, dass gemessene Antikörperaktivität tatsächlich auf Lipid-bindende aCL und nicht auf a $\beta$ 2GPI zurückzuführen ist (siehe 1.2.7.4 Effekt von Hinzugabe bzw. Ausschluss von sog. Kofaktoren auf den aCL-ELISA).

Eine Möglichkeit bestünde darin, die Immunglobuline vollständig über Protein-A- oder Protein-G-Affinitätssäulen aufzureinigen. Dieses Vorgehen würde garantieren, dass kein  $\beta$ 2GPI aus dem Serum in den Test gelangt und im Eluat ausschließlich Antikörper vorliegen. Damit ließe sich die Unterscheidung zwischen Lipid-bindenden aCL und  $\beta$ 2GPI-abhängigen Antikörpern experimentell eindeutig realisieren. Aufgrund des erheblichen zeitlichen und finanziellen Aufwands ist dieses Verfahren für die Routinediagnostik jedoch kaum geeignet.

Für den klinischen Alltag erscheint daher ein automatisiertes, CLIA-basiertes Verfahren realistischer. Ein denkbares zweistufiges Format könnte folgendermaßen aussehen:

1. Präanalytische Separation: Entfernung von  $\beta$ 2GPI und a $\beta$ 2GPI-Komplexen, bspw. durch Immunadsorption an eine mit immobilisierten anti- $\beta$ 2GPI-Fab beschichtete Festphase mit magnetischer Trennung. Verwendung eines Verdünnungspuffers ohne Serumzusätze (zum konsequenten Ausschluss von  $\beta$ 2GPI aus dem Testverfahren).

2. Analytische Messung: Detektion der verbleibenden Lipid-bindenden aCL gegen Cardiolipin in einem standardisierten CLIA-System

Auf diese Weise wäre eine gezielte Erfassung Lipid-bindender aCL möglich, ohne dass die Messergebnisse durch  $\beta$ 2GPI oder  $\alpha\beta$ 2GPI beeinflusst werden.

#### 4.5 Hypothesenprüfung: Pathogenes Potenzial Lipid-bindender aCL

Mit der Analyse der studieninternen Limitationen sowie der generellen Schwächen aktueller Nachweisverfahren (Kapitel 4.2 bis 4.4) ist der methodische Erklärungspfad abgeschlossen. Im Folgenden richtet sich der Fokus auf inhaltliche bzw. hypothesenbezogene Ursachen: Die Frage, ob Lipid-bindende aCL unabhängig von methodischen Einschränkungen ein pathophysiologisch relevantes Potenzial im beobachteten Studienkollektiv besitzen.

##### 4.5.1 Empirische Grundlage und erste Hinweise

Die geringe Effektstärke erlaubt keine individualdiagnostische Trennschärfe. Gleichwohl zeigt der  $\beta$ 2GPI-freie Cardiolipin-ELISA eine messbare Antikörperbindung und widerspricht damit der strikten, in Primärquellen von McNeil und Galli et al. postulierten Kofaktorabhängigkeit. Das spricht für das Vorliegen einer Lipid-bindenden aCL-Subpopulation im Thrombosekollektiv, deren pathophysiologische Relevanz nicht ausgeschlossen werden kann. Insofern wird die Hypothese nicht widerlegt, sondern auf einen kontextabhängigen Mechanismus mit geringer Effektgröße eingegrenzt.

##### 4.5.2 Biologische Plausibilität

Die biologische Plausibilität einer Beteiligung Lipid-bindender aCL am Pathomechanismus des APS ist durch zahlreiche experimentelle Befunde hinreichend belegt (siehe 1.2.8 Pathophysiologie). Insbesondere in autoimmunologischen Prozessen wirken Antikörper selten isoliert, sondern entfalten ihre Effekte im Zusammenspiel mit weiteren humoralen oder zellulären Signalwegen. Auch eine schwache, aber kontinuierliche Antigenbindung kann in diesem Kontext mechanistisch relevant sein, etwa durch additive oder kumulative Effekte. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Antikörperaktivität ist daher trotz geringer Effektstärke konsistent mit den bestehenden pathophysiologischen Konzepten.

##### 4.5.3 Pathogenetische Relevanz oder Epiphänomen

Die in Kapitel 4.5.2 dargestellten Befunde und Vorarbeiten belegen eindeutig, dass Lipid-bindende aCL grundsätzlich pathophysiologisch wirksam sein können. Offen bleibt jedoch die Frage, ob die in dieser Arbeit gemessene Antikörperaktivität im Studienkollektiv tatsächlich einen kausalen Beitrag zur Thromboseentstehung leistet oder ob sie lediglich ein Epiphänomen einer unspezifischen Immunaktivierung ist.

Ein zentrales Argument ergibt sich aus der Lues. Patient\*innen mit Syphilis weisen häufig hohe Titer Lipid-bindender aCL auf, zeigen jedoch kein generell erhöhtes Risiko für venöse Thrombosen. Dies könnte als Hinweis darauf verstanden werden, dass aCL in diesem Kontext primär epiphänomenal auftreten, etwa als Begleitreaktion systemischer Inflammation oder infektiöser Komorbidität.

Gleichzeitig wirft die Neurosyphilis neue Fragen auf: Klinisch treten hier Manifestationen wie progressive Paralyse (mit motorischen und psychiatrischen Symptomen), Tabes dorsalis (degenerative Ausfälle des Rückenmarks) oder apoplexähnliche (Hemi-)Paresen auf. Angesichts des experimentell nachgewiesenen thromboembolischen Potenzials Lipid-bindender aCL stellt sich die Frage, ob diese neurologischen Symptome (zumindest teilweise) nicht doch Folge thrombotischer Ereignisse im ZNS oder der Mikrozirkulation sind.

Damit zeigt das Beispiel der Neurosyphilis exemplarisch die Schwierigkeit der Abgrenzung: aCL können sowohl epiphänomenal als auch pathogenetisch relevant sein. Die genaue Gewichtung bleibt kontextabhängig und erfordert weitere Studien.

#### 4.5.4 Kausalanalyse nach Bradford-Hill

Die Bradford-Hill-Kriterien bieten ein etabliertes Instrument, um den Übergang von einer beobachteten Assoziation zu einer kausalen Interpretation zu prüfen. Für das untersuchte Kollektiv lassen sich einzelne Aspekte anführen, insbesondere die biologische Plausibilität sowie eine gewisse Kohärenz mit publizierten Daten.

Demgegenüber bleiben zentrale Kriterien unzureichend erfüllt: Die Effektstärke ist gering, eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ist nicht nachweisbar, und das Fall-Kontroll-basierte Studiendesign erlaubt keine Prüfung von Temporalität oder Interventionswirkungen (siehe 6.11 Weiterführende Informationen zu der Kausalanalyse nach Bradford-Hill).

Zusammenfassend bleibt die kausale Deutung Lipid-bindender aCL für behandlungsbedürftige Thrombosen im Studienkollektiv spekulativ. Die Bradford-Hill-Kriterien liefern jedoch einen nützlichen Rahmen, um die Hypothese im Kontext der vorliegenden Daten einzuordnen. Die Ergebnisse dieser Dissertation können daher als explorativer Hinweis auf ein potenziell relevantes Teilphänomen gewertet werden, das in künftigen, methodisch stringenteren Studien gezielt adressiert werden sollte.

#### 4.5.5 Zwischenfazit

Die in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse zeigen, dass Lipid-bindende aCL zwar nachweisbar sind und experimentell ein plausibles pathogenetisches Potenzial besitzen, ihre Rolle im untersuchten Kollektiv jedoch nicht eindeutig kausal belegt werden kann. Die geringe

Effektstärke spricht gegen eine individualdiagnostische Verwertbarkeit, widerspricht aber zugleich dem Konzept einer strikten Kofaktorabhängigkeit.

Damit entsteht ein ambivalentes Bild: Während die biologische Plausibilität und Vorarbeiten eine Beteiligung nahelegen, bleiben alternative Erklärungen wie epiphänomenale Antikörperaktivität oder kontextabhängige Mechanismen möglich. Die vorliegenden Befunde lassen sich daher als explorativer Hinweis werten, der eine differenzierte Fortführung der Hypothesenprüfung erfordert.

## **4.6 Mögliche Implikation für Klinik, Forschung und Therapie**

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass Lipid-bindende aCL eine bislang unzureichend differenzierte Subgruppe im Rahmen des APS darstellen. Die geringe Effektstärke verhindert zwar eine unmittelbare diagnostische Umsetzung, verdeutlicht jedoch die Notwendigkeit einer methodisch präziseren Erfassung.

### **4.6.1 Klinische Relevanz und diagnostische Konsequenzen**

Ein zentrales Problem der etablierten Assays besteht darin, dass Lipid-bindende aCL zwar regelmäßig miterfasst werden, ihre Signale jedoch nicht von  $\alpha\beta 2\text{GPI}$  unterschieden werden können, da  $\beta 2\text{GPI}$  in serumbasierten Testsystemen vorhanden ist. Dadurch bleibt letztlich unklar, welche Antikörper eine Assoziation mit den klinischen Manifestationen des APS zeigen. Für eine gezielte Identifikation Lipid-bindender aCL ist daher ein konsequenter Ausschluss von Serum und damit von  $\beta 2\text{GPI}$  erforderlich (siehe 1.2.7.4 Effekt von Hinzugabe bzw. Ausschluss von sog. Kofaktoren auf den aCL-ELISA und 4.4 Hypothetisches optimales Nachweisverfahren Lipid-bindender aCL).

### **4.6.2 Forschungsbedarf**

Die Befunde unterstreichen die Notwendigkeit, größere Kohorten einzubeziehen, standardisierte, kofaktorunabhängige Testsysteme zu entwickeln und die Ergebnisse in multizentrischen Vergleichen zu validieren. Ergänzend sollten im experimentellen Bereich funktionelle Testansätze geprüft werden, um die biologische Relevanz besser einzuordnen.

### **4.6.3 Therapeutische Perspektiven**

Dass Lipid-bindende aCL zur Thromboseentstehung beitragen, konnte gezeigt werden. Unklar bleibt jedoch, welchen quantitativen Beitrag sie im klinischen Gesamtkontext im Rahmen des APS leisten. Zur Klärung wären prospektive Langzeitkohorten erforderlich, deren Durchführung jedoch spezifische Assays und erhebliche zeitliche Ressourcen voraussetzt.

## 4.7 Fazit der Diskussion

Die in Kapitel 1.3 Zielsetzung dieser Dissertation formulierte Fragestellung zielte darauf ab, ob Lipid-bindende aCL im untersuchten Kollektiv mit venösen Thrombosen assoziiert sind und damit eine pathogenetische Relevanz nahelegen. Die Analyse ergab zwar eine signifikante, aber nur schwach ausgeprägte Assoziation. Damit blieb die Effektstärke hinter den Erwartungen der Hypothese zurück. Für diese Diskrepanz kommen zwei Erklärungspfade in Betracht: methodische Limitationen des Nachweisverfahrens oder inhaltliche Schwächen der Hypothese.

Methodisch beeinflussen sowohl studieninterne Faktoren (Eigenbeschichtung, fehlende Spezifitätskontrollen, begrenzte Kohortengröße) als auch systemische Schwächen etablierter Assays (Interlabor-Variabilität, Kalibrierung, Schwellenwerte) die Aussagekraft. Ein optimales Verfahren müsste  $\beta$ 2GPI konsequent ausschließen, um Lipid-bindende aCL von  $\alpha\beta$ 2GPI sicher zu unterscheiden. Denkbar sind bspw. Protein-A-basierte Ig-Aufreinigungen oder zweistufige CLIA-Ansätze mit präanalytischer Separation von  $\beta$ 2GPI und  $\alpha\beta$ 2GPI.

Inhaltlich ist die Beteiligung Lipid-bindender aCL am Pathomechanismus des APS durch experimentelle Befunde gut gestützt (siehe 1.2.8 Pathophysiologie). Unklar bleibt jedoch, ob die in diesem Kollektiv gemessene Aktivität kausal zur Thromboseentstehung beitrug oder epiphänomenal im Rahmen unspezifischer Immunaktivierung auftrat. Eine Bewertung nach den Bradford-Hill-Kriterien stützt die Plausibilität, macht jedoch deutlich, dass zentrale Kriterien wie Effektstärke, Dosis-Wirkungs-Beziehung und Temporarität nicht erfüllt sind. Eine kausale Einordnung der Befunde im untersuchten Kollektiv bleibt daher spekulativ.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse explorative Assoziationen Lipid-bindender aCL mit venösen Thrombosen, belegen jedoch keine kausale Beteiligung im untersuchten Kollektiv. Die zugrunde liegende Hypothese dieser Arbeit basiert auf *in vitro* und *in vivo* (Mausmodellbefunde) die eine pathogene Wirkung dieser Antikörper nahelegen. Ob sich diese Beobachtungen auf den Menschen übertragen lassen, bleibt offen. Voraussetzung hierfür wäre eine konsistente Assoziation mit klinischen Manifestationen des APS. Um den Stellenwert Lipid-bindender aCL im Krankheitsgeschehen zu klären, sind prospektive Studien mit standardisierten, kofaktorunabhängigen Assays erforderlich.

## 5 Zusammenfassung

Das APS ist durch thromboembolische Ereignisse und Schwangerschaftskomplikationen bei persistierendem aPL-Profil charakterisiert. aPL gelten als zentrale pathophysiologische Faktoren, ihre Heterogenität erschwert jedoch die differenzierte Bewertung. Innerhalb dieser Gruppe sind Lipid-bindende aCL experimentell als pathophysiologisch wirksam beschrieben (siehe 1.2.8 Pathophysiologie). Dennoch spielen sie im klinischen Verständnis des APS bislang eine untergeordnete Rolle, da die Diskussion traditionell stark von der Annahme einer sog. Kofaktorabhängigkeit ( $\beta$ 2GPI) geprägt ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Assoziation Lipid-bindender aCL mit venösen Thrombosen in einem definierten Patient\*innenkollektiv zu prüfen und ihre mögliche Relevanz im Kontext des APS kritisch zu bewerten. Hierfür wurden Antikörperfraktionen mittels Proteinfällung isoliert und in einem eigens entwickelten,  $\beta$ 2GPI-freien Cardiolipin-ELISA Typ *home made* untersucht. Die Standardisierung der Testbedingungen erlaubte einen quantitativen Vergleich der Antikörperaktivität zwischen Patient\*innen mit venöser Thrombose und gesunden Kontrollpersonen.

Die Untersuchung zeigte eine signifikante, jedoch schwache Assoziation zwischen erhöhter Reaktivität Lipid-bindender aCL und dem Vorliegen venöser Thrombosen. Damit wurden die in der Zielsetzung formulierten Erwartungen nicht vollständig bestätigt.

Zur Erklärung dieser Befunde wurden zwei Argumentationspfade verfolgt. Erstens methodische Ursachen: Studieneigene Limitationen wie Eigenbeschichtung, fehlende Spezifitätskontrollen und begrenzte Kohortengröße sowie systemische Schwächen etablierter ELISAs (Interlabor-Variabilität, fehlende Standardisierung, vordefinierte Schwellenwerte) schränken die Aussagekraft ein. Ein optimales Nachweisverfahren müsste  $\beta$ 2GPI konsequent ausschließen, etwa durch präanalytische Separation (Immunadsorption, serumfreie Puffer), um Lipid-bindende aCL zuverlässig von  $\beta$ 2GPI zu unterscheiden.

Zweitens inhaltliche Ursachen: Experimentelle Studien belegen die biologische Plausibilität einer Beteiligung Lipid-bindender aCL am Pathomechanismus des APS. Auch die hier nachgewiesene Antikörperaktivität ist damit vereinbar, wenngleich offenbleibt, ob sie im untersuchten Kollektiv kausal an der Thromboseentstehung beteiligt war oder lediglich epiphänomenal auftrat. Exemplarisch zeigt die Neurosyphilis, dass aCL sowohl epiphänomenal als auch pathogenetisch wirksam sein können, abhängig vom klinischen Kontext. Eine Bewertung anhand der Bradford-Hill-Kriterien stützt die Plausibilität prinzipiell.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit explorative Hinweise darauf, dass Lipid-bindende aCL eine pathogenetisch relevante Rolle innerhalb des APS spielen könnten. Eine Kausaldeutung für das untersuchte Kollektiv bleibt jedoch spekulativ. Der Nachweis einer schwachen, aber

signifikanten Assoziation deutet auf ein mögliches pathogenetisches Potenzial hin, das in der bisherigen Forschung unterschätzt wurde. Entscheidend ist die Entwicklung und Anwendung methodisch stringenter, standardisierter und insbesondere kofaktorunabhängiger Assays, um die Rolle Lipid-bindender aCL zuverlässig zu bestimmen. Zukünftige (prospektive) Studien sollten prüfen, in welchem Ausmaß Lipid-bindende aCL das Risiko thrombotischer Ereignisse beeinflussen und ob sie als eigenständige Zielgröße in Diagnostik und Therapie des APS etabliert werden können.

## 6 Anhang

### 6.1 Weiterführende Informationen zu dem immunologischen Gedächtnis

Das immunologische Gedächtnis beruht auf einer Affinitätsreifung, die während der primären Immunantwort in Reaktion auf die Oberflächenstrukturen des Pathogens stattfindet. Daraus entstehen spezifische Antikörper, die durch sog. Gedächtnisplasmazellen sezerniert werden und bei erneutem Antigenkontakt die Vorlaufzeit des adaptiven Immunsystems minimieren. Neben den Gedächtnisplasmazellen besteht das immunologische Gedächtnis aus B- und T-Lymphozyten. Letztere werden als reaktives Immungedächtnis bezeichnet, während die Produktion der pathogenspezifischen Antikörper die protektive Immunität darstellt (10, 407). Bei der Initiierung einer Immunantwort sind außerdem die APCs von großer Bedeutung. Hierzu zählen u. a. die dendritischen Zellen, die Makrophagen, die Granulozyten und die B-Lymphozyten. An dieser Stelle wird erneut die enge Zusammenarbeit zwischen Komponenten des angeborenen und des adaptiven Immunsystems deutlich, da dendritische Zellen zu beiden Systemen gezählt werden. APCs sind sowohl für gedächtnisbasierte Immunantworten als auch für den primären Kontakt mit einem Pathogen von immenser Wichtigkeit.

Im experimentellen Setting werden bspw. B1a-Zellen zur Beobachtung des zellbasierten immunologischen Gedächtnisses verwendet. B1a-Zellen sind langlebige *Cluster of differentiation* (CD) 5-positive antikörperproduzierende B-Zellen, die u. a. in Mäusen zu finden sind und vornehmlich T-Zell unabhängig aktiviert werden können (408-411).

