Respiratory Research

RESEARCH

Open Access

Decreased serpin C1 in extracellular vesicles predicts response to methotrexate treatment in patients with pulmonary sarcoidosis

Raisa Kraaijvanger[1†], Montse Janssen Bonás[1†], Jan C. Grutters[1,2], Ioanna Paspali[3], Marcel Veltkamp[1,2], Dominique P. V. de Kleijn[3] and Coline H. M. van Moorsel[1*]

Abstract

Background Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown etiology primarily affecting the lungs. Treatment is needed when disease symptoms worsen and organ function deteriorates. In pulmonary sarcoidosis, prednisone and methotrexate (MTX) are the most common anti-inflammatory therapies. However, there is large inter-patient variability in response to treatment, and predictive response markers are currently lacking.

Objective In this study, we investigated the predictive potential of biomarkers in extracellular vesicles (EVs) isolated from biobanked serum of patients with pulmonary sarcoidosis stored prior to start of therapy.

Methods Protein concentrations of a four-protein test panel of inflammatory proteins were measured in a discovery ($n=16$) and replication ($n=129$) cohort of patients with sarcoidosis and 47 healthy controls. Response to therapy was defined as an improvement of the absolute score of > 5% forced vital capacity (FVC) and/or > 10% diffusion lung of carbon monoxide (DLCO) after 24 weeks compared to baseline (before treatment).

Results Serum protein levels differed between EV fractions and serum, and between sarcoidosis cases and controls. Serpin C1 concentrations in the low density lipid particle EV fraction were lower at baseline in the group of patients with a good response to MTX treatment in both the discovery cohort ($p=0.059$) and in the replication cohort ($p=0.032$). EV Serpin C1 showed to be a significant predictor for response to treatment with MTX (OR 0.4; $p=0.032$).

Conclusion This study shows that proteins isolated from EVs harbor a distinct signal and have potential as new predictive therapy response biomarkers in sarcoidosis.

Keywords Extracellular vesicles, Sarcoidosis, Biomarkers, Therapy

Introduction

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown cause mainly affecting the lungs, intrathoracic lymph nodes, eyes and skin [1]. Diagnosis, monitoring, as well as predicting disease course or response to therapy is challenging in the management of patients with sarcoidosis. For decades, biomarkers such as angiotensin converting enzyme (ACE) and soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) have been studied to guide clinical management, unfortunately with modest sensitivity and specificity [2, 3]. Pharmacological treatment of sarcoidosis is initiated

†Raisa Kraaijvanger and Montse Janssen Bonás contributed equally to this work.

*Correspondence:
Coline H. M. van Moorsel
c.van.moorsel@antoniusziekenhuis.nl
[1] Department of Pulmonology, St Antonius Hospital, Interstitial Lung Diseases Center of Excellence, Nieuwegein, The Netherlands
[2] Division of Heart and Lungs, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands
[3] Department of Vascular Surgery, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands

© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

to prevent further specific organ damage or alleviate symptoms. Immunosuppressing and immunomodulating drugs, most often in the form of prednisone and methotrexate (MTX) are the first- and second-line choice of therapy. When initiating therapy however, it is not possible to predict the treatment response for individual patients upfront, while a significant part show no benefit from therapy. Personalized prediction of treatment response is a clinical unmet need in light of protecting patients from exposure to ineffective drugs and their side effects.

Sarcoidosis is characterized by the formation of non-caseating granulomas, persistent inflammation and activated monocytes/macrophages [4]. Macrophages form the core of the granuloma, producing inflammatory cytokines and chemokines to attract lymphocytes resulting in an inflammatory environment [5]. These macrophages originate from circulating bone-marrow derived monocytes which are patrolling antigen presenting cells but have a secondary function as a reservoir to replenish the macrophage pool in the tissues when needed. Several studies have highlighted an increased inflammatory status of monocytes in the blood of sarcoidosis patients [6–9]. This increased inflammatory status can also be induced through extracellular vesicles (EVs) as has been described previously by Wahlund et al. [9]. Furthermore, more monocytes are found in the circulation of patients with sarcoidosis and these cells have the capacity to activate other immune cells, not only through cell-cell interaction but also through monocyte derived EVs [10, 11]. Taken together, EVs isolated from whole blood serum may be particularly informative in sarcoidosis.

EV is an umbrella term for all vesicles found in body fluids, including exosomes, micro-vesicles and apoptotic bodies. In the last decade, it was found that EVs can functionally transfer molecules between cells [12]. EVs contain nucleic acids, lipids and proteins from the releasing cells and are often referred to as liquid biopsies [13, 14] reflecting the status/pathology of the releasing cell. EV proteins are often better associated with the pathology then the same freely circulating proteins in blood [15]. In the search for new potential biomarkers, there has been an increased interest in EVs [16–18]. Because of the relatively new stage of this emerging field of research there is a need for standardization in both methodology and technology to be able to validate the EV-associated biomarkers [19].

For this study a well-established EV-protein panel [20] was used, originally developed to predict adverse cardiovascular events. This panel consisted of four proteins, CD14, Serpin G1, Serpin C1 and Cysteine C. Although, the four proteins in this panel are mostly used in the field of cardiology, these proteins are also involved in inflammation and coagulation [21–27]. Therefore, this panel of proteins could be of interest in assessment of inflammation and prediction of response to immunosuppressive treatment in sarcoidosis. The proteins were originally measured in form of a multiplex, however, for this study the proteins were measured separately to investigate the associations of the individual proteins to response to treatment.

In this exploratory study, we investigated the potential of inflammatory biomarkers derived from serum-isolated fractions of EV using a well-established panel of proteins previously validated in EVs. The goal of the present study was three-fold. First, we investigated whether differences in levels of inflammatory biomarkers exist between EV-isolates and serum. Second, we investigated whether EV-derived biomarkers differ between patients with sarcoidosis and healthy controls. Third, we assessed whether these inflammatory biomarkers predict treatment response in patients using prednisone or MTX.

Materials and methods

Patients

Case and control samples were collected from the St. Antonius Hospital ILD biobank, screening all sarcoidosis patients ($n = 2265$) for eligibility. Cases were selected based on pulmonary treatment indication (decrease in lung function, dyspnea or pulmonary fibrogenesis), treatment with prednisone or MTX, and presence of serum collected within 6 months prior to start of treatment. 98 sarcoidosis patients were treated with MTX and 69 patients treated with prednisone. All patients were adults > 18 years with sarcoidosis diagnosed according to the international ATS/ERS/WASOG criteria [1].

Baseline characteristics (age at diagnosis, gender, comorbidities as reported in the medical records), lung function, Löfgren syndrome as well as organ manifestation were recorded up to 2 years after start of treatment. Based on the results of the recently reported SARCORT trial [28] as well as the sarcoidosis treatment score [29], an improvement of the absolute score of > 5% forced vital capacity (FVC) and/or > 10% diffusion lung of carbon monoxide (DLCO) after 24 weeks compared to baseline (before treatment) classified a patient as a "responder". All other patients were classified as "non-responder".

This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and GCP guidelines. The study was approved by the Medical research Ethics Committees United (MEC-U) of the St. Antonius Hospital (R05-08A) and written consent was obtained from all patients.