### 6.2 Weiterführende Informationen zu Autoimmunität

Besonders GABHS sind während der akuten Infektionsphase mit einem breiten Spektrum klinischer Manifestationen assoziiert. Das Spektrum reicht von milden Halsschmerzen bis hin zum Streptokokken-induzierten toxischen Schock-Syndrom (STSS) oder der nekrotisierenden Fasziiitis.

Ebenso vielfältig ist jedoch das Spektrum der immunologisch relevanten Post-Streptokokken-Erkrankungen. An dieser Stelle seien folgende Krankheitsbilder beispielhaft aufgelistet: Akutes rheumatisches Fieber (ARF), (Rapid progressive) Glomerulonephritis (RPGN), (poststreptokokken-) reaktive Arthritis (PSRA), Thrombozytopenie, hämolytische Anämie, IgA-assoziierte Vaskulitis, Uveitis, Psoriasis guttata, Erythema nodosum

### 6.3 Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie des serologischen Antikörpernachweises bei APS

#### 6.3.1 Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie der aCL

Vor mehr als 110 Jahren gelang es Wassermann et al., den ersten serologischen Test zur Syphilis-Diagnostik zu entwickeln, die sog. Wassermann-(Neisser-Bruck-)Reaktion (40). Auffällig war, dass die Antikörper von Syphilis-Patient\*innen, bei denen die Wassermann-Reaktion positiv ausfiel, mit Extrakten aus nichtkontagiösen Rinderherzen reagierten. Dies deutete darauf hin, dass die Antikörper nicht nur gegen *Treponema pallidum*, den Erreger der Syphilis, sondern auch gegen ein Antigen der Rinderherzen gerichtet waren. Über 30 Jahre später, im Jahre 1941, gelang es Mary Pangborn, das für diese Reaktion verantwortliche Antigen zu isolieren (22, 41, 42). In Anlehnung an die oben erwähnten Rinderherzen wurde der Name Cardiolipin vergeben (aus dem griech. *Kardía* für Herz). Cardiolipin ist ein Diphosphatidylglycerin, welches ausschließlich in der Membran von Bakterien und Mitochondrien vorkommt.

#### 6.3.2 Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie des LA

Paradoxa von Patient\*innen, die in der Labordiagnostik eine mäßige Thrombozytopenie und eine verlängerte Vollblutgerinnungszeit aufwiesen, sich jedoch klinisch mit (mitunter letalen) thrombotischen Ereignissen vorstellten, führten zu weiterer Forschung (22). Erste Erklärungsansätze basierten auf einer Hypoprothrombinämie, die *in vitro* eine verlängerte aPTT provozierte (22, 412, 413). Diese Befundkonstellation konnte bei einigen SLE-Patient\*innen nachgewiesen werden, die zusätzlich falsch-positive Ergebnisse in der oben genannten Wassermann-Reaktion (BFP) aufwiesen. Dieser Pathomechanismus wurde 1952 erstmals als „*circulating anticoagulant*“ beschrieben (44, 414).

1972 wurde der Begriff „Lupus-Antikoagulant“ (LA) durch Feinstein und Rapaport geprägt (22, 47). Man erkannte, dass es sich bei diesem „*circulating anticoagulant*“ um die Immunglobuline (Ig) G- bzw. IgM handelte, die Phospholipide binden und so mit dem Starterreagenz der aPTT interferieren, was die Veränderung der Testergebnisse erklärte. Diese Erkenntnis wurde zunächst als diagnostischer Hinweis genutzt. So wies eine verlängerte aPTT, die sich nicht durch Hinzugabe normalen Plasmas korrigieren ließen, auf eine mögliche LA-Präsenz in der Probe hin. Zur Bestätigung wurde ursprünglich der sog. *Tissue Thromboplastin Inhibiting Test* (TTI) durchgeführt (45, 46). Bei Vorliegen von LA in der Probe fällt der TTI typischerweise negativ aus (415, 416). Dieser Test ist allerdings störanfällig, bspw. können falsch-positive Ergebnisse auftreten, wenn gleichzeitig Antikörper gegen Faktor-VII oder Faktor-IX vorliegen oder bei (Vor-) Medikation mit Heparin (417). Aus diesem Grund wurde eine modifizierte,

verdünnte (engl. *dilute*) Form des *Russel's viper venom time Test*, der sog. dRTVVT, etabliert, um LA nachzuweisen (418, 419).

Thiagarajan et al. untersuchten das Serum eines Patienten mit IgM-Plasmozytom und hohem LA-Titer und zeigten, dass die aufgereinigte IgM-Fraktion dieses Patienten in der Lage war, *in vitro* als Antikoagulans zu wirken. Sie beobachteten, dass dieser Mechanismus nur in Präsenz eines anionischen Phospholipids ablief (420), was eine Verbindung zu dem 1941 entdeckten Cardiolipin und zu den Patient\*innen mit BFP Wassermann-Test-Ergebnissen herstellte. LA war zunächst nur in Assoziation mit SLE bekannt (siehe Namensgebung), bis ein positiver LA-Titer auch unabhängig von einem SLE beschrieben wurde (47, 421-423).

### 6.3.3 Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie der a $\beta$ 2GPI

Wie in Absatz 6.3.1 Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie der aCL beschrieben, ging man ursprünglich davon aus, dass alle aPL direkt an anionische Phospholipide binden können. Als McNeil et al. jedoch affinitätsaufgereinigte aPL im ELISA mit Cardiolipin interagieren ließen, konnte keine signifikante Bindung nachgewiesen werden. Erst nachdem das Testverfahren um die Zugabe von Serum bzw. Plasma von Proband\*innen (bzw. Rindern) erweitert wurde, ließ sich eine messbare Antikörper-Antigen-Wechselwirkung nachweisen. Daraufhin schloss man, dass aCL auf das Vorhandensein von Plasmaproteinen als Kofaktoren angewiesen seien, um Cardiolipin binden zu können (48). Mittels Sequenzanalyse wurde zunächst  $\beta$ 2-Glycoprotein I ( $\beta$ 2GPI, auch Apolipoprotein H (apo-H) genannt) als interaktionsfähiger Kofaktor ermittelt (48). In dem Kapitel 1.2.7 Sog. Kofaktorabhängigkeit: Mögliche Mechanismen und deren Evidenz wird diese Thematik genauer diskutiert.

Im Mausmodell konnten aufgereinigte a $\beta$ 2GPI nach Injektion u. a. mit einer erhöhten Thrombusbildung und einer vermehrten Neigung zu fetaler Resorption in Verbindung gebracht werden (49, 50, 424-428).

## 6.4 Weiterführende Informationen zur historischen Begründung des Konzepts der sog. Kofaktorabhängigkeit von aCL

Galli et al. wählten Cardiolipin- bzw. Phosphatidylserin-haltige Liposome als Antigen der festen Phase in ihrem Versuchsaufbau (50). Weil 1987 davon ausgegangen wurde, dass die Spezifität der aPL für negativ geladene Phospholipide im Allgemeinen und nicht für Cardiolipin im Besonderen bestünde (68), verwendeten auch McNeil et al. Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol bzw. Cardiolipin als Antigen ihrer festen Phase (48, 429). Anschließend wurde die feste Phase mit affinitätsaufgereinigtem Serum von insgesamt vier verschiedenen Patient\*innen inkubiert. Als sog. *blocking solution* (engl.: Löslicher Oberflächenblocker) wurde

bei McNeil et al. ein Milchpulver-Gelatine-Gemisch verwendet (48). Galli et al. verwendeten Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin* (BSA)) (50). Beide Arbeitsgruppen konnten unter diesen Bedingungen keine signifikante Bindung der affinitätsaufgereinigten aPL an mit Cardiolipin beschichteten ELISA-Platten nachweisen (siehe 6.3.3 Weiterführende Informationen zu der Forschungshistorie der a $\beta$ 2GPI). Erst die Hinzugabe von Humanserum (bzw. Rinderserum) führten zu einer Bindung der aPL an die stationäre Phase. Fraktionierung des Serums führte schließlich zur Identifizierung von  $\beta$ 2GPI als „Kofaktor“, der die Bindung von aCL an die Festphase ermöglichte (siehe: 1.2.5.1.3 Anti- $\beta$ 2GPI). Wie in 1.2.7.1 Hintergrund der sog. Kofaktorabhängigkeit erläutert, konnte für diese Theorie bislang kein biochemischer Mechanismus gefunden werden.

In der Affinitätsaufreinigung fiel die Wahl des (spezifischen) Liganden bei McNeil et al. zunächst auf Phosphatidylserin-Cholesterol (430, 431). Später wurde Cardiolipin als Ligand in den Gelen verwendet (48). Beide verwendeten Moleküle zählen zu der Gruppe der anionischen Phospholipide und enthalten negativ geladene Sauerstoffionen. Ebenso verwendete Galli et al. Cardiolipin, Phosphatidylserin und Cholesterol als Liganden (50). Im Unterschied zu McNeil et al. wurde im Anschluss eine IgG-Purifikation mittels Protein A-Säulen angestrebt. Dieser Versuchsaufbau orientierte sich an der Arbeit von Pengo et al. aus dem Jahre 1987 (432).

Im nächsten Schritt wurde das zu untersuchende Serum auf die Säule aufgetragen. Die mögliche Beeinflussung durch  $\beta$ 2GPI wird in Abbildung 6 mögliche Kontaminationsquelle im Rahmen der Affinitätsaufreinigung dargestellt. Der verwendete Ligand (z. B. Cardiolipin oder Phosphatidylserin) bietet grundsätzlich nur lipidbindenden aPL eine Interaktionsmöglichkeit. Unter diesen Bedingungen könnten somit ausschließlich lipidbindende, sog. kofaktorunabhängige aCL aufgereinigt werden (vgl. blaue Antikörper-Figur in Abbildung 6 mögliche Kontaminationsquelle im Rahmen der Affinitätsaufreinigung).

Die typische Serumkonzentration von gelöstem  $\beta$ 2GPI liegt bei 0,2 mg/ml (433-435). Demnach wurde dem Versuchsaufbau von Galli et al. und McNeil et al. bei Hinzugabe von Humanserum (bzw. Rinderserum) dieser sog. „Kofaktor“ zwangsläufig beigefügt (siehe Abschnitt A in Abbildung 6 mögliche Kontaminationsquelle im Rahmen der Affinitätsaufreinigung).  $\beta$ 2GPI ist ein anionisches, phospholipidbindendes Serumprotein und somit in der Lage, mit dem Liganden der Affinitätschromatographiesäule zu wechselwirken (siehe Abschnitt B in Abbildung 6). Gleichzeitig ist  $\beta$ 2GPI selbst der (namensgebende) Ligand für a $\beta$ 2GPI (siehe Abschnitt C in Abbildung 6). Anstelle einer Aufreinigung von Antikörpern, die spezifisch die Phospholipide binden, wechselwirken somit zwei weitere Proteine mit der Affinitätschromatographiesäule (siehe Abschnitt C in Abbildung 6). Auch  $\beta$ 2GPI und a $\beta$ 2GPI verweilen demnach während des Waschvorgangs in der Säule:  $\beta$ 2GPI bindet direkt an den Liganden, a $\beta$ 2GPI bindet den

Liganden indirekt über das gebundene  $\beta$ 2GPI. Nach Vollendung des Versuchsaufbaus befinden sich in dem Eluat folglich nicht (wie angenommen) lediglich die aCL, sondern zusätzlich  $\beta$ 2GPI und a $\beta$ 2GPI (siehe Abschnitt D in Abbildung 6). Um die Brücke zu den Primärquellen zu schlagen sei an dieser Stelle erwähnt, dass auch McNeil et al. in ihrem Eluat den sog. Kofaktor  $\beta$ 2GPI mittels SDS-PAGE-Verfahren nachweisen konnten ((48) siehe Abbildung 7 Eluat-Analyse, Bildquelle: McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl A).

## 6.5 Weiterführende Informationen zu $\beta$ 2GPI

Auf hämostaseologischer Ebene wird dem  $\beta$ 2GPI u. a. eine hemmende Funktion bei der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation zugeschrieben (436). Die Wechselwirkungen von  $\beta$ 2GPI und dem Gerinnungssystem scheinen jedoch komplexerer Natur zu sein, da Forschungsergebnisse sowohl auf eine gerinnungshemmende Wirkung (einschließlich einer thrombozytenaggregationshemmenden Wirkung), als auch von einer gerinnungsfördernden Wirkung (bspw. in Wechselwirkung mit LA) hinweisen.

Die zweite wichtige Säule der aktuell angenommenen Funktion von  $\beta$ 2GPI ist seine Wechselwirkung mit dem Komplementsystem. Auch hier muss betont werden, dass weder das Ausmaß der Interaktion noch der Mechanismus vollständig verstanden oder nachgewiesen sind. Bspw. wird eine mögliche Assoziation mit der Hemmung von Kofaktoren und der Neutralisierung von Lipopolysacchariden (LPS) genannt (81, 437-439).

Zusammenfassend bleibt vor dem Hintergrund des fehlenden klinischen Phänotyps bei  $\beta$ 2GPI-Defizienz unklar, inwieweit die *in vitro* beobachteten Eigenschaften von  $\beta$ 2GPI auf die tatsächliche physiologische Bedeutung übertragen werden können.

## 6.6 Weiterführende Informationen zu der PAR-2-Signalvermittlung

Bei Abwesenheit von EPCR nimmt PAR-2 vornehmlich proinflammatorische Funktionen ein. Diese sind insbesondere NF- $\kappa$ B- bzw. IL-8 vermittelt und resultieren u. a. auf der bevorzugten Kopplung von PAR-2 an G $\alpha$ q-Proteine (440, 441). Sobald EPCR in die PAR-2 Signalkaskade involviert ist, kommt es zu einem sog. *Biased Signaling* sowie einer Veränderung der Signalendstrecke hin zu vorwiegend antiapoptotischen Effekten (sog. *Shiften des Outputs*). Diese Effekte werden vereinfacht in der Tabelle 35 EPCR-vermittelte Modulation der PAR-2-Aktivität zusammengefasst.

Tabelle 35 EPCR-vermittelte Modulation der PAR-2-Aktivität

Mechanismus:	Komplexbildung:	Effekt:	Signalverlauf:	Quelle
Veränderte Rezeptorkonfiguration, sog. "Biased Signaling"	EPCR-TF-VIIa-PAR2 o. EPCR-Xa-PAR2	Proteolyse v. PAR2 an alternativer Stelle, führt zu einem sog. "tethered ligand", führt u. a. zu einer stärkeren $\beta$ -Arrestin-Aktivierung	VEGF, IL-8; zytotoxisch u. angiogen	(182, 184)
Veränderte G-Protein-Kopplung (Shiften des Outputs)	EPCR-TF-VIIa-PAR2	Dominanz v. $\beta$ -Arrestin-abhängigen Wegen, z. B. Aktivierung v. PI3K/Akt	u. a. antiapoptische Effekte	(442, 443)

## 6.7 Weiterführende Informationen zur Auswahl des Probenmaterials

Nachfolgend sollen weitere Aspekte den im Abschnitt 2.2.1 Studienvorbereitung zugrunde liegenden Studien aufgeführt werden. Insbesondere soll die Zielsetzung der jeweiligen Studien, die Proband\*innenauswahl und die Gewinnung von Biomaterialien beleuchtet werden.

### 6.7.1 Weiterführende Informationen zur Auswahl der Negativkontrollen

Primäres Ziel der GHS-Studie ist v. a. die Risikovorhersage für diverse Erkrankungen zu verbessern. Hierbei handelt es sich in erster Linie um Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, aber auch um onkologische, ophthalmologische, metabolische, immunologische und psychiatrische Krankheiten.

Die Autor\*innen beschreiben das Vorgehen der Rekrutierung folgendermaßen (Direktzitat):

„Die Zufallsstichprobe wurde 1:1 für Geschlecht stratifiziert, 1:1 für den Wohnort (städtischer und ländlicher Bereich) sowie zu gleichen Teilen für die vier Altersdekaden. Während der Rekrutierungsphase der Studie wurden repräsentative Teilstichproben mit denselben Stratifikationskriterien wie die Stichprobe aus den Einwohnermeldeämtern in Wellen aus der Stichprobe gezogen. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, um ein standardisiertes und vergleichbares Rekrutierungsverfahren über die gesamte Rekrutierungsperiode sicherzustellen und Zwischenauswertungen, die im Studienprotokoll a priori definiert wurden, zu ermöglichen.“ ((385) Abschnitt „Studienpopulation“).

Biomaterialien wurden im Rahmen des sog. *Biobankings* unmittelbar nach der Entnahme zur Einlagerung vorbereitet. Die Einlagerung von Serum erfolgte standardisiert, halbautomatisiert unter Verwendung von Lagerungstemperaturen von bis zu  $-80^{\circ}\text{C}$  (385).

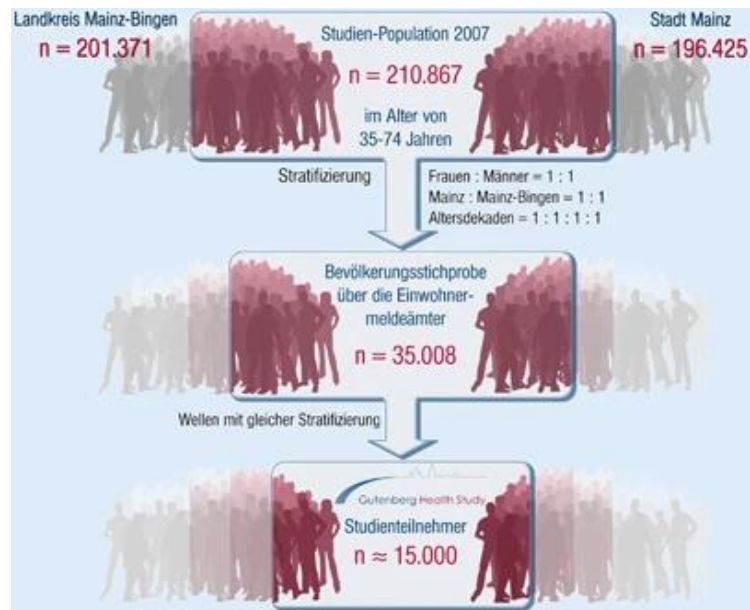


Abbildung 22 Stichprobengenerierung der GHS, Bildquelle: Wild PS, Zeller T, Beutel M, Blettner M, Dugi KA, Lackner KJ, et al. [The Gutenberg Health Study]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2012;55(6-7):824-9.

### 6.7.2 Weiterführende Informationen zur Auswahl der Studienproben: GMP-VTE-Studie

Die GMP-VTE-Studie befasst sich in erster Linie mit der Identifizierung und Evaluation neuer und etablierter Marker bei thromboembolischen Erkrankungen und deren Folgeerkrankungen. Jene Marker können sowohl genetisch als auch biochemisch sein (387).

Das Studienkollektiv wurde aus den bestehenden Kollektiven zweier zuvor durchgeführten Studien gewonnen, einerseits dem sog. VTEval- (444) und andererseits dem sog. FOCUS BioSeq-Projekt (*Biochemical and Genetic Biomarkers in Sequelae of Acute Pulmonary Embolism Study* (387, 445, 446)). Beide Studien wiesen ein prospektives, beobachtendes Kohortenstudien-Design mit umfassendem *Biobanking* auf.

#### 6.7.2.1 VTEval-Projekt

Das VTEval-Projekt ist eine prospektive Kohortenstudie zur Optimierung von Diagnostik, Therapie und Verlaufsbeurteilung der VTE (447, 448). Die Hauptziele des Projektes lassen sich in drei zentrale Bereiche unterteilen: Erstens, die systematische Evaluierung und Bewertung klinischer Behandlungsstrategien bei Patient\*innen mit VTE-Erkrankungen. Zweitens die Optimierung der Risikostratifizierung bei V.a. auf eine VTE. Und drittens die langfristige Förderung der patient\*innenorientierten Forschung im Bereich der VTE (444). Es wurden drei Kohorten gebildet: Patient\*innen mit Verdacht auf Lungenarterienembolie LAE, Patient\*innen mit Verdacht auf TVT sowie Patientinnen mit zufällig entdeckter VTE. Die Einteilung erfolgte durch die Prüfärzt\*innen. Der Beobachtungszeitraum betrug etwa fünf Jahre (444). Der Studienablauf ist schematisch dargestellt in Abbildung 23 VTEval Projektablauf. Bildquelle: Frank B et al. Rationale and design of three observational, prospective cohort

studies including biobanking to evaluate and improve diagnostics, management strategies and risk stratification in venous thromboembolism *BMJ Open*. 2015;5(7):e008157. Abbildung 23

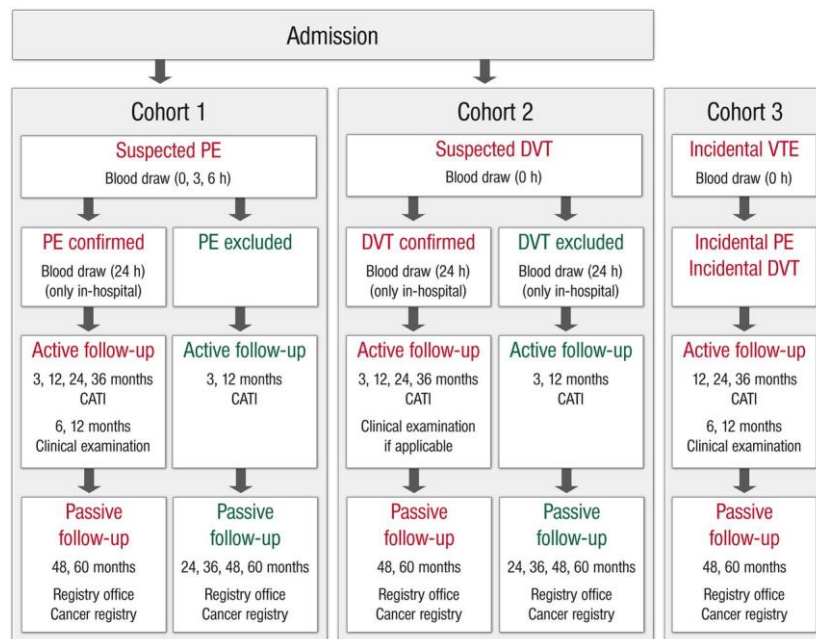


Abbildung 23 VTEval Projektablauf. Bildquelle: Frank B et al. Rationale and design of three observational, prospective cohort studies including biobanking to evaluate and improve diagnostics, management strategies and risk stratification in venous thromboembolism *BMJ Open*. 2015;5(7):e008157.

#### 6.7.2.2 FOCUS-Studie und FOCUS-BioSeq-Projekt

Die sog. FOCUS-Studie (*Follow-Up after Acute Pulmonary Embolism*) stellt eine prospektive, multizentrische, nicht-interventionelle Kohortenstudie dar (449, 450). Im Mittelpunkt steht die Untersuchung der Inzidenz und Prädiktoren von Lungenfunktionsstörungen sowie der chronischen thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) nach akuter LAE, etwa infolge einer unvollständigen Thrombusauflösung (445, 451).

Das FOCUS BioSeq-Projekt ist eine Substudie der FOCUS-Studie (451). Ziel ist der Aufbau einer zentralen Biobank zur Identifizierung und Bewertung biochemischer und genetischer Marker der akuten LAE und ihrer Spätfolgen. Damit soll die Inzidenz sowie der Krankheitsverlauf nach akuter Lungenembolie besser charakterisiert werden (445, 452).

### 6.8 Gebrauchsanweisung des verwendeten Qubit™-Kits

Wie in 2.2.3 Konzentrationsbestimmung mittels Qubit™ Protein BR Assay Kit wurde das Protokoll des Kits angewendet, es erfolgten keinerlei Abänderungen. Nachfolgend wurde die englischsprachige Version des Protokolls eingepflegt (*Qubit™ Protein BR Assay Kit User Guide* (453)).

## Qubit™ Protein BR Assay Kit

Catalog Numbers A50668 and A50669

Pub. No. MAN0024790 Rev. B.0

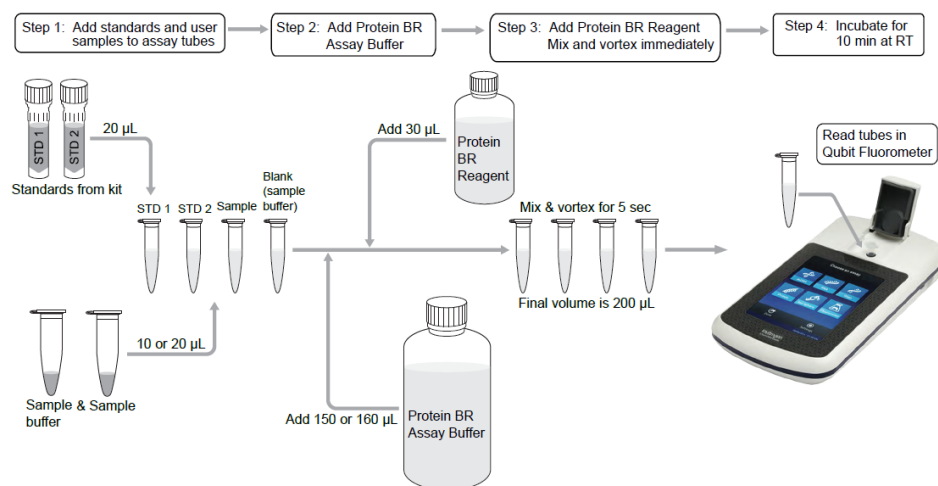


**WARNING!** Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

### Product description

The Invitrogen™ Qubit™ Protein BR Assay Kit provides a quick and accurate method to quantitate protein samples over a broad range of concentrations on the Qubit™ 4 Fluorometer. The kit includes Protein BR Assay Reagent, Protein BR Assay Buffer, Standard 1 (0 mg/mL BSA) and Standard 2 (10 mg/mL BSA). The assay is accurate for sample concentrations from 100 µg/mL to 20 mg/mL. The assay is performed at room temperature in an easy mix-and-read format that may be read within 10 minutes and up to 1 hour after addition. The assay is compatible with common contaminants found in protein preparations (see Table 1). For test samples containing low protein concentrations (<100 µg/mL), we recommend the Qubit™ Protein Assay Kit (Cat. No. Q33211).

The Qubit™ Protein BR Assay is based on the reaction between the labeling reagent and the primary amines found in proteins (N-terminus and ε amines in lysines). This reaction can be affected by protein samples chemically modified through their primary amines. Substances including NHS- and sNHS-biotin, dye conjugates, and TMT labeling reagents are incompatible with the assay, while amine-containing buffers, such as Tris, are typically compatible (see Table 1) for sample preparation.



### Contents and storage

Materials	Quantity		Contents	Storage
	Cat. No. A50668 (100 assays)	Cat. No. A50669 (500 assays)		
Standard 1 (0 mg/mL BSA)	5 mL	5 mL	0.9% NaCl with 0.05% sodium azide	15–30°C
Standard 2 (10 mg/mL BSA)	5 mL	5 mL	10 mg/mL Bovine Serum Albumin (BSA) in 0.9% NaCl with 0.05% sodium azide	
Qubit™ Protein BR Assay Buffer	20 mL	100 mL	Buffered solution	
Qubit™ Protein BR Assay Reagent	3 mL	5 × 3 mL	Labeling reagent in acetonitrile	

### Materials required but not provided

- Thin-wall, clear, 0.5-mL PCR tubes or Qubit™ assay tubes (500 tubes, Cat. No. Q32856)
- Qubit™ 4 Fluorometer

### Important protocol information

Incubation Time	To allow the Qubit™ Protein BR Assay to reach optimal fluorescence, incubate the tubes for a minimum of 10 minutes after mixing the sample or the standard with the Qubit™ Protein BR Assay Reagent.
Assay Reagent	After the incubation period, the fluorescent signal is stable for 1 hour at room temperature.
Sample Volume	The Qubit™ Protein BR Assay is designed to use 10 µL or 20 µL samples. For best results, use the largest volume possible.
Qubit™ 4 Fluorometer Calibration	For each Qubit™ assay, you can run a new calibration or use the values obtained with the previous calibration. When using the instrument for the first time, perform a new calibration each time. As you become familiar with the assays, the instrument, and your pipetting accuracy, you can then determine if a new calibration is required with each use. It is recommended that a Sample Blank be run whenever a new sample type or sample buffer is being measured.
<b>Note:</b> This assay is only compatible with the Qubit™ 4 Fluorometer.	

## Protocol

### Prepare standards and samples

This protocol includes preparation of standards for calibrating the Qubit™ 4 Fluorometer.

1. Label the required number of 0.5-mL tubes for standards, buffer blanks, and samples. The Qubit™ Protein BR Assay requires two standards and one Sample Buffer blank. The option is available to read multiple replicates of Standard 2 to improve assay reproducibility. If desired, prepare additional tubes of Standard 2. The calibration will use the average relative fluorescence units (RFU) for the Standard 2 reads.  
**Note:** Do not label the side of the tube as this could interfere with the sample read. Label the lid of each standard tube correctly. Calibration of the Qubit™ 4 Fluorometer requires the standards and Sample Buffer blank to be inserted into the instrument in the order specified by the instrument software.
2. Prepare standards by adding 20 µL of each Qubit standard (Standard 1 and Standard 2) and 150 µL of Qubit™ Protein BR Assay Buffer to the appropriate tubes. Pipette up and down to mix.
3. Prepare samples by adding 10 µL or 20 µL of each protein sample to your sample tubes. Bring the total volume to 170 µL by adding 150 µL or 160 µL of Qubit™ Protein BR Assay Buffer to the appropriate tubes. Pipette up and down to mix.
4. Prepare the Sample Buffer Blank by adding 10 µL or 20 µL of buffer (same used to store your samples) into the appropriate tube. The volume used (10 µL or 20 µL) should match the volume used to prepare your samples. Bring the total volume to 170 µL by adding 150 µL or 160 µL of Qubit™ Protein BR Assay Buffer. Pipette up and down to mix.
5. Add 30 µL of Qubit™ Protein BR Assay Reagent to the sample tubes, standards, and Sample Buffer Blank, then mix immediately using pipetting and vortexing for 5–7 seconds. The final volume in each tube should be 200 µL.  
**Note:** Upon addition of the Qubit™ Protein BR Assay Reagent, the solution may turn slightly cloudy. After pipetting and vortex mixing, the solution will become clear with a slight yellow color. The yellow color is not indicative of the amount of protein in the sample. The fluorescent protein reagent will quickly hydrolyze to a non-fluorescent product when no amines are present.
6. Allow all tubes to incubate at room temperature for 10 minutes.

### Read standards and samples

1. On the home screen of the Qubit™ 4 Fluorometer, press **Protein** then press **Protein Broad Range**. The **Read standards** screen is displayed. Press **Read standard** to proceed.  
**Note:** If you have already performed a calibration for the selected assay, the instrument prompts you to choose between reading new standards and running samples using the previous calibration. If you want to use the previous calibration, skip to step 5 below.
2. Insert the tube containing Standard 1 into the sample chamber, close the lid, then press **Read standard**. When the reading is complete (~3 seconds), remove Standard 1.
3. Insert the tube containing Standard 2 into the sample chamber, close the lid, then press **Read standard**. When the reading is complete, remove Standard 2. The option is available to read multiple tube replicates of Standard 2.
4. After all Standard 2 reads are complete, press **Run samples**.
5. On the assay screen, select sample volume and units:
  1. Press the + or – buttons on the wheel to select sample volume added to the assay tube (10 µL or 20 µL).
  2. From the drop-down menu, select the units (**µg/mL**, **mg/mL**) for the output sample concentration.
6. Insert the tube containing the Sample Buffer Blank into the sample chamber, close the lid, then press **Read tube**.
7. Insert sample tube into the sample chamber, close the lid, then press **Read tube**. When the reading is complete (~3 seconds), remove the sample tube. The instrument displays the results on the assay screen. The value displayed is the concentration of the sample.
8. Repeat step 7 until all samples have been read.

### Interfering substances

- Certain substances are known to interfere with the Qubit™ Protein BR Assay. Substances containing primary amines, including glycine, ethanolamine, and other free amino acids may interfere. Refer to Table 1 for a list of interfering substances.
- Substances that increase the viscosity of the sample, such as high concentrations of glycerol and sucrose, may interfere with the reagent mixing. The ability to mix in a timely manner is important for measurement consistency.
- Using the sample blank addresses many of the known incompatibilities by adjusting the standard curve based on the background signal of the sample buffer. Sample buffer response which is >5-fold higher than observed fluorescent response of Standard #1 is indicative of a substance that is reacting with the Qubit™ Protein BR Assay Reagent. Background interference from Tris-containing buffers (e.g., Tris-buffered saline (TBS)), along with many other substances, is effectively eliminated by using the appropriate sample blank.

### Additional assay considerations

- It is possible to have a substance-additive effect. We recommend validating the compatibility of your specific sample buffer components.
- For the most accurate concentration determination, prepare multiple dilutions of the sample, such as 4X (10 µL + 30 µL deionized water) and 8X (10 µL + 70 µL deionized water), and then take the average concentration from all of the obtained measurements. Consider the dilution factor used when calculating the final concentration of the sample.
- This assay is not suitable for antibody concentration. We recommend the Pierce™ BCA Protein Assay (Cat. No. 23225) or absorbance measurement at 280 nm.

## 6.9 Weiterführende Informationen zu der Testung auf Log-Normalverteilung

Zur genaueren Untersuchung der Kenngröße der AU wurde nach dem Ausschluss einer Normalverteilung die Testung auf Log-Normalverteilung durchgeführt. Hier lässt sich in der Subgruppe der Studienproben weder mittels grafischer noch mittels analytischer Verfahren ein statistisch signifikanter Nachweis einer Log-Normalverteilung ablesen. Die Negativkontrollen weisen hingegen im Q-Q-Diagramm und im Shapiro-Wilk-Test Hinweise auf eine Log-Normalverteilung vor (siehe: Abbildung 24 Histogramm Mittelwert Log-AU beider Subgruppen, Abbildung 25 Boxplot Mittelwert Log-AU beider Subgruppen, Tabelle 36 (trendbereinigte) Q-

Q-Diagramme zur Testung auf Log-Normalverteilung und Tabelle 37 analytische Tests auf Log-Normalverteilung).