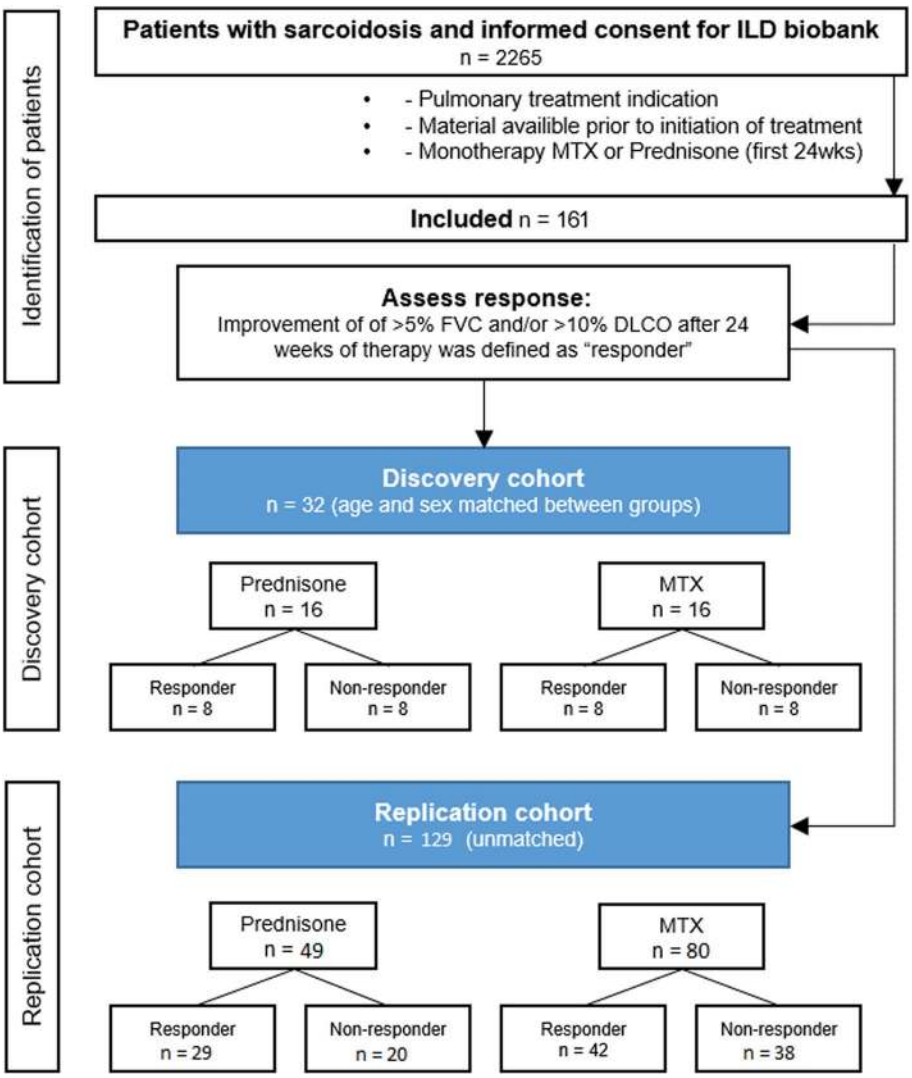

Fig. 1 Flowchart showing procedure for identification of patients and distribution of patients across the discovery and replication cohort. In brief, from 2265 patients with sarcoidosis and informed consent for ILD biobank 161 patients fulfilled the criteria to be included in the study. A total of 32 sex and age matched patients were selected for the discovery cohort. The remaining 129 patients were included in the replication cohort

Study cohorts

First the discovery cohort was composed, a cohort of 16 prednisone and 16 MTX cases which were matched on age, sex, ethnicity and smoking history as best as possible. For each treatment, eight patients were responders and eight patients were non-responders to therapy. The replication cohort consisted of the remainder 49 prednisone and 80 MTX cases. In the replication cohort the prednisone treated group consisted of 29 responders and 20 non-responders, and the MTX treated group consisted of 42 responders and 38 non-responders. In addition, 47 healthy control samples were included. The workflow is summarized in a flowchart in Fig 1.

Blood samples were collected before any treatment was given. Serum was isolated by the centrifugation of serum separator clot activator tubes at 1800 g for 5 minutes and stored at −80 °C in the St. Antonius Hospital BIOBANK until further use.

EV isolation

EV fraction isolation was based on the protocol of Dekker et al. [30]; however, here serum instead of plasma was used (see detailed description in the supplemental materials). EVs were isolated from 25 µL serum with the use of magnetic beads (Nanomag®-D plain, 130 mm (1:25) (Micromod). For sequential isolation of the fractions Dextran Sulphate (DS) (MP Biomedicals, Illkrich,

France) and Manganese (II) chloride ($MnCl_2$) solution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used. The presence of isolated EVs using this technique was previously confirmed with electron microscopy and western blotting [30–32]. Different fractions of EVs in serum were obtained by EV co-precipitation with monolayer low-density lipid particles (LDL fraction) and with bilayer membrane vesicles high-density lipid particles (HDL fraction). Previous performed experiments have shown that relatively small EVs (± 101 nm) are present in the LDL fraction while larger particles are found in the HDL fraction (± 120 nm) [30].

Protein concentration measurements

On a 96-wells plate, LDL, HDL and whole serum were measured simultaneously. Protein concentrations in EV fractions and serum were measured in a well-established protein panel consisting of: CD14, cystatin C, serpin C1 and serpin G1 [20]. Capture antibody, biotinylated detection antibody and antigen of all four proteins were purchased from R&D systems. Proteins were quantitatively analyzed by Luminex-based multiplex assay (Bio-Rad, Austin, USA). All EV protein levels were corrected for total amount of protein.

Statistical analysis

Non-parametric Mann-Whitney U test was used for non-normally distributed data. Categorical variables were compared using Chi-Squared and Fisher's exact test, where appropriate. Log transformed values of the protein levels were used to reduce the effect of skewness in the distribution of the protein-levels. To calculate the odds ratio and enable the direct comparison between different proteins, EV-protein levels were converted into standardized units, or the z-score, by using the observed value minus the mean value, divided by the standard deviation. To investigate the relationship between the protein levels and response to therapy, a logistic regression model was used with the outcome "response to medication". Spearman's rho correlations were calculated to assess direct relationships between protein concentrations and other parameters. For the analysis in the discovery cohort p-values < 0.1 were considered of significant interest, for the analysis with the replication cohort and the combined cohort p-values < 0.05 were considered significant.

Results

Discovery cohort

Baseline characteristics

Baseline characteristics of the age, sex, ethnicity and smoking history matched discovery cohort of the patient

Table 1 Baseline characteristics of discovery cohort of sarcoidosis patients with pulmonary treatment indication

Parameter		Prednisone treated group		Methotrexate treated group	
		Non-responding ($n=8$)	Responding ($n=8$)	Non-responding ($n=8$)	Responding ($n=8$)
Age[a] (years)		43.3 ± 6.7	37.4 ± 8.5	48.3 ± 7.0	52.6 ± 13.0
Male sex		5 (62.5)	5 (62.5)	5 (62.5)	5 (62.5)
Ever smoker		2 (25.0)	2 (25.0)	2 (25.0)	2 (25.0)
Caucasian		8 (100)	8 (100)	8 (100)	8 (100)
Lofgren syndrome		0 (0.0)	1 (12.5)	1 (12.5)	0 (0.0)
Scadding stage[b] 0/I/II/III/IV		1/2/2/1/2 (12.5/25/25/12.5/25)	1/1/3/1/2 (12.5/12.5/37.5/12.5/25)	0/1/5/0/2 (0/12.5/62.5/0/25)	0/1/4/1/2 (0/12.5/50/12.5/25)
Lung function[b]					
	FVC (%)	94.5 ± 28.5	81.8 ± 24.2	102.7 ± 11.6	89.0 ± 21.8
	DLCO (%)	75.8 ± 25.0	66.1 ± 13.2	86.1 ± 12.6*	55.5 ± 13.1*
Extra-pulmonary involvement					
	Lymph nodes	5 (62.5)	4 (50.0)	5 (62.5)	4 (50.0)
	Skin	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	1 (12.5)
	Liver	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)
	Spleen	1 (12.5)	1 (12.5)	1 (12.5)	0 (0.0)
	SFN	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Data is shown as whole numbers and percentages between brackets. Response to treatment was based on improvement in lung function (FVC %pred > 10% or DLCO %pred > 10%) after 6 months of treatment. Age, lung function, and biomarkers are shown as mean ± SD. [a]Age at time of blood withdrawal. [b]lung function and scadding stage were measured before start of treatment. Scadding stages: 0 = Normal chest radiograph; I = Bilateral hilar lymphadenopathy (BHL); II = BHL with pulmonary infiltrates; III = pulmonary infiltrates without BHL; IV = fibrosis. SFN: Small fiber neuropathy. DLCO (%) was significantly lower in patients responding to MTX therapy. *$p < 0.05$

groups treated with MTX or prednisone are shown in Table 1. For the MTX group the DLCO %pred was significantly lower in the responding group ($p=0.010$).

Differences in protein levels between EV and serum in sarcoidosis

The proteins from the protein test panel were measured in the EV-fractions LDL, HDL and in whole serum. Figure 2 shows the concentrations of the different proteins measured in the discovery cohort ($n=32$). Compared with EV-fractions, whole serum protein concentrations were higher for CD14, Cystatin C and Serpin C1, but not for Serpin G1. Furthermore, protein concentrations for Serpin G1 and Serpin C1 were lower in the HDL fraction than in the LDL faction.

EV-derived proteins are higher in sarcoidosis than in controls

The proteins from the protein test panel measured in the discovery cohort were compared to protein levels in healthy controls (HC) ($n=47$). Baseline characteristics are shown in Supplementary Table S1. The concentration of proteins was significantly higher in sarcoidosis patients compared to HC when measured in whole serum (Fig. 3). For the HDL EV-fraction only serpin C1 was significantly different between patients and HC. For the LDL fraction, a significant difference was observed for all proteins of

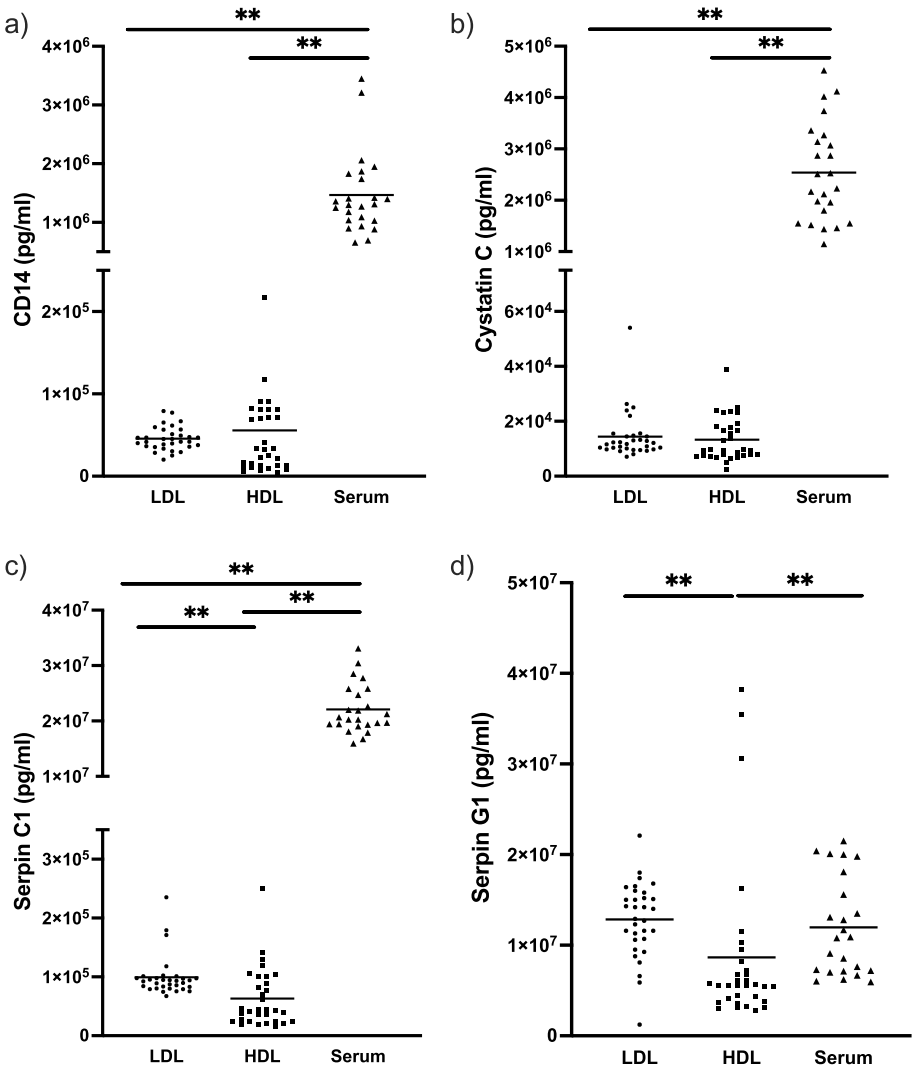

Fig. 2 Concentrations of proteins measured in different EV fractions (LDL and HDL) and in whole serum in the sarcoidosis discovery cohort ($n=32$). For all proteins except serpin G1 serum concentrations were higher compared to EV-fractions (LDL and HDL). For both serpin G1 and C1 there was a difference between concentrations in LDL and HDL. LDL = low-density lipid, HDL = high-density lipid. $^{**}p<0.005$

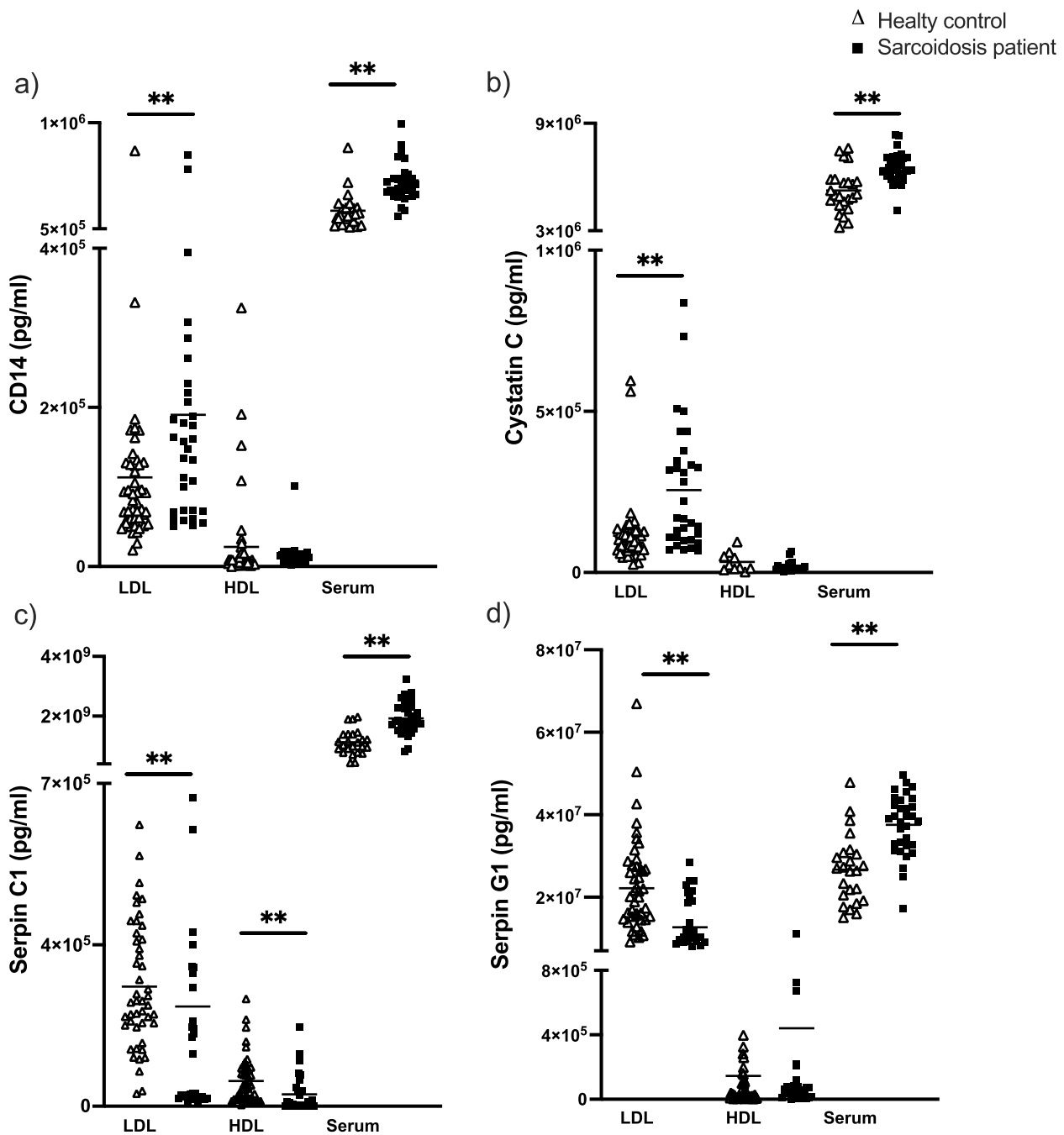

Fig. 3 Concentrations of proteins from EV-protein test panel. Light triangles represent healthy controls and dark squares represent sarcoidosis patients from the discovery cohort. **a** Concentrations of CD14; (**b**) concentrations of cystatin C; (**c**) concentrations of serpin C1; and (**d**) concentrations of serpin G1 measured in EV fractions LDL and HDL and in whole serum. LDL = low-density lipid, HDL = high-density lipid. $^{**}p < 0.005$

the test panel. When compared to healthy controls, the concentrations of CD14 and cystatin C were higher in the LDL fractions of patients while concentrations of both serpin proteins were lower in LDL fractions.

Response to treatment

In the prednisone discovery cohort no differences were found in protein concentrations between responders and non-responders in either LDL, HDL fractions or serum.