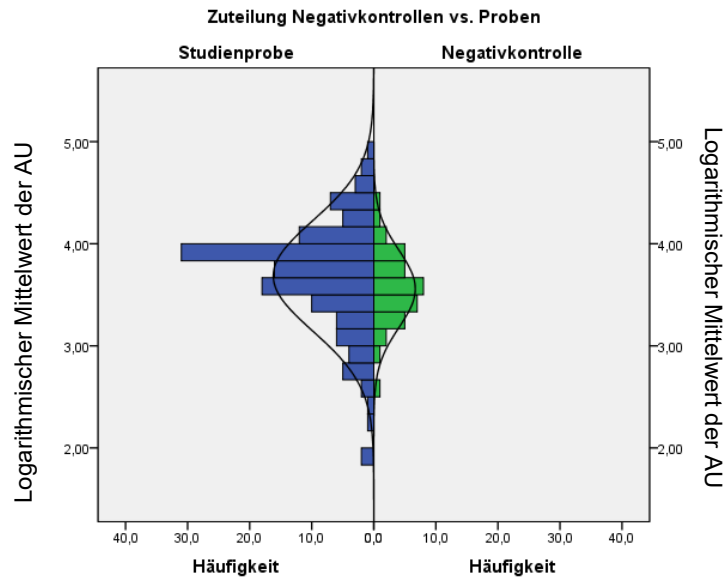


Abbildung 24 Histogramm Mittelwert Log-AU beider Subgruppen

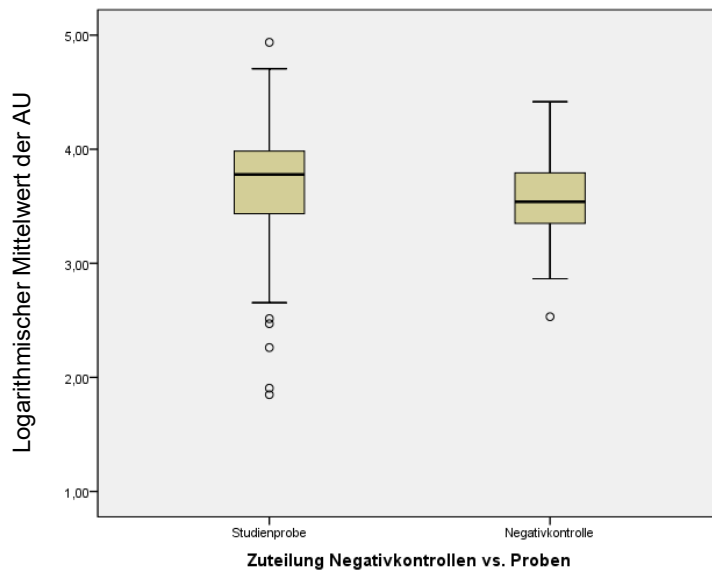


Abbildung 25 Boxplot Mittelwert Log-AU beider Subgruppen

Tabelle 36 (trendbereinigte) Q-Q-Diagramme zur Testung auf Log-Normalverteilung

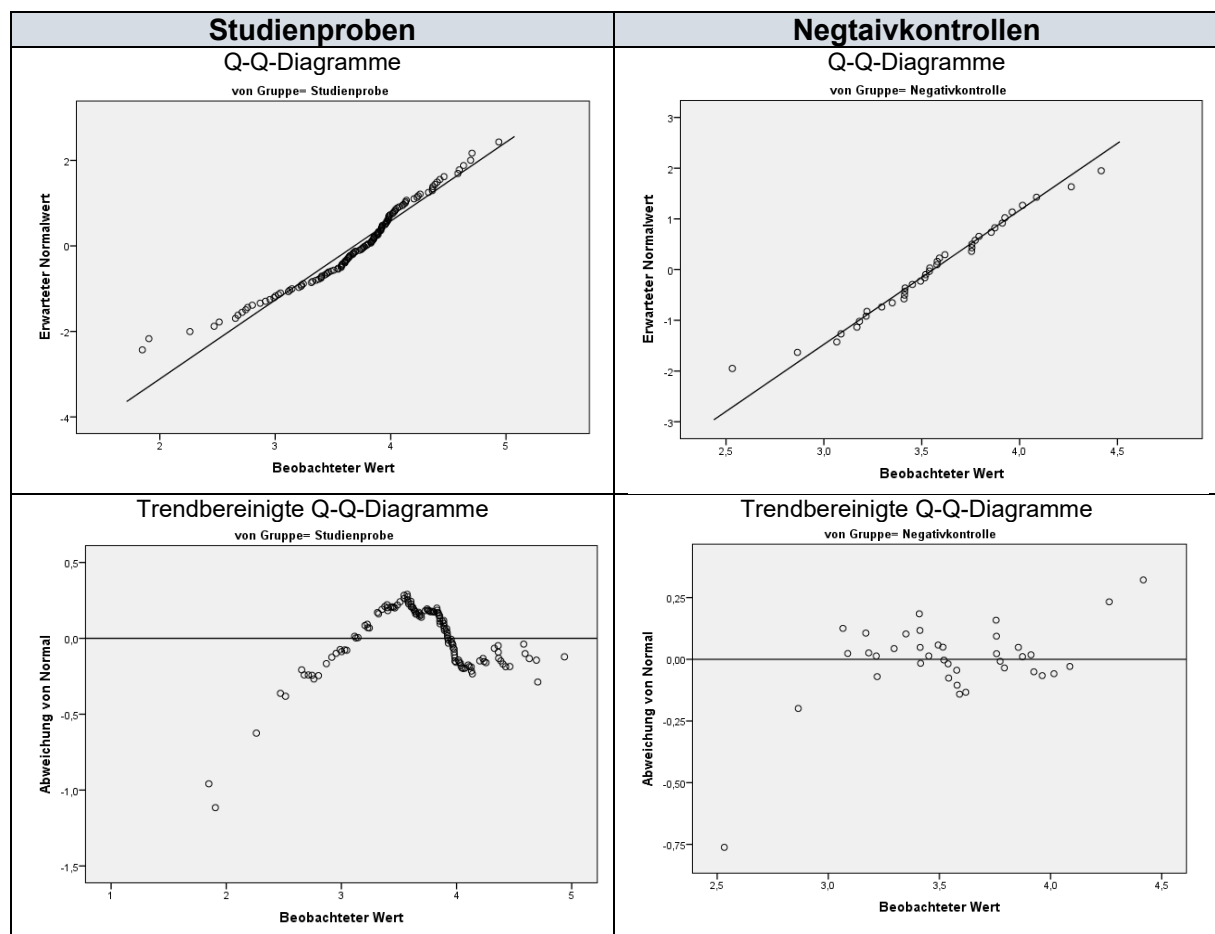


Tabelle 37 analytische Tests auf Log-Normalverteilung

Tests auf Lognormalverteilung

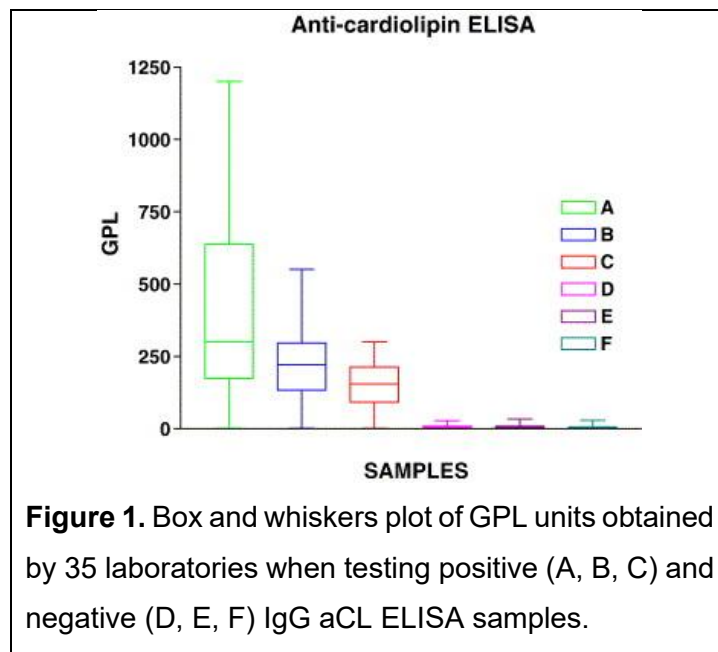
	Zuteilung Negativkontrollen Proben vs.	Kolmogorow-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Logarithmischer Mittelwert AU	Studienprobe	0,113	132	0,000	0,956	132	0,000
	Negativkontrolle	0,084	38	0,200	0,988	38	0,958

Da diese Ergebniskonstellation beider Subgruppen keinen Zugang zu weiteren (nicht-)parametrischen statistischen Analyseverfahren bot, wurde der Testung auf Log-Normalverteilung keine weitere Relevanz zugeschrieben.

### 6.10 Weiterführende Informationen zu den systemischen Grenzen aktueller aPL-Testsysteme

Pengo et al. sendete 2007 gefriergetrocknete Proben mit hoch positiven aCL- und aβ2GPI-Titern an mehrere Laboratorien mit der Bitte, diese Titer mit ihren eigenen lokalen Methoden zu verifizieren. Die Vergleichbarkeit sollte hier durch die Verwendung der Einheit *IgG Phospholipid Unit* (GPL) für IgG aCL geschaffen werden. Die drei verdünnten Proben mit

positiven Titern wiesen in den externen Untersuchungen einen Variationskoeffizienten von 53 %, 59 % und 79 % auf. Diese Spannweite bestätigte sich auch noch, nachdem die Analyse auf Zentren beschränkt wurde, die dasselbe kommerzielle Test-Kit verwendeten. Die Ergebnisse des aCL-Studienarmes werden in der nachfolgenden Abbildung zusammengefasst: Abbildung 26 Interlaborative Variabilität von aCL-ELISAs; Bildquelle: Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res.* 2007;120(1):127-33.



**Figure 1.** Box and whiskers plot of GPL units obtained by 35 laboratories when testing positive (A, B, C) and negative (D, E, F) IgG aCL ELISA samples.

Abbildung 26 Interlaborative Variabilität von aCL-ELISAs; Bildquelle: Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res.* 2007;120(1):127-33.

Ebenso konnte Huisman et al. 2023 in einer Auswertung mehrerer von der ECAT- (*external quality control of diagnostic assays and tests (with focus on thrombosis and hemostasis)*) Foundation durchgeführten EQAs (*external quality assessments*) eine ähnliche Ergebnisspannweite der aCL-Titer feststellen. Der Vergleich identischer Proben zwischen verschiedenen Laboratorien, die denselben ELISA-Assay verwendeten, zeigte teils erhebliche Abweichungen in den Messergebnissen. Es ist denkbar, dass ein in einem Laboratorium negativ getestetes Serum in einem anderen möglicherweise als hochpositiv bewertet wird (97), siehe Abbildung 27 EQAs Auswertung aCL-ELISA-Kits der ECAT-Foundation; Bildquelle: Huisman A, Urbanus RT, Meijer P. Antiphospholipid antibody solid phase-based assays: problems and proposed solutions for the 2023 ACR/EULAR classification criteria for antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2024;22(3):874-6.)). Die in dieser Abbildung verwendete Abkürzung CV steht für *coefficient of variation*.

Anticardiolipin IgG																			
		ELISA												Automated platforms					
		Euroimmun			Orgentec (Alegria)			Orgentec (ELISA)			Werfen Inova Quanta lite			IL ACUstar/INOVA Quanta flash			Thermo Scientific Elia		
Survey	Sample	U/mL (GPL)												CU/mL			U/mL		
		Mean	CV	Range	Mean	CV	Range	Mean	CV	Range	Mean	CV	Range	Mean	CV	Range	Mean	CV	Range
2022-L1	LA ratio ~ 2.0	46.2	18.5	26.0-58.2	44.2	-	38.2-58.4	41.4	38.4	8.2-91.6	30.8	16.5	18.4-41.0	174.7	11.5	34.8-936.5	26.5	15.5	12.7-35.0
2022-L2	LA ratio ~ 1.9	27.0	-	14.0-52.7	14.3	24.9	9.9-57.5	14.7	33.6	7.4-22.6	20.4	27.1	11.0-27.2	32.3	11.8	22.2-42.3	5.1	13.2	3.2-6.4
2022-L3	LA ratio ~ 1.4	6.1	42.5	0.8-12.9	10.0	28.5	5.4-13.5	14.0	37.3	7.3-24.8	9.0	-	0.0-18.0	72.6	10.2	6.9-103.8	10.4	11.5	6.6-13.0
2022-L4	LA ratio ~ 1.7	9.3	23.0	6.5-13.0	19.7	35.3	9.0-28.7	25.2	18.9	12.4-45.4	13.2	23.9	9.8-18.5	121.2	11.1	97.7-145.0	19.7	10.3	16.0-26.0
2023-L1	LA ratio ~ 1.7	10.3	24.4	7.0-38.2	17.4	31.4	11.7-24.8	13.4	20.7	9.6-22.0	10.6	15.0	7.1-14.6	61.2	11.6	43.9-253.8	6.5	15.4	4.0-9.6
2023-L2	LA ratio ~ 1.4	4.1	17.7	3.0-5.0	5.1	28.7	3.8-7.9	5.0	25.8	2.8-6.6	4.8	-	0.0-25.0	20.2	11.2	5.9-24.0	2.3	13.8	1.4-3.3
2023-L3	LA ratio ~ 2.2	14.3	51.0	1.2-27.0	18.7	21.6	14.8-32.6	14.4	22.2	9.9-32.7	12.5	19.8	9.0-18.9	70.9	10.4	56.8-85.6	6.8	14.8	1.4-9.9

Abbildung 27 EQAs Auswertung aCL-ELISA-Kits der ECAT-Foundation; Bildquelle: Huisman A, Urbanus RT, Meijer P. Antiphospholipid antibody solid phase-based assays: problems and proposed solutions for the 2023 ACR/EULAR classification criteria for antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2024;22(3):874-6.

In dem Zusammenhang der systemischen Limitierung soll vertiefend auf die Kalibrierungsproblematik der aPL-Festphasensysteme vom ELISA-Typ eingegangen werden. Bereits in den 1980er Jahren wurde deutlich, dass eine Standardisierung der aCL-Messung problematisch war. Harris et al. entwickelten die ersten sog. Harris-Standards (auch Louisville-Standards genannt (454-456)). Später wurden chimäre monoklonale Antikörper von Koike et al. (sog. Sapporo- bzw. Koike-Standards) entwickelt (457, 458). Der sog. Harris-Standard dient als Referenz zur Testkalibrierung von vielen kommerziellen aCL-ELISA-Kits. Die Koike-Standards sollen hingegen eher als stabile primäre Referenz dienen, insbesondere für Langzeitvergleiche.

Beide Ansätze bergen Schwachstellen: Die Harris-Standards weisen eine teils hohe Chargenvariabilität vor und die Limitierung der Koike-Standards auf ein spezifisches Antikörperprofil bildet die Reaktivitätsvielfalt polyklonaler Antikörper von APS-Patient\*innen nicht ab.

Die aktualisierten ACR/EULAR-Empfehlungen definieren feste Schwellenwerte zur Beurteilung der aPL-Titer. Es wird in moderate und erhöhte Positivität unterschieden (40-79 Units  $\triangleq$  moderat positiv;  $\geq 80$  Units  $\triangleq$  hoch positiv, diese Units werden mithilfe der GPL-Einheit wiederum basierend auf den Harris-Standards, definiert).

Diese Definition der festen Schwellenwerte soll Vergleichbarkeit schaffen, wirft jedoch methodische Fragen auf. Die zugrunde liegende Literaturrecherche dieser Empfehlung basiert überwiegend auf Studien, die lediglich einen einzigen kommerziellen ELISA-Assay auf automatisierten Plattformsystemen untersuchten (17, 93, 97). Ein Vergleich mit anderen gängigen ELISA-Systemen erfolgte nicht.

Diese Einschränkung wird besonders relevant im Lichte der bereits thematisierten interlaborativen Variabilität und Kalibrierungsproblematik (siehe 4.3.1 und 4.3.2). Die Festlegung einheitlicher Grenzwerte setzt voraus, dass Ergebnisse unterschiedlicher

Festphasen-Systeme methodenübergreifend vergleichbar sind, was nach aktueller Evidenz jedoch nicht gegeben ist. Darüber hinaus stützt die Literatur die semiquantitative Klassifizierung in moderate bzw. hohe Titerbereiche nicht ausreichend (97, 459). Derartige Schwellenwerte könnten bei fehlender Standardisierung zu Fehleinschätzungen führen.

Als potenziell zielführender gelten daher alternative Modelle, wie sie u. a. von der ISTH empfohlen werden (460). Diese beinhalten die Etablierung lokaler Referenzbereiche, die auf gesunden Negativkontrollen beruhen, sowie die Verwendung Perzentil-basierter Schwellenwerte (94, 97). Diese Modelle tragen der realen Heterogenität gängiger Assays besser Rechnung und könnten langfristig dazu beitragen, die diagnostische Treffsicherheit und interlaborative Vergleichbarkeit zu erhöhen. Jedoch sind zur Generierung solcher lokalen Referenzbereiche große Referenzkollektive notwendig. Dies schränkt die Praktikabilität dieses Alternativvorschlages erheblich ein, da er aus ökonomischen Gründen kaum umsetzbar ist.

### **6.11 Weiterführende Informationen zu der Kausalanalyse nach Bradford-Hill**

Das von Austin Bradford Hill entwickelte Kriteriensystem umfasst neun sog. Leitprinzipien, die bei der Bewertung helfen sollen, ob ein beobachteter Zusammenhang als potenziell kausal interpretiert werden kann (461). Diese neun Leitprinzipien umfassen die Betrachtung der Effektstärke, der Konsistenz, der Spezifität, des zeitlichen Zusammenhanges, der Dosis-Wirkung-Beziehung, der biologischen Plausibilität, der Kohärenz, der experimentellen Überprüfung und der Analogie.

Eine Anwendung der Kriterien auf die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit zeigt ein gemischtes Bild:

- Stärke des Effekts: Die gemessene Assoziation zwischen AU-Werten und Thromboseanamnese ist statistisch signifikant, jedoch schwach ausgeprägt. Eine klare Trennschärfe auf individueller Ebene fehlt.
- Konsistenz: Frühere Arbeiten weisen ebenfalls auf eine mögliche pathophysiologische Rolle Lipid-bindender aCL hin. Dennoch fehlen unabhängige Replikationen in großen, methodisch stringenten Kohorten.
- Temporalität: Da es sich um eine Fall-Kontroll-Studie handelt, lässt sich keine zeitliche Abfolge von Antikörpernachweis oder -Titer und klinischem Ereignis nachweisen.
- Dosis-Wirkungs-Beziehung: Eine Abstufung der Effekte bzw. der Ausprägung der Klinik der VTE in Abhängigkeit von der Antikörperhöhe wurde nicht untersucht.
- Biologische Plausibilität: Experimentelle Daten und pathophysiologische Modelle sprechen klar dafür, dass Lipid-bindende aCL prothrombotische Mechanismen aktivieren können (siehe 1.2.8 Pathophysiologie).

- Kohärenz: Die Hypothese fügt sich in das bestehende Verständnis des APS ein, insbesondere im Hinblick auf die Heterogenität der aPL, widerspricht jedoch den Primärquellen zur sog. Kofaktorabhängigkeit der aCL von Galli und McNeil et al..
- Experimentelle Evidenz / Reversibilität: Interventionsstudien oder Therapieeffekte, die spezifisch auf Lipid-bindende aCL abzielen, liegen bislang nicht vor.