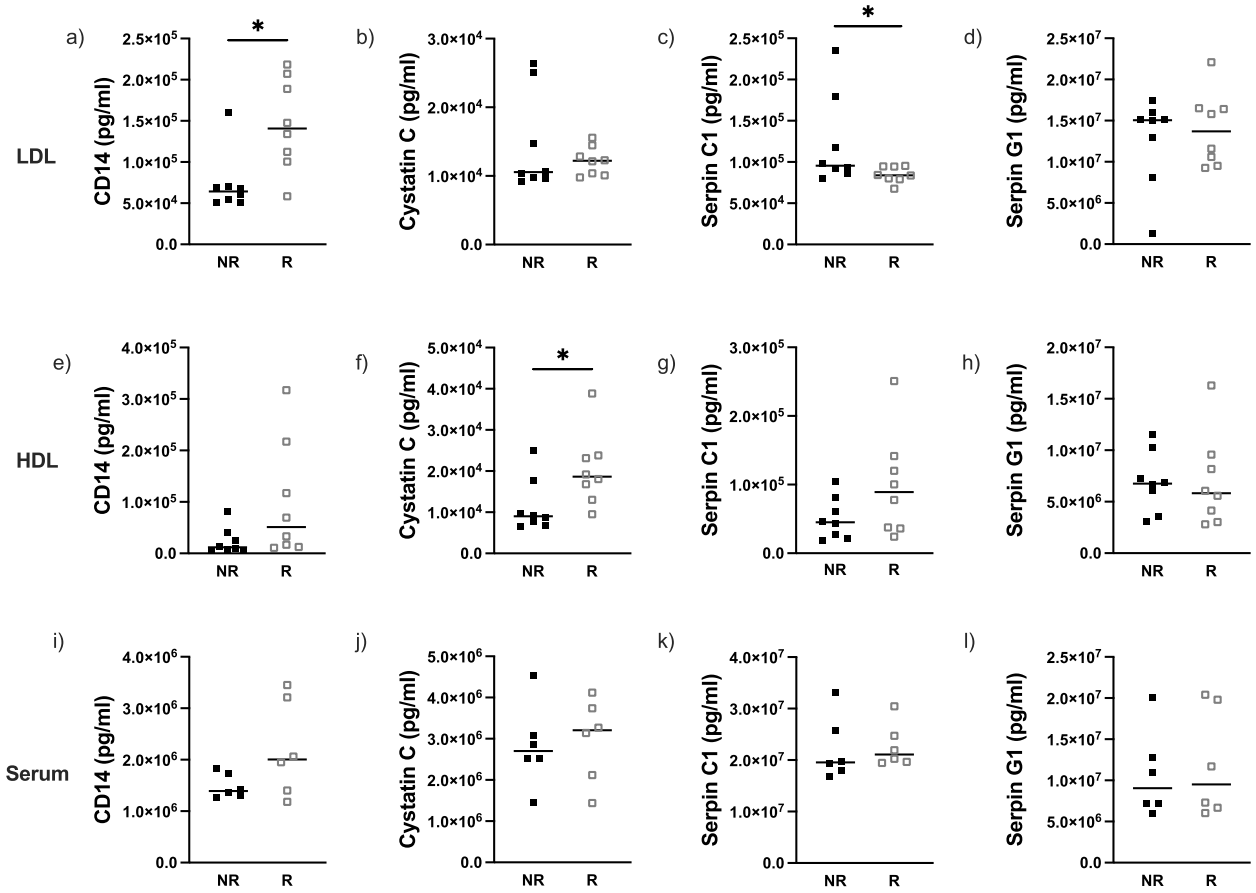

Fig. 4 Concentrations of proteins from EV-protein test panel in patients with sarcoidosis treated with methotrexate of the discovery cohort ($n=16$). Figures (**a**-**d**) represents EV-proteins measured in the LDL fraction, figures (**e**-**h**) EV-proteins measured in the HDL fraction and figures (**i**-**l**) proteins measured in whole serum. Filled squares represent non-responders (NR) and open squares represent responders (R) to treatment with methotrexate. *$p<0.1$

In the MTX discovery cohort, concentrations of serpin C1 were lower ($p=0.059$) in the group of responders while concentrations of CD14 were significantly higher in the group of patients classified as responders ($p=0.014$) in the LDL fraction. In the HDL fraction, cystatin C concentrations were lower in the group of patients classified as non-responders ($p=0.027$) (Fig. 4). No difference was found in serum protein levels of responders and non-responders (Supplementary Fig. S1).

Replication cohort

Baseline characteristics

In the second phase of the study, the EV proteins were quantified in a larger replication cohort of 80 sarcoidosis patients treated with methotrexate and 49 sarcoidosis patients treated with prednisone. Baseline characteristics are shown in Table 2. As with the discovery cohort, all included patients had a pulmonary treatment indication.

Supplementary Fig. S2 shows the concentrations of all proteins measured in the replication cohort. Regarding the proteins of interest identified in the discovery cohort, serpin C1 concentrations in the LDL fraction were significantly lower in the methotrexate responder than in the non-responder group of the replication cohort ($p=0.032$; Fig. 5a). Regarding CD14 in LDL and cystatin C in HDL, however, no difference between responders and non-responders was found ($p=0.091$ and $p=0.215$, respectively, Fig. 5b, c).

EV proteins to predict response to MTX

To determine the predictive value of serpin C1 for treatment response prediction we combined the MTX discovery and replication cohorts for further analysis. Values were log-transformed to stabilize the variance. Logistic regression revealed that serpin C1, when measured in the LDL sub fraction, was a significant predictor for response to treatment (OR 0.42 [95%CI 0.19–0.93] $p=0.032$).

Table 2 Baseline characteristics of the replication cohort of sarcoidosis patients with pulmonary treatment indication

Parameter		Prednisone treated group		Methotrexate treated group	
		Non-responding ($n=20$)	Responding ($n=29$)	Non-responding ($n=38$)	Responding ($n=42$)
Age[a] (years)		43.6 ± 10.0	43.5 ± 9.6	49.0 ± 10.0	47.9 ± 10.9
Male sex		14 (70.0)	21 (72.4)	23 (71.9)	25 (59.5)
Ever smoker		5 (31.3)	10 (47.6)	15 (60.0)	18 (52.9)
Caucasian		18 (90.0)	26 (92.9)	28 (90.3)	36 (90.0)
Lofgren syndrome		0 (0.0)	2 (7.1)	2 (6.3)	2 (4.8)
Scadding stage[b] 0/I/II/III/IV		0/2/12/1/4 (0/11/63/5/21)	0/5/14/1/7 (0/19/52/4/26)	2/3/11/1/12 (7/10/38/3/4130)	2/7/18/0/7 (6/20/53/0/21)
Lung function[b]					
	FVC (%)	94.5 ± 19.1	83.5 ± 20.4	97.1 ± 22.2	91.1 ± 23.1
	DLCO (%)	70.3 ± 16.3	66.6 ± 17.8	72.3 ± 15.0	67.7 ± 15.5
Extra-pulmonary involvement					
	Lymph nodes	12 (60.0)	16 (55.2)	22 (68.8)	28 (66.7)
	Skin	0 (0.0)	3 (10.3)	6 (18.8)	4 (9.5)
	Liver	1 (5.0)	1 (3.4)	5 (15.6)	6 (14.3)
	Spleen	5 (25.0)	5 (17.2)	7 (21.9)	7 (16.7)
	SFN	4 (20.0)	2 (6.9)	5 (15.6)	3 (7.1)

Data is shown as whole numbers and percentages between brackets. Response to treatment was based on improvement in lung function (FVC %pred > 10% or DLCO %pred > 10%) after 6 months of treatment. Age, lung function, and biomarkers are shown as mean ± SD. [a]Age at time of blood withdrawal. [b]lung function and scadding stage were measured before start of treatment. Scadding stages: 0 = Normal chest radiograph; I = Bilateral hilar lymphadenopathy (BHL); II = BHL with pulmonary infiltrates; III = pulmonary infiltrates without BHL; IV = fibrosis. SFN: Small fiber neuropathy

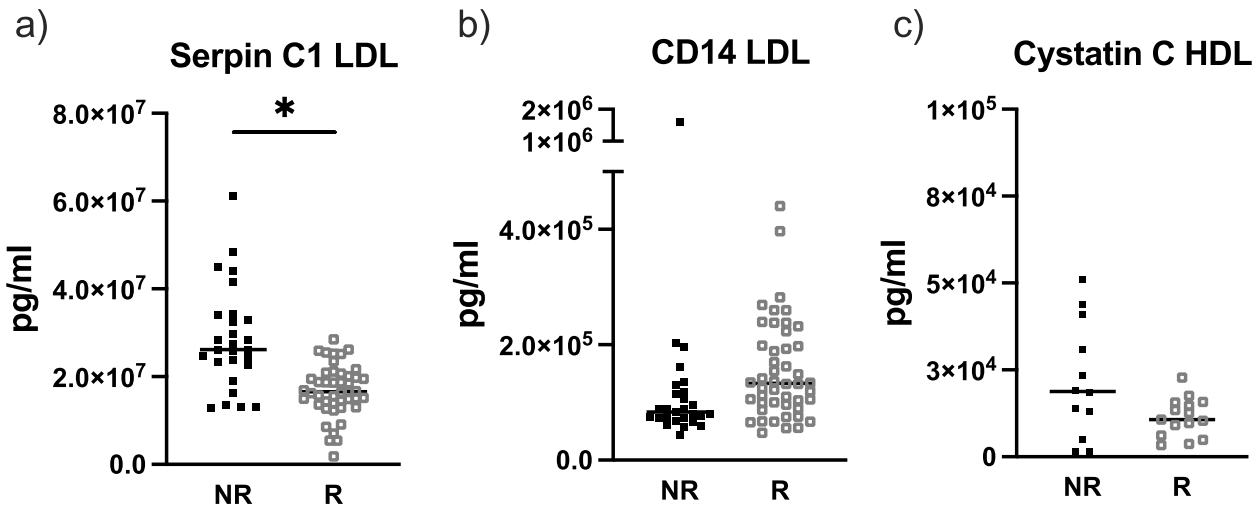

Fig. 5 Concentrations of EV proteins in patients with sarcoidosis treated with methotrexate of the replication cohort ($n=82$), measured in different EV fractions as well as in whole serum. Figure (**a**) represents concentrations of Serpin C1 in the LDL fraction; figure (**b**) concentrations of CD14 in the LDL fraction, and figure (**c**) concentrations of cystatin C in the HDL fraction in non-responders and responders to treatment with methotrexate. Serpin C1 concentrations were significantly higher in non-responders than in responders ($p=0.032$). Black filled squares represent non-responders (NR) and gray open squares represent responders (R) to treatment with methotrexate. *$p<0.05$