Zusammenfassend erfüllen die Befunde nur einzelne Kriterien (Plausibilität, Kohärenz), während zentrale Voraussetzungen wie Stärke, Konsistenz, Temporarität und Dosis-Wirkung nicht gegeben sind. Eine kausale Beteiligung Lipid-bindender aCL an der Thromboseentstehung im beobachteten Studienkollektiv kann daher derzeit nicht belegt werden. Die Hypothese bleibt jedoch plausibel und stellt eine fundierte Grundlage für weiterführende Untersuchungen dar.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Ronald PC, Beutler B. Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. *Science*. 2010;330(6007):1061-4.
2. Randow F, MacMicking JD, James LC. Cellular self-defense: how cell-autonomous immunity protects against pathogens. *Science*. 2013;340(6133):701-6.
3. Boraschi D, Italiani P. Innate Immune Memory: Time for Adopting a Correct Terminology. *Front Immunol*. 2018;9:799.
4. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002;296(5566):298-300.
5. Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest*. 2002;109(6):693-7.
6. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
7. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(1):123-8.
8. Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(3):380-3.
9. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997;91(3):295-8.
10. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie* [E-Book]. 9th ed. 2018 ed. Berlin, Heidelberg 2018.
11. Kronenberg M. Self-tolerance and autoimmunity. *Cell*. 1991;65(4):537-42.
12. Ahmed S, Padhan P, Misra R, Danda D. Update on Post-Streptococcal Reactive Arthritis: Narrative Review of a Forgotten Disease. *Curr Rheumatol Rep*. 2021;23(3):19.
13. Shulman ST, Dale JB. Group A Streptococcal Virulence: New Lessons. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2019;8(2):160-1.
14. Bertola EA, Simonetti GD, Del Giorno R, Giannini O, Fossali EF, Meoli M, et al. Extrarenal Immune-Mediated Disorders Linked with Acute Poststreptococcal Glomerulonephritis: a Systematic Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;57(2):294-302.
15. Théodoridès J. Pierre François Olive Rayer (1793-1867). *J Med Biogr*. 1995;3(4):192-6.
16. Lohse AW. Autoreactive T cells. *Curr Opin Immunol*. 1989;1(4):718-26.
17. Barbhuiya M, Zuily S, Naden R, Hendry A, Manneville F, Amigo MC, et al. The 2023 ACR/EULAR Antiphospholipid Syndrome Classification Criteria. *Arthritis Rheumatol*. 2023;75(10):1687-702.
18. Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Thromb Res*. 2017;151 Suppl 1:S43-s7.
19. *Hämostaseologie : Grundlagen, Diagnostik und Therapie* [E-Book]. 2nd ed. 2010 ed. Pötzsch B, Madlener K, editors. Berlin, Heidelberg 2010.
20. Sciascia S, Sanna G, Khamashta MA, Cuadrado MJ, Erkan D, Andreoli L, et al. The estimated frequency of antiphospholipid antibodies in young adults with cerebrovascular events: a systematic review. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(11):2028-33.
21. Andreoli L, Chighizola CB, Banzato A, Pons-Estel GJ, Ramire de Jesus G, Erkan D. Estimated frequency of antiphospholipid antibodies in patients with pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis: a critical review of the literature. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013;65(11):1869-73.
22. Arachchillage DJ, Pericleous C. Evolution of Antiphospholipid Syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2023.
23. Mackworth-Young CG, Loizou S, Walport MJ. Primary antiphospholipid syndrome: features of patients with raised anticardiolipin antibodies and no other disorder. *Ann Rheum Dis*. 1989;48(5):362-7.
24. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RH, Machin SJ, Barquinero J, et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)*. 1989;68(6):366-74.

25. Rheumatologie DGf. Qualitätssicherung in der Rheumatologie [E-Book]. In: Deutsche Gesellschaft für R, editor. Qualitätssicherung in der Rheumatologie. 2nd ed. 2007 ed. Heidelberg: Steinkopff Verlag; 2007.
26. Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1992;19(4):508-12.
27. Legault K, Schunemann H, Hillis C, Yeung C, Akl EA, Carrier M, et al. McMaster RARE-Bestpractices clinical practice guideline on diagnosis and management of the catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2018.
28. Cervera R, Bucciarelli S, Plasín MA, Gómez-Puerta JA, Plaza J, Pons-Estel G, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): descriptive analysis of a series of 280 patients from the "CAPS Registry". *J Autoimmun.* 2009;32(3-4):240-5.
29. Cervera R, Rodríguez-Pintó I, Legault K, Erkan D. 16th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force Report on Catastrophic Antiphospholipid Syndrome. *Lupus.* 2020;29(12):1594-600.
30. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum.* 2002;46(4):1019-27.
31. Hughes GR, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(12):1127.
32. Pignatelli P, Ettore E, Menichelli D, Pani A, Violi F, Pastori D. Seronegative antiphospholipid syndrome: refining the value of "non-criteria" antibodies for diagnosis and clinical management. *Haematologica.* 2020;105(3):562-72.
33. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4(2):295-306.
34. Negrini S, Pappalardo F, Murdaca G, Indiveri F, Puppo F. The antiphospholipid syndrome: from pathophysiology to treatment. *Clin Exp Med.* 2017;17(3):257-67.
35. Guédon AF, Catano J, Ricard L, Laurent C, de Moreuil C, Urbanski G, et al. Non-criteria manifestations in primary antiphospholipid syndrome: a French multicenter retrospective cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2022;24(1):33.
36. Cheng CY, Zhang YX, Denas G, Du Y, Jing ZC, Pengo V. Prevalence of antiphospholipid (aPL) antibodies among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Intern Emerg Med.* 2019;14(4):521-7.
37. Branch DW, Silver RM, Blackwell JL, Reading JC, Scott JR. Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: an update of the Utah experience. *Obstet Gynecol.* 1992;80(4):614-20.
38. Lima F, Khamashta MA, Buchanan NM, Kerslake S, Hunt BJ, Hughes GR. A study of sixty pregnancies in patients with the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 1996;14(2):131-6.
39. Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1983;287(6399):1088-9.
40. A. Wassermann AN, C. Bruck Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis *Dtsch Med Wochenschr.* 1906;No. 19.:745-6.
41. Pangborn MC. A New Serologically Active Phospholipid from Beef Heart. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1941;48(2):484-6.
42. Pangborn MC. Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart. *Division of Laboratories and Research, .* 1942;143:247-56.
43. Moore JE, Mohr CF. The incidence and etiologic background of chronic biologic false-positive reactions in serologic tests for syphilis. *Ann Intern Med.* 1952;37(6):1156-61.
44. Frick PG. Acquired circulating anticoagulants in systemic collagen disease; autoimmune thromboplastin deficiency. *Blood.* 1955;10(7):691-706.
45. Schleider MA, Nachman RL, Jaffe EA, Coleman M. A clinical study of the lupus anticoagulant. *Blood.* 1976;48(4):499-509.
46. Boxer M, Ellman L, Carvalho A. The lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum.* 1976;19(6):1244-8.

47. Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Hemost Thromb.* 1972;1:75-95.
48. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(11):4120-4.
49. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet.* 1990;336(8708):177-8.
50. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet.* 1990;335(8705):1544-7.
51. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus.* 1992;1(2):75-81.
52. Yetman DL, Kutteh WH. Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies. *Fertil Steril.* 1996;66(4):540-6.
53. Weidmann CE, Wallace DJ, Peter JB, Knight PJ, Bear MB, Klinenberg JR. Studies of IgG, IgM and IgA antiphospholipid antibody isotypes in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1988;15(1):74-9.
54. Pierangeli SS, Liu XW, Barker JH, Anderson G, Harris EN. Induction of thrombosis in a mouse model by IgG, IgM and IgA immunoglobulins from patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 1995;74(5):1361-7.
55. Ruiz-García R, Serrano M, Martínez-Flores J, Mora S, Morillas L, Martín-Mola M, et al. Isolated IgA anti-  $\beta$ 2 glycoprotein I antibodies in patients with clinical criteria for antiphospholipid syndrome. *J Immunol Res.* 2014;2014:704395.
56. Branch DW, Silver R, Pierangeli S, van Leeuwen I, Harris EN. Antiphospholipid antibodies other than lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome. *Obstet Gynecol.* 1997;89(4):549-55.
57. Matzner W, Chong P, Xu G, Ching W. Characterization of antiphospholipid antibodies in women with recurrent spontaneous abortions. *J Reprod Med.* 1994;39(1):27-30.
58. Gilman-Sachs A, Lubinski J, Beer AE, Brend S, Beaman KD. Patterns of anti-phospholipid antibody specificities. *J Clin Lab Immunol.* 1991;35(2):83-8.
59. Anunciación-Llunell A, Muñoz C, Roggenbuck D, Frasca S, Pardos-Gea J, Esteve-Valverde E, et al. Differences in Antiphospholipid Antibody Profile between Patients with Obstetric and Thrombotic Antiphospholipid Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21).
60. Hrycek A, Cieřlik P. Annexin A5 and anti-annexin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2012;32(5):1335-42.
61. Bozic B, Irman S, Gaspersic N, Kveder T, Rozman B. Antibodies against annexin A5: detection pitfalls and clinical associations. *Autoimmunity.* 2005;38(6):425-30.
62. Mekinian A, Bourrienne MC, Carbillon L, Benbara A, Noémie A, Chollet-Martin S, et al. Non-conventional antiphospholipid antibodies in patients with clinical obstetrical APS: Prevalence and treatment efficacy in pregnancies. *Semin Arthritis Rheum.* 2016;46(2):232-7.
63. Abisror N, Nguyen Y, Marozio L, Esteve Valverde E, Udry S, Pleguezuelo DE, et al. Obstetrical outcome and treatments in seronegative primary APS: data from European retrospective study. *RMD Open.* 2020;6(2):0.
64. Zohoury N, Bertolaccini ML, Rodriguez-Garcia JL, Shums Z, Ateka-Barrutia O, Sorice M, et al. Closing the Serological Gap in the Antiphospholipid Syndrome: The Value of "Non-criteria" Antiphospholipid Antibodies. *J Rheumatol.* 2017;44(11):1597-602.
65. Vaarala O, Puurunen M, Mänttari M, Manninen V, Aho K, Palosuo T. Antibodies to prothrombin imply a risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Thromb Haemost.* 1996;75(3):456-9.
66. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):1982-93.

67. Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, de Laat B, Forastiero R, et al. 'Non-criteria' aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus*. 2011;20(2):191-205.
68. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis*. 1987;46(1):1-6.
69. Conti F, Andreoli L, Crisafulli F, Mancuso S, Truglia S, Tektonidou MG. Does seronegative obstetric APS exist? "pro" and "cons". *Autoimmun Rev*. 2019;18(12):102407.
70. Ortona E, Capozzi A, Colasanti T, Conti F, Alessandri C, Longo A, et al. Vimentin/cardioliipin complex as a new antigenic target of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010;116(16):2960-7.
71. Conti F, Capozzi A, Truglia S, Lococo E, Longo A, Misasi R, et al. The mosaic of "seronegative" antiphospholipid syndrome. *J Immunol Res*. 2014;2014:389601.
72. Truglia S, Capozzi A, Mancuso S, Recalchi S, Spinelli FR, Perricone C, et al. A Monocentric Cohort of Obstetric Seronegative Anti-Phospholipid Syndrome. *Front Immunol*. 2018;9:1678.
73. Schultze HE, Heide K, Haupt H. Über ein bisher unbekanntes niedermolekulares  $\beta$ 2-Globulin des Humanserums. *Naturwissenschaften*. 1961;48(23):719-.
74. Haupt H, Schwick HG, Störiko K. [On a hereditary beta-2-glycoprotein I deficiency]. *Humangenetik*. 1968;5(4):291-3.
75. White-Adams TC, Berny MA, Tucker EI, Gertz JM, Gailani D, Urbanus RT, et al. Identification of coagulation factor XI as a ligand for platelet apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1602-7.
76. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Iliceto S. A two-step coagulation test to identify antibeta-glycoprotein I lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost*. 2004;2(5):702-7.
77. Pengo V, Balestrieri G, Tincani A, Spatola L, Biasiolo A, Brocco T. Utilization of dilute Russell's viper venom time to detect autoantibodies against beta 2-glycoprotein I which express anticoagulant activity in the presence but not in the absence of exogenous phospholipids. *Thromb Haemost*. 1997;77(1):123-6.
78. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Beta 2-glycoprotein-I (apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. *Atherosclerosis*. 1987;63(2-3):109-14.
79. Rahgozar S, Giannakopoulos B, Yan X, Wei J, Cheng Qi J, Gemmell R, et al. Beta2-glycoprotein I protects thrombin from inhibition by heparin cofactor II: potentiation of this effect in the presence of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies. *Arthritis Rheum*. 2008;58(4):1146-55.
80. Ieko M, Sawada KI, Koike T, Notoya A, Mukai M, Kohno M, et al. The putative mechanism of thrombosis in antiphospholipid syndrome: impairment of the protein C and the fibrinolytic systems by monoclonal anticardiolipin antibodies. *Semin Thromb Hemost*. 1999;25(5):503-7.
81. McDonnell T, Wincup C, Buchholz I, Pericleous C, Giles I, Ripoll V, et al. The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: More than just APS. *Blood Rev*. 2020;39:100610.
82. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum*. 1999;42(7):1309-11.
83. Gandhi AA, Estes SK, Rysenga CE, Knight JS. Understanding the Pathophysiology of Thrombotic APS through Animal Models. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5).
84. Asherson RA, Cervera R, de Groot PG, Erkan D, Boffa MC, Piette JC, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus*. 2003;12(7):530-4.
85. Balshem H, Helfand M, Schünemann HJ, Oxman AD, Kunz R, Brozek J, et al. GRADE guidelines: 3. Rating the quality of evidence. *J Clin Epidemiol*. 2011;64(4):401-6.
86. ICD-10-WHO [Internet]. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). 2019 [cited 07.07.2022]. Available from:

<https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-who/kode-suche/htmlamtl2019/block-d65-d69.htm#D68.6>.

87. International Classification of Diseases, Eleventh Revision (ICD-11) [Internet]. World Health Organization 2022. 2022 [cited 26.02.2023]. Available from: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fid%2fentity%2f1173370808>.
88. Ahluwalia J, Sreedharanunni S. The Laboratory Diagnosis of the Antiphospholipid Syndrome. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2017;33(1):8-14.
89. Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, Erkan D, Favaloro EJ, Mackie I, et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost*. 2020;18(11):2828-39.
90. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost*. 2009;7(10):1737-40.
91. Lynes MA. Solid-phase immunoassays. *Curr Protoc Toxicol*. 2005;Chapter 18:Unit18.7.
92. Krilis SA, Giannakopoulos B. Laboratory methods to detect antiphospholipid antibodies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):321-8.
93. Vandeveld A, Chayoua W, de Laat B, Gris JC, Moore GW, Musiał J, et al. Semiquantitative interpretation of anticardiolipin and anti- $\beta$ 2glycoprotein I antibodies measured with various analytical platforms: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost*. 2022;20(2):508-24.
94. Tripodi A. "Antiphospholipid antibody solid phase-based assays: problems and proposed solutions for the 2023 American College of Rheumatology/European Alliance of Associations for Rheumatology classification criteria for antiphospholipid syndrome": comment. *J Thromb Haemost*. 2024;22(8):2371-2.
95. Manning JE, Arachchilage DJ. Dilemmas in the diagnosis and management of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2024;22(8):2156-70.
96. Žigon P, Boštic N, Ambrožič A, Rotar Ž, Blokar E, Ogrič M, et al. Establishment of ELISA-comparable moderate and high thresholds for anticardiolipin and anti- $\beta$ 2 glycoprotein I chemiluminescent immunoassays according to the 2023 ACR/EULAR APS classification criteria and evaluation of their diagnostic performance. *Clin Chem Lab Med*. 2025;63(1):164-76.
97. Huisman A, Urbanus RT, Meijer P. Antiphospholipid antibody solid phase-based assays: problems and proposed solutions for the 2023 ACR/EULAR classification criteria for antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2024;22(3):874-6.
98. Huisman A, Urbanus RT, Meijer P. "Antiphospholipid antibody solid phase-based assays: problems and proposed solutions for the 2023 ACR/EULAR classification criteria for antiphospholipid syndrome": reply. *J Thromb Haemost*. 2024;22(8):2373-4.
99. Kocijancic M, Goj T, Peter A, Klein R, Hörber S. Antiphospholipid Antibody Testing in a Maximum Care Hospital: Method-Dependent Differences. *J Clin Med*. 2024;13(15).
100. Schmidt TG, Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc*. 2007;2(6):1528-35.
101. Goodyear CS, Silverman GJ. Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a Staphylococcal Toxin. *J Exp Med*. 2003;197(9):1125-39.
102. Zarrineh M, Mashhadi IS, Farhadpour M, Ghassempour A. Mechanism of antibodies purification by protein A. *Anal Biochem*. 2020;609:113909.
103. Terman DS, Yamamoto T, Mattioli M, Cook G, Tillquist R, Henry J, et al. Extensive necrosis of spontaneous canine mammary adenocarcinoma after extracorporeal perfusion over Staphylococcus aureus Cowans I. I. Description of acute tumoricidal response: morphologic, histologic, immunohistochemical, immunologic, and serologic findings. *J Immunol*. 1980;124(2):795-805.

104. Bansal SC, Bansal BR, Thomas HL, Siegel PD, Rhoads JE, Jr., Cooper DR, et al. Ex vivo removal of serum IgG in a patient with colon carcinoma: some biochemical, immunological and histological observations. *Cancer*. 1978;42(1):1-18.
105. Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma beta 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(12):3640-4.
106. Agar C, van Os GM, Mörgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, et al. Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010;116(8):1336-43.
107. Müller-Calleja N, Ruf W, Lackner KJ. Lipid-binding antiphospholipid antibodies: significance for pathophysiology and diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2024:1-18.
108. Hammel M, Schwarzenbacher R, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R. Mechanism of the interaction of beta(2)-glycoprotein I with negatively charged phospholipid membranes. *Biochemistry*. 2001;40(47):14173-81.
109. Hammel M, Kriechbaum M, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R. Solution structure of human and bovine beta(2)-glycoprotein I revealed by small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol*. 2002;321(1):85-97.
110. Polz E, Kostner GM. Binding of beta 2-glycoprotein-I to intralipid: determination of the dissociation constant. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979;90(4):1305-12.
111. Wurm H. beta 2-Glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles. *Int J Biochem*. 1984;16(5):511-5.
112. Lutters BC, Derksen RH, Tekelenburg WL, Lenting PJ, Arnout J, de Groot PG. Dimers of beta 2-glycoprotein I increase platelet deposition to collagen via interaction with phospholipids and the apolipoprotein E receptor 2'. *J Biol Chem*. 2003;278(36):33831-8.
113. Laplante P, Amireault P, Subang R, Dieudé M, Levine JS, Rauch J. Interaction of  $\beta$ 2-glycoprotein I with lipopolysaccharide leads to Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent activation of macrophages. *J Biol Chem*. 2011;286(49):42494-503.
114. Pennings MT, van Lummel M, Derksen RH, Urbanus RT, Romijn RA, Lenting PJ, et al. Interaction of beta2-glycoprotein I with members of the low density lipoprotein receptor family. *J Thromb Haemost*. 2006;4(8):1680-90.
115. Vlachoyiannopoulos PG, Samarkos M, Sikara M, Tsiligros P. Antiphospholipid antibodies: laboratory and pathogenetic aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2007;44(3):271-338.
116. Lackner KJ, Muller-Calleja N. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: recent insights and emerging concepts. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(2):198-209.
117. Roggenbuck D, Borghi MO, Somma V, Büttner T, Schierack P, Hanack K, et al. Antiphospholipid antibodies detected by line immunoassay differentiate among patients with antiphospholipid syndrome, with infections and asymptomatic carriers. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(1):111.
118. Willkens RF, Dreschler M, Larson DL. Partial purification and properties of lupus erythematosus cell promoting factor. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1958;99(3):645-8.
119. Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell. *Proc Staff Meet Mayo Clin*. 1948;23(2):25-8.
120. Smith BR, Hall R. Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease. *Lancet*. 1974;2(7878):427-31.
121. Adams DD, Fastier FN, Howie JB, Kennedy TH, Kilpatrick JA, Stewart RD. Stimulation of the human thyroid by infusions of plasma containing LATS protector. *J Clin Endocrinol Metab*. 1974;39(5):826-32.
122. Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology*. 1976;26(11):1054-9.
123. Blank M, Faden D, Tincani A, Kopolovic J, Goldberg I, Gilburd B, et al. Immunization with Anticardiolipin Cofactor (Beta-2-Glycoprotein I) Induces Experimental Antiphospholipid Syndrome in Naive Mice. *Journal of Autoimmunity*. 1994;7(4):441-55.
124. Shoenfeld Y. Induction of experimental primary and secondary antiphospholipid syndromes in naive mice. *Am J Reprod Immunol*. 1992;28(3-4):219-21.