To investigate if there was a direct relation, Spearman's rank correlations were computed to assess the relation between change in FVC 6 months after initiation of MTX therapy and protein concentrations at baseline. There was a positive correlation between change in FVC and CD14 concentrations in the LDL fraction, ($R=0.35$; $p=0.004$). None of the other proteins directly correlated with change in FVC and no correlation was found for change in DLCO.

Discussion

In this study, we showed that concentrations of proteins in serum and in EVs fractions isolated from serum can differ significantly from each other and that this depends on the analyzed protein. Second, we found that levels of proteins in EV fractions differed significantly between sarcoidosis and healthy controls. Third, we showed that EV proteins, and particularly serpin C1 in the LDL

EV-fraction is significantly lower at baseline in the group of patients that responded to treatment with MTX, which we verified in a second cohort. Baseline serpin C1 was shown to be a marker with predictive value of response to MXT therapy.

Our data demonstrates that measuring proteins specifically in EV can provide novel information in sarcoidosis research compared to measuring the same proteins in serum alone. Although EVs have the disadvantage of an extra isolation step, they do also have advantages such as stability, easy accessibility and minimal sample volumes [18]. Furthermore, EVs are increasingly recognized to contain proteins involved in cellular processes directly linked to disease pathogenesis [33].

The difference in protein expression between patients and healthy controls is more evident in the LDL fraction than in the HDL fraction. A possible explanation for this observation lies in the difference in composition of the vesicles, HDL vesicles are larger and are suggested to contain more proteins from the originating cells [34, 35]. While the LDL fraction consist of smaller EVs including exosomes which are released by activated immune cells and have the capacity to activate other immune cells. The overly active immune system in sarcoidosis patients could lead to an increased release in exosomes eventually resulting in higher EV protein concentrations in patients versus healthy controls [36]. Protein concentrations of pro-inflammatory cytokines CD14 and Cystatin C have been shown to be elevated in multiple inflammatory disorders [37, 38] and were also elevated in the LDL fraction in sarcoidosis patients compared to healthy controls. Both serpin C1 and G1 were elevated in healthy controls. These serpins exert anti-inflammatory properties [21, 39]. However, as previous research describes a decrease in EV numbers with advancing age [40]. We also have to take into account the possibility of an age effect on the differences in EV-protein concentrations between patients and healthy controls, since the healthy controls were significantly younger. When comparing the concentrations of the proteins with the age of the healthy control subject, none of the proteins correlated with age resulting in a minimal impact of age on the difference in EV-protein concentrations between patients and healthy controls.

In light of diagnostic potential of these biomarkers, there was no added value of EV over serum since all four proteins also differed significantly between patients and healthy controls in serum. Further analysis, using serum samples from time of diagnosis from patients with sarcoidosis and differential diagnoses are needed to determine the diagnostic potential of the markers. The EV proteins in our panel are general inflammation markers, found on the cell surface, shed from the cells or actively involved in cellular inflammatory processes. Therefore, it is not surprising that we found a difference in protein concentrations between healthy controls and patients. However, an interesting finding was made for serpin C1. In the LDL and HDL EV-fractions, serpin C1 concentrations were lower in patients than in controls, while in whole serum, the serpin C1 concentration was higher in patients than in controls. The effect of serpin C1 is different in the circulation than as a cellular surface maker, where it has an increased anti-inflammatory effect. As previously suggested, more serpin C1 may have been shed in patients with sarcoidosis compared to healthy controls [41], which corresponds to our increased levels in the serum of patients.

Further aim of investigation was to assess whether protein concentrations in EV could have a predictive value for response to therapy. To assess this, patients receiving either prednisone or MTX were divided in responders and non-responders, based on change in lung function. The protein test panel revealed no difference in EV-fractions between responders and non-responders in the group of patients treated with prednisone. For the patient group treated with MTX, Serpin C1 concentrations were significantly lower in the group of patients responding to treatment while CD14 concentrations were higher in the responder group, unfortunately for CD14 the difference between responders and non-responder was no longer significant. In addition, we found a positive correlation between CD14 concentrations at baseline and change in FVC over the course of 6 months of MTX treatment ($p=0.004$). This protein was previously identified as an EV marker for sarcoidosis by Futami et al., who described CD14 levels in EVs to be significantly increased in patients with sarcoidosis and showed that CD14 was up-regulated in the process of granuloma formation [42]. In MTX treated patients with RA a positive correlation has been described between the concentration of soluble CD14 (sCD14) and response to MTX, RA patients with the highest sCD14 concentration at baseline responded best to MTX treatment. Our findings suggest a similar effect as responders have the highest concentration of CD14 in the vesicles at baseline and this correlates with highest change in FVC [43]. In future, it would be interesting to see how the CD14 concentration in EVs behave during the 6 months of treatment. However, due to lack of follow-up samples we were unable to measure this.

Serpin C1 was the only of the four proteins with a difference in baseline concentration between responders and non-responders to treatment with MTX in both the discovery and the replication cohort. Significantly lower protein concentrations of serpin C1 were found in the LDL EV-fraction of patients responding to MTX treatment than in non-responding patients.

Serpin C1, also known as antithrombin III (AT III), is a protein involved in inhibition of activation of protease-activated receptors (PARs) by thrombin resulting in anti-inflammatory activity [26]. MTX has been described to exert its immunomodulatory properties through inhibition or activation of a number of pathways, including the adenosine monophosphate protein kinase (AMPK) signaling pathway [44]. Part of the anti-inflammatory effect of serpin C1 exerts part of its anti-inflammatory effect through activation of the AMPK signaling pathway [45]. Upregulation of the AMPK signaling pathway leads to inhibition of nuclear factor-kB (NF-kB) signaling, consequently leading to AMPK downstream alterations in cytokine production and leukocyte activation [46]. In the group of sarcoidosis patients with an insufficient response to MTX we found higher concentrations of serpin C1 in the LDL fraction of the EVs. More serpin C1 activity could lead to upregulated signaling of the AMPK pathway. If the AMPK pathway is already upregulated in patients with higher concentrations of serpin C1 this could lead to a decrease in available ATP in the cells [47]. This ATP is needed for alteration of adenosine signaling as an effect of MTX therapy [48]. If there is less ATP available due to sustained AMPK activation due to serpin C1 activity, this could have a negative effect on the effectivity of MTX in terms of adenosine signaling.

Previous studies on EV in sarcoidosis has been performed with EVs isolated from broncho alveolar lavage fluid (BALF), resulting in EVs derived from the cells present in the airways and alveoli. From these studies, it was seen that EVs were more abundant and proteins were upregulated in BALF from patients compared to healthy controls [9, 49]. Because there is a difference in composition of immune cells in BALF versus blood there will subsequently be a difference in composition between BALF and serum EV. Nevertheless, BALF derived EV from sarcoidosis patients are capable of activating PBMCs of healthy controls in vitro as has been demonstrated by Wahlund et al. [9]. Although assessment of the pulmonary compartment may better reflect pulmonary inflammation, the use of EV derived from peripheral blood would increase clinical applicability in the future.

Our study has a number of limitations. Firstly, the study has a retrospective design; therefore, not all patient information was available, such as missing data on Scadding Stage. Secondly, the analysis was done using samples from one time point; before start of treatment. Protein concentrations may change over time, in response to disease activity. In case of serpin C1, it is not known how these levels behave prior to and after start of treatment with MTX. However, this article showed that biobanked samples of patients undergoing real world treatment are a valuable resource for EV biomarker discovery studies. Future dynamic and prospective studies are needed to further validate the value of this protein as a predictive biomarker for response to therapy.

Conclusion

This study showed that measuring inflammatory biomarkers in EV yield results highly different from measuring the same biomarkers in the original serum sample. EVs have high potential when searching for new diagnostic or predictive biomarkers in sarcoidosis. In future studies, serpin C1 deserves special attention as we found an association between EV-concentration of serpin C1 and treatment response in patients with pulmonary sarcoidosis treated with MTX.

Abbreviations

ACE	Angiotensin converting enzyme
AMPK	Adenosine monophosphate protein kinase
AT III	Antithrombin III
BALF	Broncho alveolar lavage fluid
DLCO	Diffusion lung of carbon monoxide
DS	Dextran sulphate
EVs	Extracellular vesicles
FVC	Forced vital capacity
HC	Healthy control
HDL	High-density lipid
LDL	Low-density lipid
MEC-U	Medical research ethics committees united
$MnCl_2$	Manganese (II) chloride
MTX	Methotrexate
NF-kB	Nuclear factor-kB
sIL-2R	Soluble interleukin-2 receptor

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12931-024-02809-y.

Additional file 1: Isolation of extracellular vesicle serum fractions. LDL and HDL fractions can be obtained from serum by a DS and MnCl2 solution of DS: 0.05%, MnCl2: 0.05 M and DS: 0.65%, MnCl2: 0.2 M, respectively. For LDL fraction isolation, 25uL serum was diluted in 95 µl phosphate buffered saline (PBS) (Gibco), followed by addition of 5 µL magnetic beads (Nanomag®-D plain, 130 mm (1:25) (Micromod)). DS and MnCl2 were added into the total volume of 125 µL and were mixed. The mixture was incubated 5 min at room temperature (RT). Subsequently, the samples were placed on a bio-plex handheld magnet (Bio-Rad) and incubated 15 min at RT. The formed pellet is LDL fraction. For HDL isolation, the protocol is repeated when using 115 µL supernatant above the LDL pellet. The pellets were lysed with 125 µL Roche complete lysis-M with protease inhibitors (Roche). To remove magnetic beads and other debris, samples were centrifugated at 3200×g, 10 min. **Table S1.** Baseline characteristics of discovery cohort of sarcoidosis patients with pulmonary treatment indication and healthy controls. **Fig. S1.** Concentrations of EV biomarkers in patients with sarcoidosis treated with prednisone of the discovery cohort ($n = 16$). Figures a-d) represent protein levels measured in the LDL fraction, figures e-h) represent protein levels measured in the HDL sub fraction and figures i-l) represent protein concentrations measured in whole serum. NR = non-responder, R = responder. **Fig. S2.** Concentrations of EV biomarkers in patients with pulmonary sarcoidosis treated with MTX of the replication cohort. Figures a-d) represent protein levels measured in the LDL fraction, figures e-h) represent protein levels measured in the HDL sub fraction, and figures i-l) represent protein levels measured in whole serum. NR = non-responder, R = responder. *$p < 0.05$.

Acknowledgements
Not applicable.

Authors' contributions
RK and MJB contributed to the design of the study, data acquisition and analysis, statistical analysis, drafting, and editing of the manuscript. IP contributed to data acquisition. JG supervised the project and edited the manuscript. MV participated in the design of the study, data interpretation, supervision and editing the manuscript. DdK supervised part of the project and edited the manuscript. CvM designed the study, supervised the project and edited the manuscript.

Funding
This study is funded by the Lung Foundation (nr 5.1.19.035), the Netherlands and by the St. Antonius Onderzoeksfonds (nr 21.07). Funders had no involvement in the study design; in the collection, analysis and interpretation of the data; in the writing of the report or in the decision to submit the paper for publication.

Availability of data and materials
The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate
This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and GCP guidelines. The study was approved by the Medical research Ethics Committees United (MEC-U) (R14.023) the local institutional review board (Z.19.004) of the St Antonius Hospital.

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Received: 3 November 2023 Accepted: 9 April 2024
Published online: 16 April 2024

References

1. Costabel U, Hunninghake GW. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis statement committee. American thoracic society. European respiratory society. World association for sarcoidosis and other granulomatous disorders. Eur Respir J. 1999;14:735–7. https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.14d02.x.
2. Korenromp IHE, Maier LA, Grutters JC. Sarcoidosis: serum and imaging biomarkers. Eur Respir monogr. 2022;96:107–21. https://doi.org/10.1183/2312508X.10031720.
3. Kraaijvanger R, Janssen Bonás M, Vorselaars A, Veltkamp M. Biomarkers in the diagnosis and prognosis of sarcoidosis: current use and future prospects. Front Immunol. 2020;11:1–17. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01443.
4. Chopra A, Kalkanis A, Judson MA. Biomarkers in sarcoidosis. Expert Rev Clin Immunol. 2016;12:1191–208. https://doi.org/10.1080/1744666X.2016.1196135.
5. Cinetto F, Scarpa R, Dell'Edera A, Jones MG. Immunology of sarcoidosis: old companions, new relationships. Curr Opin Pulm Med. 2020;26:535–43. https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000711.
6. Fraser SD, Hart SP. Monocytes and macrophages in chronic sarcoidosis pathology. Eur Respir J. 2019;54:1901626. https://doi.org/10.1183/13993003.01626-2019.
7. Fraser SD, Sadofsky LR, Kaye PM, Hart SP. Reduced expression of monocyte CD200R is associated with enhanced proinflammatory cytokine production in sarcoidosis. Sci Rep. 2016;6 https://doi.org/10.1038/srep38689.
8. Dubaniewicz A, Typiak M, Wybieralska M, Szadurska M, Nowakowski S, Staniewicz-Panasik A, Rogoza K, Sternau A, Deeg P, Trzonkowski P. Changed phagocytic activity and pattern of Fcγ and complement receptors on blood monocytes in sarcoidosis. Hum Immunol. 2012;73:788–94. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.05.005.
9. Wahlund CJE, Gucluler Akpinar G, Steiner L, Ibrahim A, Bandeira E, Lepzien R, Lukic A, Smed-Sörensen A, Kullberg S, Eklund A, et al. Sarcoidosis exosomes stimulate monocytes to produce pro-inflammatory cytokines and CCL2. Sci Rep. 2020;10 https://doi.org/10.1038/s41598-020-72067-7.
10. Roig-Arcos J, López-Malo D, Díaz-Llopis M, Romero FJ. Exosomes derived from stimulated monocytes promote endothelial dysfunction and inflammation in vitro. Ann Transl Med. 2017;5(258–258) https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.101.
11. Lepzien R, Nie M, Czarnewski P, Liu S, Yu M, Ravindran A, Kullberg S, Eklund A, Grunewald J, Smed-Sörensen A. Pulmonary and blood dendritic cells from sarcoidosis patients more potently induce IFNγ-producing Th1 cells compared with monocytes. J Leukoc Biol. 2022;111:857–66. https://doi.org/10.1002/JLB.5A0321-162R.
12. Dickhout A, Koenen RR. Extracellular vesicles as biomarkers in cardiovascular disease; chances and risks. Front Cardiovasc Med. 2018;5:113. https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00113.
13. Fujita Y, Kosaka N, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis. Trends Mol Med. 2015;21:533–42. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.07.004.
14. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles. Trends Cell Biol. 2017;27:172–88. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.003.
15. Buzas EI. The roles of extracellular vesicles in the immune system. Nat Rev Immunol. 2023;23:236–50. https://doi.org/10.1038/s41577-022-00763-8.
16. Carnino JM, Lee H. Extracellular vesicles in respiratory disease. Adv Clin Chem. 2022;108:105–27. https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2021.07.008.
17. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol. 2013;200. https://doi.org/10.1083/jcb.201211138.
18. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J Extracell Vesicles. 2018;7:1535750. https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750.
19. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, Emanueli C, Gasecka A, Hendrix A, Hill AF, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. Circ Res. 2017;120:1632–48. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309417.
20. Verwer MC, Mekke JM, Timmerman N, Van Der Pol QY, Frissen C, Pasterkamp G, De Borst GJ, Hazenberg CEVB, De Kleijn DPV. Plasma extracellular vesicle SerpinG1 and CD14 levels are associated with MACE and MALE in patients undergoing femoral endarterectomy. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2022;65:1–9. https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2022.10.045.
21. Oelschläger C, Römisch J, Staubitz A, Stauss H, Leithäuser B, Tillmanns H, Hölschermann H. Antithrombin III inhibits nuclear factor κB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. Blood. 2002;99:4015–20. https://doi.org/10.1182/blood.V99.11.4015.
22. Pforte A, Schiessler A, Gais P, Beer B, Ehlers M, Schutt C, Ziegler- Heitbrock HWL. Expression of CD14 correlates with lung function impairment in pulmonary sarcoidosis. Chest. 1994;105:349–54. https://doi.org/10.1378/chest.105.2.349.
23. Orlowski GM, Colbert JD, Sharma S, Bogyo M, Robertson SA, Rock KL. Multiple Cathepsins promote pro–IL-1β synthesis and NLRP3-mediated IL-1β activation. J Immunol. 2015;195:1685–97. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500509.
24. Bergantini L, d'Alessandro M, Cameli P, Carleo A, Landi C, Vietri L, Lanzarone N, Pieroni M, Sestini P, Bargagli E. Antithrombin III as predictive indicator of survival in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients treated with nintedanib: a preliminary study. Intern Med J. 2021;51:705–11. https://doi.org/10.1111/imj.14768.
25. Meyer-Siegler KL, Cox J, Leng L, Bucala R, Vera PL. Macrophage migration inhibitory factor anti-thrombin III complexes are decreased in bladder cancer patient serum: complex formation as a mechanism of inactivation. Cancer Lett. 2010;290:49–57. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.08.025.
26. Davis AE, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. Mol Immunol. 2008;45:4057–63. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.06.028.
27. Lubbers R, Sutherland JS, Goletti D, de Paus RA, Dijkstra DJ, van Moorsel CHM, Veltkamp M, Vestjens SMT, Bos WJW, Petrone L, et al. Expression and production of the SERPING1-encoded endogenous complement regulator