125. Blank M, Krause I, Ben-Bassat M, Shoenfeld Y. Induction of experimental anti-phospholipid syndrome associated with SLE following immunization with human monoclonal pathogenic anti-DNA idiotype. *J Autoimmun.* 1992;5(4):495-509.
126. Blank M, Cohen J, Toder V, Shoenfeld Y. Induction of anti-phospholipid syndrome in naive mice with mouse lupus monoclonal and human polyclonal anti-cardiolipin antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(8):3069-73.
127. Branch DW, Dudley DJ, Mitchell MD, Creighton KA, Abbott TM, Hammond EH, et al. Immunoglobulin G fractions from patients with antiphospholipid antibodies cause fetal death in BALB/c mice: a model for autoimmune fetal loss. *Am J Obstet Gynecol.* 1990;163(1 Pt 1):210-6.
128. Prinz N, Clemens N, Strand D, Pütz I, Lorenz M, Daiber A, et al. Antiphospholipid antibodies induce translocation of TLR7 and TLR8 to the endosome in human monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2011;118(8):2322-32.
129. Gladigau G, Haselmayer P, Scharrer I, Munder M, Prinz N, Lackner K, et al. A role for Toll-like receptor mediated signals in neutrophils in the pathogenesis of the anti-phospholipid syndrome. *PLoS One.* 2012;7(7):e42176.
130. Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms. *Semin Thromb Hemost.* 2008;34(3):236-50.
131. Lennert K, Remmele W. [Measurement of the cell nucleus in the lymph node cells of man. II. Reticulum cells and endothelial cells]. *Acta Haematol.* 1958;20(5):301-17.
132. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-52.
133. Langerhans P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin.* 1868;44(2):325-37.
134. Knight SC. Veiled cells--"dendritic cells" of the peripheral lymph. *Immunobiology.* 1984;168(3-5):349-61.
135. Hart DN, McKenzie JL. Interstitial dendritic cells. *Int Rev Immunol.* 1990;6(2-3):127-38.
136. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018;154(1):3-20.
137. Brack C, Nagata S, Mantei N, Weissmann C. Molecular analysis of the human interferon-alpha gene family. *Gene.* 1981;15(4):379-94.
138. López de Padilla CM, Niewold TB. The type I interferons: Basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases. *Gene.* 2016;576(1 Pt 1):14-21.
139. Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, Yeow WS, Megjugorac N, Dai J, et al. Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2003;74(6):1125-38.
140. Eloranta ML, Lövgren T, Finke D, Mathsson L, Rönnelid J, Kastner B, et al. Regulation of the interferon-alpha production induced by RNA-containing immune complexes in plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Rheum.* 2009;60(8):2418-27.
141. Santana-de Anda K, Gómez-Martín D, Soto-Solís R, Alcocer-Varela J. Plasmacytoid dendritic cells: key players in viral infections and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;43(1):131-6.
142. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol.* 2004;5(12):1219-26.
143. Feldman SB, Ferraro M, Zheng HM, Patel N, Gould-Fogerite S, Fitzgerald-Bocarsly P. Viral induction of low frequency interferon-alpha producing cells. *Virology.* 1994;204(1):1-7.
144. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science.* 1999;284(5421):1835-7.
145. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:275-306.
146. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature.* 1997;388(6644):782-7.

147. de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Aït-Yahia S, et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity*. 1998;9(3):325-36.
148. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998;392(6671):86-9.
149. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. 1998;28(9):2760-9.
150. Getz GS. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Bridging the innate and adaptive immune systems. *J Lipid Res*. 2005;46(4):619-22.
151. Muller-Calleja N, Hollerbach A, Royce J, Ritter S, Pedrosa D, Madhusudhan T, et al. Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity. *Science*. 2021;371(6534):13.
152. Kaplan MJ. Linking clotting and autoimmunity. *Science*. 2021;371(6534):1100-1.
153. Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(9):1239-53.
154. Boles J, Mackman N. Role of tissue factor in thrombosis in antiphospholipid antibody syndrome. *Lupus*. 2010;19(4):370-8.
155. Döring Y, Hurst J, Lorenz M, Prinz N, Clemens N, Drechsler MD, et al. Human antiphospholipid antibodies induce TNFalpha in monocytes via Toll-like receptor 8. *Immunobiology*. 2010;215(3):230-41.
156. van den Hoogen LL, Bisioendial RJ. B-Cells and BAFF in Primary Antiphospholipid Syndrome, Targets for Therapy? *J Clin Med*. 2022;12(1).
157. Alvarez-Rodriguez L, Riancho-Zarrabeitia L, Calvo-Alén J, López-Hoyos M, Martínez-Taboada V. Peripheral B-Cell Subset Distribution in Primary Antiphospholipid Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2).
158. Ma K, Du W, Wang S, Xiao F, Li J, Tian J, et al. B1-cell-produced anti-phosphatidylserine antibodies contribute to lupus nephritis development via TLR-mediated Syk activation. *Cell Mol Immunol*. 2023;20(8):881-94.
159. Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature*. 1998;392(6672):193-7.
160. Galve-de Rochemonteix B, Kobayashi T, Rosnoblet C, Lindsay M, Parton RG, Reber G, et al. Interaction of anti-phospholipid antibodies with late endosomes of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(2):563-74.
161. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(8):594-606.
162. Saitoh S, Miyake K. Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors. *Immunol Rev*. 2009;227(1):32-43.
163. Ruff WE, Dehner C, Kim WJ, Pagovich O, Aguiar CL, Yu AT, et al. Pathogenic Autoreactive T and B Cells Cross-React with Mimotopes Expressed by a Common Human Gut Commensal to Trigger Autoimmunity. *Cell Host Microbe*. 2019;26(1):100-13.e8.
164. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):823-35.
165. Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland S. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science*. 2006;312(5780):1669-72.
166. Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, Feigenbaum L, Town T, Ward JM, et al. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity*. 2007;27(5):801-10.
167. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*. 2006;7(1):49-56.
168. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*. 2002;416(6881):603-7.

169. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 1968;128(3):415-35.
170. Nichols BA, Bainton DF, Farquhar MG. Differentiation of monocytes. Origin, nature, and fate of their azurophil granules. *J Cell Biol.* 1971;50(2):498-515.
171. Gren ST, Grip O. Role of Monocytes and Intestinal Macrophages in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(8):1992-8.
172. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:669-92.
173. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:421-52.
174. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(2):77-86.
175. Broze GJ, Jr., Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood.* 1988;71(2):335-43.
176. Silverberg SA, Nemerson Y, Zur M. Kinetics of the activation of bovine coagulation factor X by components of the extrinsic pathway. Kinetic behavior of two-chain factor VII in the presence and absence of tissue factor. *J Biol Chem.* 1977;252(23):8481-8.
177. Zur M, Nemerson Y. Kinetics of factor IX activation via the extrinsic pathway. Dependence of Km on tissue factor. *J Biol Chem.* 1980;255(12):5703-7.
178. Zhang E, St Charles R, Tulinsky A. Structure of extracellular tissue factor complexed with factor VIIa inhibited with a BPTI mutant. *J Mol Biol.* 1999;285(5):2089-104.
179. Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood.* 1988;71(1):1-8.
180. Müller-Calleja N, Hollerbach A, Ritter S, Pedrosa DG, Strand D, Graf C, et al. Tissue factor pathway inhibitor primes monocytes for antiphospholipid antibody-induced thrombosis. *Blood.* 2019;134(14):1119-31.
181. Redecha P, Franzke CW, Ruf W, Mackman N, Girardi G. Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest.* 2008;118(10):3453-61.
182. Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(12):1999-2004.
183. Chanakira A, Westmark PR, Ong IM, Sheehan JP. Tissue factor-factor VIIa complex triggers protease activated receptor 2-dependent growth factor release and migration in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2017;145(1):167-75.
184. Disse J, Petersen HH, Larsen KS, Persson E, Esmon N, Esmon CT, et al. The endothelial protein C receptor supports tissue factor ternary coagulation initiation complex signaling through protease-activated receptors. *J Biol Chem.* 2011;286(7):5756-67.
185. Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, Le Blanc I, Ferguson C, Fauré J, et al. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science.* 2004;303(5657):531-4.
186. Wang J, Pendurthi UR, Rao LVM. Sphingomyelin encrypts tissue factor: ATP-induced activation of A-SMase leads to tissue factor decryption and microvesicle shedding. *Blood Adv.* 2017;1(13):849-62.
187. Bretscher MS. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol.* 1972;236(61):11-2.
188. Nagata S, Sakuragi T, Segawa K. Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure. *Curr Opin Immunol.* 2020;62:31-8.
189. Reverter JC, Tàssies D, Font J, Khamashta MA, Ichikawa K, Cervera R, et al. Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum.* 1998;41(8):1420-7.
190. Kornberg A, Blank M, Kaufman S, Shoenfeld Y. Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anti-cardiolipin antibodies. *J Immunol.* 1994;153(3):1328-32.
191. von Landenberg C, Lackner KJ, von Landenberg P, Lang B, Schmitz G. Isolation and characterization of two human monoclonal anti-phospholipid IgG from patients with autoimmune disease. *J Autoimmun.* 1999;13(2):215-23.

192. Müller-Calleja N, Ritter S, Hollerbach A, Falter T, Lackner KJ, Ruf W. Complement C5 but not C3 is expendable for tissue factor activation by cofactor-independent antiphospholipid antibodies. *Blood Adv.* 2018;2(9):979-86.
193. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 1998;79(2):276-81.
194. López-Pedreira C, Buendía P, Aguirre MA, Velasco F, Cuadrado MJ. Antiphospholipid syndrome and tissue factor: a thrombotic couple. *Lupus.* 2006;15(3):161-6.
195. Reverter JC, Tàssies D, Font J, Monteagudo J, Escolar G, Ingelmo M, et al. Hypercoagulable state in patients with antiphospholipid syndrome is related to high induced tissue factor expression on monocytes and to low free protein s. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(11):1319-26.
196. Lackner KJ, von Landenberg C, Barlage S, Schmitz G. Analysis of prothrombotic effects of two human monoclonal IgG antiphospholipid antibodies of apparently similar specificity. *Thromb Haemost.* 2000;83(4):583-8.
197. Roy GC. Micro-Organisms or Granules of Bizzozero in the Blood. *Ind Med Gaz.* 1882;17(4):110.
198. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):34-45.
199. Lindemann S, Krämer B, Seizer P, Gawaz M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* 2007;5 Suppl 1:203-11.
200. Jenne CN, Kubes P. Platelets in inflammation and infection. *Platelets.* 2015;26(4):286-92.
201. van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2009;85(2):195-204.
202. Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B, Furie BC. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood.* 2006;107(10):3902-6.
203. Santoro SA. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell.* 1986;46(6):913-20.
204. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:395-424.
205. Tomaiuolo M, Brass LF, Stalker TJ. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interv Cardiol Clin.* 2017;6(1):1-12.
206. Stalker TJ, Newman DK, Ma P, Wannemacher KM, Brass LF. Platelet signaling. *Handb Exp Pharmacol.* 2012(210):59-85.
207. Mann KG, Jenny RJ, Krishnaswamy S. Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:915-56.
208. Shin EK, Park H, Noh JY, Lim KM, Chung JH. Platelet Shape Changes and Cytoskeleton Dynamics as Novel Therapeutic Targets for Anti-Thrombotic Drugs. *Biomol Ther (Seoul).* 2017;25(3):223-30.
209. Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem.* 1998;273(4):2030-4.
210. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost.* 2015;13(12):2141-51.
211. Kahr WH. Granules and thrombus formation. *Blood.* 2009;114(5):932-3.
212. Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1152-60.
213. Reed GL. Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(4):441-50.
214. Ren Q, Ye S, Whiteheart SW. The platelet release reaction: just when you thought platelet secretion was simple. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(5):537-41.
215. Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3363-9.

216. Plow EF, Byzova T. The biology of glycoprotein IIb-IIIa. *Coron Artery Dis.* 1999;10(8):547-51.
217. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7(1):52-62.
218. Yip J, Shen Y, Berndt MC, Andrews RK. Primary platelet adhesion receptors. *IUBMB Life.* 2005;57(2):103-8.
219. Gazzaniga V, Ottini L, editors. The discovery of platelets and their function 2001/06: Vesalius.
220. Hollerbach A, Müller-Calleja N, Ritter S, Häuser F, Canisius A, Orning C, et al. Platelet Activation by Antiphospholipid Antibodies Depends on Epitope Specificity and is Prevented by mTOR Inhibitors. *Thromb Haemost.* 2019;119(7):1147-53.
221. Espinola RG, Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN. Hydroxychloroquine reverses platelet activation induced by human IgG antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost.* 2002;87(3):518-22.
222. Robbins DL, Leung S, Miller-Blair DJ, Ziboh V. Effect of anticardiolipin/beta2-glycoprotein I complexes on production of thromboxane A2 by platelets from patients with the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol.* 1998;25(1):51-6.
223. Bontadi A, Ruffatti A, Giannini S, Falcinelli E, Tonello M, Hoxha A, et al. In vitro effect of anti- $\beta_2$  glycoprotein I antibodies on P-selectin expression, a marker of platelet activation. *Reumatismo.* 2012;64(1):35-9.
224. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(10):803-15.
225. Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood.* 1989;73(5):1109-12.
226. Alom-Ruiz SP, Anilkumar N, Shah AM. Reactive oxygen species and endothelial activation. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(6):1089-100.
227. Rodríguez I, González M. Physiological mechanisms of vascular response induced by shear stress and effect of exercise in systemic and placental circulation. *Front Pharmacol.* 2014;5:209.
228. Lu D, Kassab GS. Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *J R Soc Interface.* 2011;8(63):1379-85.
229. Weibel ER, Palade GE. NEW CYTOPLASMIC COMPONENTS IN ARTERIAL ENDOTHELIA. *J Cell Biol.* 1964;23(1):101-12.
230. Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* 2013;328(1):18-26.
231. Shinkai A, Yoshisue H, Koike M, Shoji E, Nakagawa S, Saito A, et al. A novel human CC chemokine, eotaxin-3, which is expressed in IL-4-stimulated vascular endothelial cells, exhibits potent activity toward eosinophils. *J Immunol.* 1999;163(3):1602-10.
232. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, et al. Endothelin. *Pharmacol Rev.* 2016;68(2):357-418.
233. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9233-7.
234. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 1989;84(1):92-9.
235. EA vW. [Hereditary pseudo haemophilia]. *Fin Läkaresällsk Handl.* 1926;68:87-112.
236. Graves BJ, Crowther RL, Chandran C, Rumberger JM, Li S, Huang KS, et al. Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains. *Nature.* 1994;367(6463):532-8.
237. Dinarello CA, Goldin NP, Wolff SM. Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. *J Exp Med.* 1974;139(6):1369-81.
238. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature.* 1985;315(6021):641-7.

239. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*. 2005;106(2):584-92.
240. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;36(2):104-7.
241. Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ, Jr. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood*. 1996;88(5):1583-7.
242. Parry GC, Mackman N. Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(5):612-21.
243. van Loo G, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2023;23(5):289-303.
244. Gough P, Myles IA. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. *Front Immunol*. 2020;11:585880.
245. Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol*. 2002;157(7):1233-45.
246. Branch DW, Rodgers GM. Induction of endothelial cell tissue factor activity by sera from patients with antiphospholipid syndrome: a possible mechanism of thrombosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1993;168(1 Pt 1):206-10.
247. Simantov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, et al. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2211-9.
248. Clemens N, Frauenknecht K, Katzav A, Sommer C, von Landenberg P. In vitro effects of antiphospholipid syndrome-IgG fractions and human monoclonal antiphospholipid IgG antibody on human umbilical vein endothelial cells and monocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1173:805-13.
249. Powell KL, Ashton AW. Analyzing Trophoblast Function Using Cell-Based Assays. *Methods Mol Biol*. 2018;1710:233-46.
250. Hustin J, Jauniaux E, Schaaps JP. Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion. *Placenta*. 1990;11(6):477-86.
251. Lyall F, Robson SC, Bulmer JN. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. *Hypertension*. 2013;62(6):1046-54.
252. Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest*. 1993;91(3):950-60.
253. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*. 2008;51(4):970-5.
254. Mulla MJ, Brosens JJ, Chamley LW, Giles I, Pericleous C, Rahman A, et al. Antiphospholipid antibodies induce a pro-inflammatory response in first trimester trophoblast via the TLR4/MyD88 pathway. *Am J Reprod Immunol*. 2009;62(2):96-111.
255. Di Simone N, Caliandro D, Castellani R, Ferrazzani S, De Carolis S, Caruso A. Low-molecular weight heparin restores in-vitro trophoblast invasiveness and differentiation in presence of immunoglobulin G fractions obtained from patients with antiphospholipid syndrome. *Hum Reprod*. 1999;14(2):489-95.
256. Di Simone N, Meroni PL, de Papa N, Raschi E, Caliandro D, De Carolis CS, et al. Antiphospholipid antibodies affect trophoblast gonadotropin secretion and invasiveness by binding directly and through adhered beta2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):140-50.
257. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231-41.
258. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15880-5.

259. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 2010;16(8):887-96.
260. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012;209(4):819-35.
261. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2012;10(1):136-44.
262. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
263. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998;92(9):3007-17.
264. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front Immunol.* 2019;10:1068.
265. Ivetic A. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour. *Cell Tissue Res.* 2018;371(3):437-53.
266. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, Mazza LF, Morris AE, Núñez-Álvarez C, et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(11):2990-3003.
267. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9813-8.
268. Arvieux J, Jacob MC, Roussel B, Bensa JC, Colomb MG. Neutrophil activation by anti-beta 2 glycoprotein I monoclonal antibodies via Fc gamma receptor II. *J Leukoc Biol.* 1995;57(3):387-94.
269. Carrera-Marín A, Romay-Penabad Z, Papalardo E, Reyes-Maldonado E, García-Latorre E, Vargas G, et al. C6 knock-out mice are protected from thrombophilia mediated by antiphospholipid antibodies. *Lupus.* 2012;21(14):1497-505.
270. Romay-Penabad Z, Liu XX, Montiel-Manzano G, Papalardo De Martínez E, Pierangeli SS. C5a receptor-deficient mice are protected from thrombophilia and endothelial cell activation induced by some antiphospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1108:554-66.
271. Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M, Liu X, Espinola RG, Salmon J. Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum.* 2005;52(7):2120-4.
272. Thurman JM, Kraus DM, Girardi G, Hourcade D, Kang HJ, Royer PA, et al. A novel inhibitor of the alternative complement pathway prevents antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss in mice. *Mol Immunol.* 2005;42(1):87-97.
273. Holers VM, Girardi G, Mo L, Guthridge JM, Molina H, Pierangeli SS, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med.* 2002;195(2):211-20.
274. Girardi G, Redecha P, Salmon JE. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med.* 2004;10(11):1222-6.
275. Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D, et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest.* 2003;112(11):1644-54.
276. Redecha P, Tilley R, Tencati M, Salmon JE, Kirchhofer D, Mackman N, et al. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury. *Blood.* 2007;110(7):2423-31.
277. Esmon CT. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science.* 1987;235(4794):1348-52.
278. Esmon CT, Gu JM, Xu J, Qu D, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica.* 1999;84(4):363-8.

279. Mammen EF, Thomas WR, Seegers WH. Activation of purified prothrombin to autoprothrombin I or autoprothrombin II (platelet cofactor II or autoprothrombin II-A). *Thromb Diath Haemorrh.* 1960;5:218-49.
280. Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem.* 1976;251(2):355-63.
281. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest.* 2003;124(3 Suppl):26s-32s.
282. Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem.* 1994;269(42):26486-91.
283. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(19):10212-6.
284. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science.* 2002;296(5574):1880-2.
285. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991;64(6):1057-68.
286. Soh UJ, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol.* 2010;160(2):191-203.
287. Soh UJ, Trejo J. Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through  $\beta$ -arrestin and dishevelled-2 scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(50):E1372-80.
288. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood.* 2007;109(8):3161-72.
289. Bae JS, Yang L, Manithody C, Rezaie AR. The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. *Blood.* 2007;110(12):3909-16.
290. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276(14):11199-203.
291. Bae JS, Rezaie AR. Thrombin inhibits nuclear factor kappaB and RhoA pathways in cytokine-stimulated vascular endothelial cells when EPCR is occupied by protein C. *Thromb Haemost.* 2009;101(3):513-20.
292. Stearns DJ, Kurosawa S, Esmon CT. Microthrombomodulin. Residues 310-486 from the epidermal growth factor precursor homology domain of thrombomodulin will accelerate protein C activation. *J Biol Chem.* 1989;264(6):3352-6.
293. Vehar GA, Davie EW. Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). *Biochemistry.* 1980;19(3):401-10.
294. Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J Biol Chem.* 1980;255(12):5521-4.
295. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest.* 1981;68(5):1370-3.
296. Goldenberg NA, Manco-Johnson MJ. Protein C deficiency. *Haemophilia.* 2008;14(6):1214-21.
297. Taylor FB, Jr., Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest.* 1987;79(3):918-25.
298. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(3):1004-8.
299. Gu JM, Crawley JT, Ferrell G, Zhang F, Li W, Esmon NL, et al. Disruption of the endothelial cell protein C receptor gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality. *J Biol Chem.* 2002;277(45):43335-43.

300. Nicolaes GA, Tans G, Thomassen MC, Hemker HC, Pabinger I, Varadi K, et al. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem*. 1995;270(36):21158-66.
301. Comp PC, Esmon CT. Activated protein C inhibits platelet prothrombin-converting activity. *Blood*. 1979;54(6):1272-81.
302. Mosnier LO, Griffin JH. Protein C anticoagulant activity in relation to anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. *Front Biosci*. 2006;11:2381-99.
303. Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood*. 2005;105(8):3178-84.
304. Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*. 1989;264(28):16378-82.
305. Xiang RF, Stack D, Huston SM, Li SS, Ogbomo H, Kyei SK, et al. Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate (Rac) and Src Family Kinases (SFK) Are Proximal and Essential for Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Activation in Natural Killer (NK) Cell-mediated Direct Cytotoxicity against *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem*. 2016;291(13):6912-22.
306. Simon AR, Vikis HG, Stewart S, Fanburg BL, Cochran BH, Guan KL. Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase. *Science*. 2000;290(5489):144-7.
307. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem*. 2007;282(13):9358-63.
308. Barki-Harrington L, Rockman HA. Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators. *Physiology (Bethesda)*. 2008;23:17-22.
309. Welch HC, Coadwell WJ, Stephens LR, Hawkins PT. Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett*. 2003;546(1):93-7.
310. Esmon CT. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32 Suppl 1:49-60.
311. López-Sagasetta J, Puy C, Tamayo I, Allende M, Cerveró J, Velasco SE, et al. sPLA2-V inhibits EPCR anticoagulant and antiapoptotic properties by accommodating lysophosphatidylcholine or PAF in the hydrophobic groove. *Blood*. 2012;119(12):2914-21.
312. Oganessian V, Oganessian N, Terzyan S, Qu D, Dauter Z, Esmon NL, et al. The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. *J Biol Chem*. 2002;277(28):24851-4.
313. Nicolaes GA, Bock PE, Segers K, Wildhagen KC, Dahlbäck B, Rosing J. Inhibition of thrombin formation by active site mutated (S360A) activated protein C. *J Biol Chem*. 2010;285(30):22890-900.
314. Wildhagen KC, Schrijver R, Beckers L, ten Cate H, Reutelingsperger CP, Lutgens E, et al. Effects of exogenous recombinant APC in mouse models of ischemia reperfusion injury and of atherosclerosis. *PLoS One*. 2014;9(7):e101446.
315. Espana F, Medina P, Navarro S, Zorio E, Estellés A, Aznar J. The multifunctional protein C system. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005;3(2):119-31.
316. Mosnier LO, Griffin JH. Inhibition of staurosporine-induced apoptosis of endothelial cells by activated protein C requires protease-activated receptor-1 and endothelial cell protein C receptor. *Biochem J*. 2003;373(Pt 1):65-70.
317. Liang HP, Kerschen EJ, Hernandez I, Basu S, Zogg M, Botros F, et al. EPCR-dependent PAR2 activation by the blood coagulation initiation complex regulates LPS-triggered interferon responses in mice. *Blood*. 2015;125(18):2845-54.
318. Oosting JD, Derksen RH, Bobbink IW, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood*. 1993;81(10):2618-25.
319. Molinar-Inglis O, Birch CA, Nicholas D, Orduña-Castillo L, Cisneros-Aguirre M, Patwardhan A, et al. aPC/PAR1 confers endothelial anti-apoptotic activity via a discrete,  $\beta$ -arrestin-2-mediated SphK1-S1PR1-Akt signaling axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(49).

320. Kisiel W, Canfield WM, Ericsson LH, Davie EW. Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry*. 1977;16(26):5824-31.
321. Thiyagarajan M, Cheng T, Zlokovic BV. Endothelial cell protein C receptor: role beyond endothelium? *Circ Res*. 2007;100(2):155-7.
322. Hwang KK, Yang CD, Yan W, Grossman JM, Hahn BH, Chen PP. A thrombin-cross-reactive anticardiolipin antibody binds to and inhibits the anticoagulant function of activated protein C. *Arthritis Rheum*. 2003;48(6):1622-30.
323. Borrell M, Sala N, de Castellarnau C, Lopez S, Gari M, Fontcuberta J. Immunoglobulin fractions isolated from patients with antiphospholipid antibodies prevent the inactivation of factor Va by activated protein C on human endothelial cells. *Thromb Haemost*. 1992;68(3):268-72.
324. Urbanus RT, de Laat B. Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway. *Lupus*. 2010;19(4):394-9.
325. Green D. Pathophysiology of Antiphospholipid Syndrome. *Thromb Haemost*. 2022;122(7):1085-95.
326. Araújo DM, Rodrigues CEM, Gonçalves NGG, Rabelo-Júnior CN, Lobo MDP, Moreira RA, et al. Proteins Involved in the Induction of Procoagulant Activity and Autoimmune Response in Patients With Primary Antiphospholipid Syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2020;26:1076029620905338.
327. Misasi R, Longo A, Recalchi S, Caissutti D, Riitano G, Manganelli V, et al. Molecular Mechanisms of "Antiphospholipid Antibodies" and Their Paradoxical Role in the Pathogenesis of "Seronegative APS". *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
328. Marciniak E, Romond EH. Impaired catalytic function of activated protein C: a new in vitro manifestation of lupus anticoagulant. *Blood*. 1989;74(7):2426-32.
329. Cariou R, Tobelem G, Bellucci S, Soria J, Soria C, Maclouf J, et al. Effect of lupus anticoagulant on antithrombotic properties of endothelial cells--inhibition of thrombomodulin-dependent protein C activation. *Thromb Haemost*. 1988;60(1):54-8.
330. Kremers RMW, Zuily S, Kelchtermans H, Peters TC, Bloemen S, Regnault V, et al. Prothrombin conversion is accelerated in the antiphospholipid syndrome and insensitive to thrombomodulin. *Blood Adv*. 2018;2(11):1315-24.
331. Malia RG, Kitchen S, Greaves M, Preston FE. Inhibition of activated protein C and its cofactor protein S by antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol*. 1990;76(1):101-7.
332. Merrill JT, Zhang HW, Shen C, Butman BT, Jeffries EP, Lahita RG, et al. Enhancement of protein S anticoagulant function by beta2-glycoprotein I, a major target antigen of antiphospholipid antibodies: beta2-glycoprotein I interferes with binding of protein S to its plasma inhibitor, C4b-binding protein. *Thromb Haemost*. 1999;81(5):748-57.
333. Muller-Calleja N, Hollerbach A, Hauser F, Canisius A, Orning C, Lackner KJ. Antiphospholipid antibody-induced cellular responses depend on epitope specificity : implications for treatment of antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2017;15(12):2367-76.
334. Bingley PJ, Hoffbrand BI. Antiphospholipid antibody syndrome: a review. *J R Soc Med*. 1987;80(7):445-8.
335. Prophylaxe der venösen Thromboembolie (VTE). *Vasa*. 2016;45 Suppl 92:1-88.
336. Leizorovicz A, Turpie AG, Cohen AT, Wong L, Yoo MC, Dans A. Epidemiology of venous thromboembolism in Asian patients undergoing major orthopedic surgery without thromboprophylaxis. The SMART study. *J Thromb Haemost*. 2005;3(1):28-34.
337. Oger E, Leroyer C, Le Moigne E, Pomey MP, Bressollette L, Clavier J, et al. The value of a risk factor analysis in clinically suspected deep venous thrombosis. *Respiration*. 1997;64(5):326-30.
338. Tosetto A, Frezzato M, Rodeghiero F. Prevalence and risk factors of non-fatal venous thromboembolism in the active population of the VITA Project. *J Thromb Haemost*. 2003;1(8):1724-9.
339. Ruffatti A, Del Ross T, Ciprian M, Bertero MT, Sciascia S, Scarpato S, et al. Risk factors for a first thrombotic event in antiphospholipid antibody carriers: a prospective multicentre follow-up study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(6):1083-6.

340. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Testa S, Fierro T, Marongiu F, et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood*. 2011;118(17):4714-8.
341. Erkan D, Harrison MJ, Levy R, Peterson M, Petri M, Sammaritano L, et al. Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals. *Arthritis Rheum*. 2007;56(7):2382-91.
342. Bala MM, Paszek E, Lesniak W, Wloch-Kopec D, Jasinska K, Undas A. Antiplatelet and anticoagulant agents for primary prevention of thrombosis in individuals with antiphospholipid antibodies. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;7(7):Cd012534.
343. Knight JS, Branch DW, Ortel TL. Antiphospholipid syndrome: advances in diagnosis, pathogenesis, and management. *Bmj*. 2023;380:e069717.
344. Erkan D, Yazici Y, Peterson MG, Sammaritano L, Lockshin MD. A cross-sectional study of clinical thrombotic risk factors and preventive treatments in antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(8):924-9.
345. Tektonidou MG, Laskari K, Panagiotakos DB, Moutsopoulos HM. Risk factors for thrombosis and primary thrombosis prevention in patients with systemic lupus erythematosus with or without antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum*. 2009;61(1):29-36.
346. Hereng T, Lambert M, Hachulla E, Samor M, Dubucquoi S, Caron C, et al. Influence of aspirin on the clinical outcomes of 103 anti-phospholipid antibodies-positive patients. *Lupus*. 2008;17(1):11-5.
347. Arnaud L, Mathian A, Ruffatti A, Erkan D, Tektonidou M, Cervera R, et al. Efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies: an international and collaborative meta-analysis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(3):281-91.
348. Arnaud L, Mathian A, Devilliers H, Ruffatti A, Tektonidou M, Forastiero R, et al. Patient-level analysis of five international cohorts further confirms the efficacy of aspirin for the primary prevention of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies. *Autoimmun Rev*. 2015;14(3):192-200.
349. Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, Amoura Z, Cervera R, Costedoat-Chalumeau N, et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(10):1296-304.
350. Cohen H, Cuadrado MJ, Erkan D, Duarte-Garcia A, Isenberg DA, Knight JS, et al. 16th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Treatment Trends. *Lupus*. 2020;29(12):1571-93.
351. van Es N, Coppens M, Schulman S, Middeldorp S, Büller HR. Direct oral anticoagulants compared with vitamin K antagonists for acute venous thromboembolism: evidence from phase 3 trials. *Blood*. 2014;124(12):1968-75.
352. Pengo V, Denas G, Zoppellaro G, Jose SP, Hoxha A, Ruffatti A, et al. Rivaroxaban vs warfarin in high-risk patients with antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2018;132(13):1365-71.
353. Die örtlichen Vertreter der Zulassungsinhaber Bristol-Myers Squibb/Pfizer EEIG BILG, Bayer Pharma AG, GmbH DSE. Apixaban (Eliquis), Dabigatranetexilat (Pradaxa), Edoxaban (Lixiana/Roteas) und Rivaroxaban (Xarelto): Die Anwendung wird bei Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom aufgrund eines möglicherweise erhöhten Risikos für rezidivierende thrombotische Ereignisse nicht empfohlen. Schwarzeck-Verlag unter: Schwarzeck-Verlag GmbH, Einsteinring 24, 85609 Aschheim: Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft Fachausschuss der Bundesärztekammer Dezernat 1 – Ärztliche Versorgung und Arzneimittel; 2019 [Available from: [https://www.akdae.de/fileadmin/user\\_upload/akdae/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2019/20190523.pdf](https://www.akdae.de/fileadmin/user_upload/akdae/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2019/20190523.pdf).
354. Ambati A, Knight JS, Zuo Y. Antiphospholipid syndrome management: a 2023 update and practical algorithm-based approach. *Curr Opin Rheumatol*. 2023;35(3):149-60.
355. Woller SC, Stevens SM, Kaplan DA, Branch DW, Aston VT, Wilson EL, et al. Apixaban for the Secondary Prevention of Thrombosis Among Patients With Antiphospholipid Syndrome: Study Rationale and Design (ASTRO-APS). *Clin Appl Thromb Hemost*. 2016;22(3):239-47.

356. Woller SC, Stevens SM, Kaplan DA, M TR. Protocol Modification of Apixaban for the Secondary Prevention of Thrombosis Among Patients With Antiphospholipid Syndrome Study. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018;24(1):192.
357. Al Sulaiman K, Hafiz A, Badreldin HA, Korayem GB, Alsuwayyid F, Alrashidi Pharm DA, et al. Evaluation of Apixaban in Patients With Antiphospholipid Syndrome: A Case Series and Review of Literature. *J Investig Med High Impact Case Rep*. 2022;10:23247096221099893.
358. Balbi GGM, Pacheco MS, Monticielo OA, Funke A, Danowski A, Santiago MB, et al. Antiphospholipid Syndrome Committee of the Brazilian Society of Rheumatology position statement on the use of direct oral anticoagulants (DOACs) in antiphospholipid syndrome (APS). *Adv Rheumatol*. 2020;60(1):29.
359. Wu X, Cao S, Yu B, He T. Comparing the efficacy and safety of direct oral anticoagulants versus Vitamin K antagonists in patients with antiphospholipid syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2022;33(7):389-401.
360. McCormack T, Harrisingh MC, Horner D, Bewley S. Venous thromboembolism in adults: summary of updated NICE guidance on diagnosis, management, and thrombophilia testing. *Bmj*. 2020;369:m1565.
361. Zuily S, Cohen H, Isenberg D, Woller SC, Crowther M, Dufrost V, et al. Use of direct oral anticoagulants in patients with thrombotic antiphospholipid syndrome: Guidance from the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost*. 2020;18(9):2126-37.
362. Pastori D, Menichelli D, Cammisotto V, Pignatelli P. Use of Direct Oral Anticoagulants in Patients With Antiphospholipid Syndrome: A Systematic Review and Comparison of the International Guidelines. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:715878.
363. Linnemann B. Antiphospholipid syndrome - an update. *Vasa*. 2018;47(6):451-64.
364. Arachchillage DRJ, Laffan M. Pathogenesis and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol*. 2017;178(2):181-95.
365. Erkan D, Willis R, Murthy VL, Basra G, Vega J, Ruiz-Limón P, et al. A prospective open-label pilot study of fluvastatin on proinflammatory and prothrombotic biomarkers in antiphospholipid antibody positive patients. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(6):1176-80.
366. Kumar D, Roubey RA. Use of rituximab in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep*. 2010;12(1):40-4.
367. Erkan D, Vega J, Ramón G, Kozora E, Lockshin MD. A pilot open-label phase II trial of rituximab for non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*. 2013;65(2):464-71.
368. Berman H, Rodríguez-Pintó I, Cervera R, Morel N, Costedoat-Chalumeau N, Erkan D, et al. Rituximab use in the catastrophic antiphospholipid syndrome: descriptive analysis of the CAPS registry patients receiving rituximab. *Autoimmun Rev*. 2013;12(11):1085-90.
369. Kronbichler A, Frank R, Kirschfink M, Szilágyi Á, Csuka D, Prohászka Z, et al. Efficacy of eculizumab in a patient with immunoabsorption-dependent catastrophic antiphospholipid syndrome: a case report. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(26):e143.
370. Lonze BE, Zachary AA, Magro CM, Desai NM, Orandi BJ, Dagher NN, et al. Eculizumab prevents recurrent antiphospholipid antibody syndrome and enables successful renal transplantation. *Am J Transplant*. 2014;14(2):459-65.
371. Canaud G, Kamar N, Anglicheau D, Esposito L, Rabant M, Noël LH, et al. Eculizumab improves posttransplant thrombotic microangiopathy due to antiphospholipid syndrome recurrence but fails to prevent chronic vascular changes. *Am J Transplant*. 2013;13(8):2179-85.
372. Canaud G, Bienaimé F, Tabarin F, Bataillon G, Seilhean D, Noël LH, et al. Inhibition of the mTORC pathway in the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2014;371(4):303-12.
373. Finazzi G, Marchioli R, Brancaccio V, Schinco P, Wisloff F, Musial J, et al. A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS). *J Thromb Haemost*. 2005;3(5):848-53.