C1-inhibitor in multiple cohorts of tuberculosis patients. Mol Immunol. 2020;120:187–95. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.02.006.
28. Dhooria S, Sehgal IS, Agarwal R, Muthu V, Prasad KT, Dogra P, Debi U, Garg M, Bal A, Gupta N, et al. High-dose (40 mg) versus low-dose (20 mg) prednisolone for treating sarcoidosis: a randomised trial (SARCORT trial). Eur Respir J. 2023;62 https://doi.org/10.1183/13993003.00198-2023.
29. Baughman RP, Tillinger M, Qin Y, Sweiss N, Lower EE. A composite score to assess treatment response in pulmonary sarcoidosis: the sarcoidosis treatment score (STS). Sarcoidosis Vasc Diffus Lung Dis. 2019;36:86–8. https://doi.org/10.36141/svdld.v36i1.7748.
30. Dekker M, Waissi F, van Bennekom J, Silvis MJM, Timmerman N, IEM B, Walter JE, Mueller C, Schoneveld AH, Schiffelers RM, et al. Plasma extracellular vesicle proteins are associated with stress-induced myocardial ischemia in women presenting with chest pain. Sci Rep. 2020;10:1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69297-0.
31. Wang JW, Zhang YN, Sze SK, van de Weg SM, Vernooij F, Schoneveld AH, Tan SH, Versteeg HH, Timmers L, Lam CSP, et al. Lowering low-density lipoprotein particles in plasma using dextran sulphate co-precipitates procoagulant extracellular vesicles. Int J Mol Sci. 2018;19 https://doi.org/10.3390/ijms19010094.
32. Zhang YN, Vernooij F, Ibrahim I, Ooi S, Gijsberts CM, Schoneveld AH, Sen KW, Den Ruijter HM, Timmers L, Richards AM, et al. Extracellular vesicle proteins associated with systemic vascular events correlate with heart failure: an observational study in a dyspnoea cohort. PLoS One. 2016;11 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148073.
33. Han C, Yang J, Sun J, Qin G. Extracellular vesicles in cardiovascular disease: biological functions and therapeutic implications. Pharmacol Ther. 2022;233:1–44. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108025.
34. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. Cell Mol Neurobiol. 2016;36:301–12. https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z.
35. Carnino JM, Lee H, Jin Y. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. Respir Res. 2019;20:240. https://doi.org/10.1186/s12931-019-1210-z.
36. Hazrati A, Soudi S, Malekpour K, Mahmoudi M, Rahimi A, Hashemi SM, Varma RS. Immune cells-derived exosomes function as a double-edged sword: role in disease progression and their therapeutic applications. Biomark Res. 2022;10:1–25. https://doi.org/10.1186/s40364-022-00374-4.
37. Zi M, Xu Y. Involvement of cystatin C in immunity and apoptosis. Immunol Lett. 2018;196:80–90. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.006.
38. Wu Z, Zhang Z, Lei Z, Lei P. CD14: biology and role in the pathogenesis of disease. Cytokine Growth Factor Rev. 2019;48:24–31. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.06.003.
39. Cicardi M, Zingale L, Zanichelli A, Pappalardo E, Cicardi B. C1 inhibitor: molecular and clinical aspects. Springer Semin Immunopathol. 2005;27:286–98. https://doi.org/10.1007/s00281-005-0001-4.
40. Eitan E, Green J, Bodogai M, Mode NA, Bæk R, Jørgensen MM, Freeman DW, Witwer KW, Zonderman AB, Biragyn A, et al. Age-related changes in plasma extracellular vesicle characteristics and internalization by leukocytes. Sci Rep. 2017;7:1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01386-z.
41. Radeghieri A, Alacqua S, Zendrini A, Previcini V, Todaro F, Martini G, Ricotta D, Bergese P. Active antithrombin glycoforms are selectively physiosorbed on plasma extracellular vesicles. J Extracell Biol. 2022;1 https://doi.org/10.1002/jex2.57.
42. Futami Y, Takeda Y, Koba T, Narumi R, Nojima Y, Ito M, Nakayama M, Ishida M, Yoshimura H, Naito Y, et al. Identification of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein as novel biomarkers for sarcoidosis using proteomics of serum extracellular vesicles. Int Immunol. 2022;34:327–40. https://doi.org/10.1093/intimm/dxac009.
43. Fuentelsaz-Romero S, Barrio-Alonso C, García Campos R, Torres Torresano M, Muller IB, Triguero-Martínez A, Nuño L, Villalba A, García-Vicuña R, Jansen G, et al. The macrophage reprogramming ability of Antifolates reveals soluble CD14 as a potential biomarker for methotrexate response in rheumatoid arthritis. Front Immunol. 2021;12:1–15. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.776879.
44. Haskó G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. Front Immunol. 2013;4:85. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00085.
45. Ma Y, Wang J, Gao J, Yang H, Wang Y, Manithody C, Li J, Rezaie AR. Antithrombin up-regulates AMP-activated protein kinase signalling during myocardial ischaemia/reperfusion injury. Thromb Haemost. 2015;113:338–49. https://doi.org/10.1160/TH14-04-0360.
46. Wang J, Wang Y, Wang J, Gao J, Tong C, Manithody C, Li J, Rezaie AR. Antithrombin is protective against myocardial ischemia and reperfusion injury. J Thromb Haemost. 2013;11:1020–8. https://doi.org/10.1111/jth.12243.Antithrombin.
47. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. Nat Cell Biol. 2011;13:1016–23. https://doi.org/10.1038/ncb2329.The.
48. Totan M, Dagdemir A, Ak AR, Albayrak D, Kucukoduk S. Effects of high-dose methotrexate on the hemostatic system in childhood acute lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol. 2001;36:429–33. https://doi.org/10.1002/mpo.1106.
49. Martinez-Bravo MJ, Wahlund CJE, Qazi KR, Moulder R, Lukic A, Rådmark O, Lahesmaa R, Grunewald J, Eklund A, Gabrielsson S. Pulmonary sarcoidosis is associated with exosomal vitamin D–binding protein and inflammatory molecules. J Allergy Clin Immunol. 2017;139:1186–94. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.051.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Unlizensierte Übersetzung für unsere Lesenden:

Kraaijvanger et al. Respiratory Research (2024) 25:166 https://doi.org/10.1186/s12931-024-02809-y

FORSCHUNG Open Access

© Die Autorinnen und Autoren 2024. Open Access Dieser Artikel steht unter einer Creative Commons Attribution 4.0 International Lizenz, die die Verwendung, Verbreitung, Anpassung, Distribution und Reproduktion in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern angemessener Hinweis auf die ursprünglichen Autorinnen/Autoren und die Quelle gegeben wird, ein Link zur Creative Commons-Lizenz bereitgestellt wird und angegeben wird, ob Änderungen vorgenommen wurden. Bilder oder anderes Drittmaterial in diesem Artikel sind in dem Artikel unter der Creative Commons-Lizenz enthalten, sofern nichts anderes in einer Quellenangabe vermerkt ist. Wenn das Material nicht unter der Creative Commons-Lizenz des Artikels enthalten ist und Ihre geplante Nutzung über die gesetzlich erlaubte Nutzung hinausgeht oder nicht gestattet ist, müssen Sie die Erlaubnis direkt vom Rechteinhaber einholen. Eine Kopie der Lizenz finden Sie unter http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. Die Creative Commons Public Domain Dedication-Waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) gilt für die in diesem Artikel bereitgestellten Daten, sofern nichts anderes in einer Quellenangabe vermerkt ist.