374. Crowther MA, Ginsberg JS, Julian J, Denburg J, Hirsh J, Douketis J, et al. A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med.* 2003;349(12):1133-8.
375. Pengo V, Denas G, Banzato A, Bison E, Bracco A, Facchinetti M, et al. Secondary prevention in thrombotic antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2012;21(7):734-5.
376. Manukyan D, Müller-Calleja N, Jäckel S, Luchmann K, Mönnikes R, Kiouptsi K, et al. Cofactor-independent human antiphospholipid antibodies induce venous thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2016;14(5):1011-20.
377. Prinz N, Clemens N, Canisius A, Lackner KJ. Endosomal NADPH-oxidase is critical for induction of the tissue factor gene in monocytes and endothelial cells. Lessons from the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2013;109(3):525-31.
378. Müller-Calleja N, Köhler A, Siebald B, Canisius A, Orning C, Radsak M, et al. Cofactor-independent antiphospholipid antibodies activate the NLRP3-inflammasome via endosomal NADPH-oxidase: implications for the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2015;113(5):1071-83.
379. Lackner KJ, Muller-Calleja N. Cofactor-Independent Antiphospholipid Antibodies: Implications for Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Antiphospholipid Syndrome. *Hamostaseologie.* 2019;39(2):188-94.
380. Lackner KJ, Muller-Calleja N. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome revisited: time to challenge the dogma. *J Thromb Haemost.* 2016;14(6):1117-20.
381. Lackner KJ, Muller-Calleja N. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: comment. *J Thromb Haemost.* 2018;16(10):2115-6.
382. Lackner KJ, Manukyan D, Muller-Calleja N. Endosomal Redox Signaling in the Antiphospholipid Syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2017;19(4):20.
383. Lackner KJ, Manukyan D, Muller-Calleja N. Pathophysiological insights into the antiphospholipid syndrome. *Hamostaseologie.* 2017;3(3):202-7.
384. Prinz N, Häuser F, Lorenz M, Lackner KJ, von Landenberg P. Structural and functional characterization of a human IgG monoclonal antiphospholipid antibody. *Immunobiology.* 2011;216(1-2):145-51.
385. Wild PS, Zeller T, Beutel M, Blettner M, Dugi KA, Lackner KJ, et al. [The Gutenberg Health Study]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2012;55(6-7):824-9.
386. Gutenberg-Gesundheitsstudie Id. Studienzentrum der Gutenberg-Gesundheitsstudie Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; [12.01.2025]. Available from: <https://www.unimedizin-mainz.de/ghs/willkommen.html>.
387. Ten Cate V, Koeck T, Panova-Noeva M, Rapp S, Prochaska JH, Lenz M, et al. A prospective cohort study to identify and evaluate endotypes of venous thromboembolism: Rationale and design of the Genotyping and Molecular Phenotyping in Venous ThromboEmbolism project (GMP-VTE). *Thromb Res.* 2019;181:84-91.
388. Pallares Robles A, Ten Cate V, Lenz M, Schulz A, Prochaska JH, Rapp S, et al. Unsupervised clustering of venous thromboembolism patients by clinical features at presentation identifies novel endotypes that improve prognostic stratification. *Thromb Res.* 2023;227:71-81.
389. Determann H. Gelchromatographie : Gelfiltration, Gelpermeation, Molekülsiebe. Berlin u.a.1967.
390. Ó'Fágáin C, Cummins PM, O'Connor BF. Gel-Filtration Chromatography. *Methods Mol Biol.* 2017;1485:15-25.
391. Mayerhöfer TG, Pahlow S, Popp J. The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. *Chemphyschem.* 2020;21(18):2029-46.
392. Lexikon der Optik in zwei Bänden : 2. M bis Z. In: Paul H, editor. Heidelberg u.a.1999.
393. Olesen H. Properties and units in the clinical laboratory sciences. I. Syntax and semantic rules IUPAC--IFCC recommendations 1995. *Clin Chim Acta.* 1996;245(2):S5-21.
394. Field A. Discovering statistics using IBM SPSS statistics. Sage edge. 5th edition ed. Los Angeles2018.

395. Keya Rani D, Imon AHMR. A Brief Review of Tests for Normality. *American Journal of Theoretical and Applied Statistics*. 2016;5(1):5-12.
396. Vetter TR. Fundamentals of Research Data and Variables: The Devil Is in the Details. *Anesth Analg*. 2017;125(4):1375-80.
397. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2. ed. ed. Hillsdale, NJ u.a. 1988.
398. Cohen J. A power primer. *Psychol Bull*. 1992;112(1):155-9.
399. Statistics IS. Point-biserial correlations in SPSS <https://www.ibm.com/support/pages/point-biserial-correlations-spss>: IBM SPSS Statistics; [updated 16.04.2020; cited 2023 08.12.23]. Historical Number: 12724:[Document number: 417511]. Available from: <https://www.ibm.com/support/pages/point-biserial-correlations-spss>.
400. Cohen J. *Applied multiple regression, correlation analysis for the behavioral sciences*. 3. ed., rev. ed. ed. Mahwah, NJ u.a. 2003.
401. Wasserstein RL, Lazar NA. The ASA Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose. *The American Statistician*. 2016;70(2):129-33.
402. Pengo V, Biasiolo A, Bison E, Chantarangkul V, Tripodi A. Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res*. 2007;120(1):127-33.
403. Coulam CB, McIntyre JA, Wagenknecht D, Rote N. Interlaboratory inconsistencies in detection of anticardiolipin antibodies. *Lancet*. 1990;335(8693):865.
404. Peaceman AM, Silver RK, MacGregor SN, Socol ML. Interlaboratory variation in antiphospholipid antibody testing. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;166(6 Pt 1):1780-4; discussion 4-7.
405. Reber G, Arvieux J, Comby E, Degenne D, de Moerloose P, Sanmarco M, et al. Multicenter evaluation of nine commercial kits for the quantitation of anticardiolipin antibodies. The Working Group on Methodologies in Haemostasis from the GEHT (Groupe d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose). *Thromb Haemost*. 1995;73(3):444-52.
406. Favaloro EJ, Wheatland L, Jovanovich S, Roberts-Thomson P, Wong RC. Internal quality control and external quality assurance in testing for antiphospholipid antibodies: Part I - Anticardiolipin and anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38(4):390-403.
407. Dong J, Chang HD, Tokoyoda K, Radbruch A. [Immunological memory of the bone marrow]. *Z Rheumatol*. 2015;74(6):527-8.
408. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(1):34-46.
409. Böhm I. Increased peripheral blood B-cells expressing the CD5 molecules in association to autoantibodies in patients with lupus erythematosus and evidence to selectively down-modulate them. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(5):338-43.
410. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:253-300.
411. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):160-71.
412. Aggeler PM, Lindsay S, Lucia SP. Studies on the Coagulation Defect in a Case of Thrombocytopenic Purpura Complicated by Thrombosis. *Am J Pathol*. 1946;22(6):1181-203.
413. Ley AB, Reader G, Sorenson C, Overman R. Idiopathic hypoprothrombinemia associated with hemorrhagic diathesis, and the effect of vitamin K. *Blood*. 1951;6(8):740-55.
414. Ortiz Jiménez E, Loera Fragoso S, Rull Gabayet M. [Acquired inhibitors of coagulation in a patient with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies: response to rituximab]. *Reumatol Clin*. 2008;4(2):74-6.
415. Canoso RT, Hutton RA, Deykin D. A chlorpromazine-induced inhibitor of blood coagulation. *Am J Hematol*. 1977;2(2):183-91.
416. Canoso RT, Sise HS. Chlorpromazine-induced lupus anticoagulant and associated immunologic abnormalities. *Am J Hematol*. 1982;13(2):121-9.

417. Triplett DA, Brandt JT, Kaczor D, Schaeffer J. Laboratory diagnosis of lupus inhibitors: a comparison of the tissue thromboplastin inhibition procedure with a new platelet neutralization procedure. *Am J Clin Pathol.* 1983;79(6):678-82.
418. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood.* 1986;68(4):869-74.
419. Pengo V, Bison E, Banzato A, Zoppellaro G, Jose SP, Denas G. Lupus Anticoagulant Testing: Diluted Russell Viper Venom Time (dRVVT). In: Favaloro EJ, Lippi G, editors. *Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer New York; 2017. p. 169-76.
420. Thiagarajan P, Shapiro SS, De Marco L. Monoclonal immunoglobulin M lambda coagulation inhibitor with phospholipid specificity. Mechanism of a lupus anticoagulant. *J Clin Invest.* 1980;66(3):397-405.
421. Manoharan A, Gibson L, Rush B, Feery BJ. Recurrent venous thrombosis with a "lupus" coagulation inhibitor in the absence of systemic lupus. *Aust N Z J Med.* 1977;7(4):422-6.
422. Margolius A, Jr., Jackson DP, Ratnoff OD. Circulating anticoagulants: a study of 40 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1961;40:145-202.
423. Lechner K. Acquired inhibitors in nonhemophilic patients. *Haemostasis.* 1974;3(2):65-93.
424. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood.* 2005;106(7):2340-6.
425. Romay-Penabad Z, Montiel-Manzano MG, Shilagard T, Papalardo E, Vargas G, Deora AB, et al. Annexin A2 is involved in antiphospholipid antibody-mediated pathogenic effects in vitro and in vivo. *Blood.* 2009;114(14):3074-83.
426. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, Thomas GD, Yuhanna IS, Girardi G, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via  $\beta$ 2GPI and apoER2. *J Clin Invest.* 2011;121(1):120-31.
427. Romay-Penabad Z, Aguilar-Valenzuela R, Urbanus RT, Derksen RH, Pennings MT, Papalardo E, et al. Apolipoprotein E receptor 2 is involved in the thrombotic complications in a murine model of the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2011;117(4):1408-14.
428. de Groot PG, Meijers JC.  $\beta$ (2) -Glycoprotein I: evolution, structure and function. *J Thromb Haemost.* 2011;9(7):1275-84.
429. McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. Binding specificity of lupus anticoagulants and anticardiolipin antibodies. *Thromb Res.* 1988;52(6):609-19.
430. McNeil HP, Krilis SA, Chesterman CN. Purification of antiphospholipid antibodies using a new affinity method. *Thromb Res.* 1988;52(6):641-8.
431. Ruiz-Leon B, Navas A, Serrano P, Espinazo M, Guler I, Alonso C, et al. Helios-Negative Regulatory T Cells as a Key Factor of Immune Tolerance in Nonallergic Beekeepers. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2022;32(6):451-9.
432. Pengo V, Thiagarajan P, Shapiro SS, Heine MJ. Immunological specificity and mechanism of action of IgG lupus anticoagulants. *Blood.* 1987;70(1):69-76.
433. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ, et al. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *Embo j.* 1999;18(19):5166-74.
434. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, et al. Crystal structure of human beta2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *Embo j.* 1999;18(22):6228-39.
435. Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Koike T. Beta2-glycoprotein I, anti-beta2-glycoprotein I, and fibrinolysis. *Thromb Res.* 2004;114(5-6):461-5.
436. Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Thromb Haemost.* 1985;54(2):397-401.
437. Gropp K, Weber N, Reuter M, Micklisch S, Kopka I, Hallström T, et al.  $\beta$ <sub>2</sub>-glycoprotein I, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator. *Blood.* 2011;118(10):2774-83.

438. El-Assaad F, Krilis SA, Giannakopoulos B. Posttranslational forms of beta 2-glycoprotein I in the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb J*. 2016;14(Suppl 1):20.
439. Agar C, de Groot PG, Mörgelin M, Monk SD, van Os G, Levels JH, et al.  $\beta_2$ -glycoprotein I: a novel component of innate immunity. *Blood*. 2011;117(25):6939-47.
440. Pan SL, Tao KY, Guh JH, Sun HL, Huang DY, Chang YL, et al. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in PAR2-induced endothelial IL-8 production and leukocyte adhesion. *Shock*. 2008;30(5):496-502.
441. Rayees S, Rochford I, Joshi JC, Joshi B, Banerjee S, Mehta D. Macrophage TLR4 and PAR2 Signaling: Role in Regulating Vascular Inflammatory Injury and Repair. *Front Immunol*. 2020;11:2091.
442. Pendurthi UR, Rao LVM. Endothelial cell protein C receptor-dependent signaling. *Curr Opin Hematol*. 2018;25(3):219-26.
443. Schulte G, Shenoy SK.  $\beta$ -Arrestin and dishevelled coordinate biased signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(50):19839-40.
444. Frank B, Ariza L, Lamparter H, Grossmann V, Prochaska JH, Ullmann A, et al. Rationale and design of three observational, prospective cohort studies including biobanking to evaluate and improve diagnostics, management strategies and risk stratification in venous thromboembolism: the VTEval Project. *BMJ Open*. 2015;5(7):e008157.
445. Konstantinides SV, Barco S, Rosenkranz S, Lankeit M, Held M, Gerhardt F, et al. Late outcomes after acute pulmonary embolism: rationale and design of FOCUS, a prospective observational multicenter cohort study. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;42(4):600-9.
446. Panova-Noeva M, Wagner B, Nagler M, Koeck T, Ten Cate V, Eggebrecht L, et al. Variation of platelet function in clinical phenotypes of acute venous thromboembolism - Results from the GMP-VTE project. *J Thromb Haemost*. 2022;20(3):705-15.
447. Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH) U-PDmPW, M.Sc. VTEval-Projekt - Prospektive Kohortenstudie zur Evaluation von Diagnose, Behandlung und Krankheitsverlauf bei venösen thromboembolischen Erkrankungen Universitätsmedizin Mainz, Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH) [Available from: <https://www.unimedizin-mainz.de/cth/klinische-studien/vteval.html>].
448. VTEval Project - Three Observational, Prospective Cohort Studies Including Biobanking to Evaluate and Improve Diagnostics, Management Strategies and Risk Stratification in Venous Thromboembolism [Internet]. 2014. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02156401>.
449. Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH) U-PDSK. Follow-Up after Acute Pulmonary Embolism (FOCUS) - a Prospective Observational Multicenter Cohort Study [cited 2025 30.09.2025]. Available from: <https://www.unimedizin-mainz.de/cth/klinische-studien/focus.html>.
450. Stavros K. Nachbeobachtung nach akuter Lungenembolie – eine prospektive, beobachtende, multizentrische Kohortenstudie. *Deutsches Register Klinischer Studien*; 2014.
451. Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH) U-PDmPW, M.Sc. . FOCUS BioSeq – Biochemical and Genetic Biomarkers in Sequelae of Acute Pulmonary Embolism (FOCUS BioSeq) Study Universitätsmedizin Mainz, Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH) [cited 2025 30.09.2025]. Available from: <https://www.unimedizin-mainz.de/cth/klinische-studien/focus-bioseq.html>.
452. Mainz U, Prävention PKuM, Kardiologie Zf, 1 L, Mainz. <https://www.unimedizin-mainz.de/pkmp-cesm/forschung-studien/studien-biodatenbanken/focus-bioseq.html>: Präventive Kardiologie und Medizinische Prävention - Zentrum für Kardiologie Klinische Epidemiologie und Systemmedizin - Centrum für Thrombose und Hämostase; [27.01.2025]. Available from: <https://www.unimedizin-mainz.de/pkmp-cesm/forschung-studien/studien-biodatenbanken/focus-bioseq.html>.
453. Scientific TF. Qubit™ Protein BR Assay Kit User Guide <https://documents.thermofisher.com2021> [updated 14 June 2021; cited 19.09.2025 19.09.2025]. MAN0024790:[Available from: [https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0024790\\_QubitBR\\_ProteinAssay\\_UG.pdf](https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0024790_QubitBR_ProteinAssay_UG.pdf)].

454. Harris EN. Special report. The Second International Anti-cardiolipin Standardization Workshop/the Kingston Anti-Phospholipid Antibody Study (KAPS) group. *Am J Clin Pathol.* 1990;94(4):476-84.
455. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GR. Anticardiolipin antibody testing: the need for standardization. *Arthritis Rheum.* 1987;30(7):835-7.
456. Pierangeli SS, Harris EN. A quarter of a century in anticardiolipin antibody testing and attempted standardization has led us to here, which is? *Semin Thromb Hemost.* 2008;34(4):313-28.
457. Ichikawa K, Tsutsumi A, Atsumi T, Matsuura E, Kobayashi S, Hughes GR, et al. A chimeric antibody with the human gamma1 constant region as a putative standard for assays to detect IgG beta2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum.* 1999;42(11):2461-70.
458. Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, et al. Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations--a cooperative project of the European Antiphospholipid Forum. *Thromb Haemost.* 2001;86(2):575-83.
459. Favalaro EJ, Pasalic L, Lippi G. Classification Criteria for the Antiphospholipid Syndrome: Not the Same as Diagnostic Criteria for Antiphospholipid Syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2024;50(4):605-8.
460. Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014;12(5):792-5.
461. Hill AB. THE ENVIRONMENT AND DISEASE: ASSOCIATION OR CAUSATION? *Proc R Soc Med.* 1965;58(5):295-300.