Respiratory Research

Vermindertes Serpin C1 in extrazellulären Vesikeln sagt Ansprechen auf Methotrexat-Behandlung bei Patienten mit pulmonaler Sarkoidose vorher

Raisa Kraaijvanger[1]†, Montse Janssen Bonás[1]†, Jan C. Grutters[12], Ioanna Paspali[3], Marcel Veltkamp[12], Dominique P. V. de Kleijn[3] und Coline H. M. van Moorsel[1]*

Zusammenfassung

Hintergrund Sarkoidose ist eine systemische granulomatöse Erkrankung unbekannter Ätiologie, die vor allem die Lungen betrifft. Eine Behandlung ist erforderlich, wenn Krankheitssymptome sich verschlimmern und die Organfunktion sich verschlechtert. Bei pulmonaler Sarkoidose sind Prednison und Methotrexat (MTX) die häufigsten entzündungshemmenden Therapien. Es besteht jedoch eine große interindividuelle Variabilität im Ansprechverhalten auf die Behandlung, und prädiktive Response-Marker fehlen derzeit.

Ziel In dieser Studie untersuchten wir das prädiktive Potenzial von Biomarkern in extrazellulären Vesikeln (EVs), die aus archiviertem Serum von Patienten mit pulmonaler Sarkoidose isoliert wurden, das vor Therapiebeginn gespeichert wurde.

Methoden ProteinKonzentrationen eines Vier-Protein-Testpanels entzündlicher Proteine wurden in einer Entdeckungskohorte (n = 16) und einer Replikationskohorte (n = 129) von Patienten mit Sarkoidose sowie 47 gesunden Kontrollpersonen gemessen. Das Ansprechen auf die Therapie wurde als Verbesserung des absoluten Scores von > 5 % der forcierten Exspiratorischen Vitalkapazität (FVC) und/oder > 10 % der Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid (DLCO) nach 24 Wochen im Vergleich zum Ausgangswert (vor Behandlung) definiert.

Ergebnisse Serumproteinspiegel unterschieden sich zwischen EV-Fraktionen und Serum sowie zwischen Sarkoidose-Fällen und Kontrollen. Serpin C1-Konzentrationen in der Low-Density-Lipoprotein-EV-Fraktion waren bei Patienten mit gutem Ansprechen auf MTX-Behandlung sowohl in der Entdeckungskohorte (p = 0,059) als auch in der Replikationskohorte (p = 0,032) zum Zeitpunkt baseline niedriger. EV-Serpin C1 erwies sich als signifikanter Prädiktor für das Ansprechen auf MTX-Behandlung (OR 0,4; p = 0,032).

Schlussfolgerung Diese Studie zeigt, dass Proteine, die aus EVs isoliert wurden, ein distinktes Signal tragen und Potenzial als neue prädiktive Therapie-Response-Biomarker bei Sarkoidose haben.

Schlüsselwörter Extrazelluläre Vesikel, Sarkoidose, Biomarker, Therapie

---

Einleitung

Sarkoidose ist eine systemische granulomatöse Erkrankung unbekannter Ursache, die hauptsächlich die Lungen, intrathorakalen Lymphknoten, Augen und Haut betrifft [1]. Diagnose, Überwachung sowie Vorhersage des Krankheitsverlaufs oder Ansprechens auf Therapie sind im Management von Patienten mit

Sarkoidose herausfordernd. Seit Jahrzehnten wurden Biomarker wie das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) und der lösliche Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R) untersucht, um das klinische Management zu steuern, leider jedoch mit bescheidener Sensitivität und Spezifität [2, 3]. Die pharmakologische Behandlung der Sarkoidose wird eingeleitet, um weitere spezifische Organschäden zu verhindern oder Symptome zu lindern. Immunsupprimierende und immunmodulierende Medikamente, meist in Form von Prednison und Methotrexat (MTX), stellen die Erst- und Zweitlinienwahl dar. Beim Einleiten der Therapie ist es jedoch nicht möglich, das Therapieansprechen für einzelne Patienten im Voraus vorherzusagen, obwohl ein erheblicher Teil keinen Nutzen aus der Therapie zieht. Eine personalisierte Vorhersage des Therapieansprechens ist ein klinischer ungedeckter Bedarf angesichts des Schutzes von Patienten vor Exposition gegenüber ineffektiven Medikamenten und deren Nebenwirkungen.

Sarkoidose ist durch die Bildung nicht-kaösierender Granulome, persistierende Entzündung und aktivierte Monozyten/Makrophagen gekennzeichnet [4]. Makrophagen bilden den Kern des Granuloms, produzieren entzündliche Zytokine und Chemokine, um Lymphozyten anzulocken und so ein entzündliches Milieu zu erzeugen [5]. Diese Makrophagen stammen aus zirkulierenden, knochenmarksabgeleiteten Monozyten, die als antigenpräsentierende Zellen patrouillieren, aber eine sekundäre Funktion als Reserve haben, um den Makrophagenpool in den Geweben bei Bedarf aufzufüllen. Mehrere Studien haben einen erhöhten Entzündungsstatus von Monozyten im Blut von Sarkoidose-Patienten hervorgehoben [6–9]. Dieser erhöhte Entzündungsstatus kann auch durch extrazelluläre Vesikel (EVs) ausgelöst werden, wie zuvor von Wahlund et al. beschrieben [9]. Darüber hinaus sind mehr Monozyten im Kreislauf von Patienten mit Sarkoidose zu finden, und diese Zellen haben die Fähigkeit, andere Immunzellen zu aktivieren, nicht nur durch Zell-Zell-Interaktion, sondern auch durch monozytabgeleitete EVs [10, 11]. Zusammengenommen können EVs, die aus Vollblutserum isoliert wurden, bei Sarkoidose besonders aussagekräftig sein.

EV ist ein Oberbegriff für alle in Körperflüssigkeiten gefundenen Vesikel, einschließlich Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körperchen. Im letzten Jahrzehnt wurde festgestellt, dass EVs funktional Moleküle zwischen Zellen übertragen können [12]. EVs enthalten Nukleinsäuren, Lipide und Proteine von den freisetzenden Zellen und werden oft als „flüssige Biopsien" bezeichnet [13, 14], wobei sie den Status/Pfadologie der freisetzenden Zelle widerspiegeln. EV-Proteine sind oft besser mit der Pathologie assoziiert als dieselben frei zirkulierenden Proteine im Blut [15]. Bei der Suche nach neuen potenziellen Biomarkern hat das Interesse an EVs zugenommen [16–18]. Da dieses aufstrebende Forschungsgebiet relativ neu ist, besteht ein Bedarf an Standardisierung sowohl in der Methodik als auch in der Technologie, um EV-assoziierte Biomarker validieren zu können [19].

Für diese Studie wurde ein etabliertes EV-Proteinpanel [20] verwendet, das ursprünglich zur Vorhersage unerwünschter kardiovaskulärer Ereignisse entwickelt wurde. Dieses Panel bestand aus vier Proteinen: CD14, Serpin G1, Serpin C1 und Cystein C. Obwohl die vier Proteine in diesem Panel hauptsächlich im Bereich der Kardiologie verwendet werden, sind diese Proteine auch an Entzündung und Gerinnung beteiligt [21–27]. Daher könnte dieses Proteinpanel für die Beurteilung von Entzündung und Vorhersage des Ansprechens auf immunsuppressive Behandlung bei Sarkoidose interessant sein. Die Proteine wurden ursprünglich als Multiplex gemessen, jedoch wurden sie für diese Studie separat gemessen, um die Assoziationen der einzelnen Proteine mit dem Therapieansprechen zu untersuchen.

In dieser explorativen Studie untersuchten wir das Potenzial entzündlicher Biomarker, die aus serumisolierten Fraktionen von EVs mittels eines etablierten Proteinpanels stammen, das zuvor in EVs validiert wurde. Das Ziel der vorliegenden Studie war dreigeteilt. Erstens untersuchten wir, ob Unterschiede in den Spiegeln entzündlicher Biomarker zwischen EV-Isolaten und Serum bestehen. Zweitens untersuchten wir, ob EV-abgeleitete Biomarker sich zwischen Patienten mit Sarkoidose und gesunden Kontrollen unterscheiden. Drittens beurteilten wir, ob diese entzündlichen Biomarker das Therapieansprechen bei Patienten vorhersagen, die mit Prednison oder MTX behandelt wurden.

Materialien und Methoden

Patienten Fall- und Kontrolldproben wurden aus der St. Antonius Hospital ILD-Biobank gesammelt, wobei alle Sarkoidose-Patienten (n = 2265) auf Eignung gescreent wurden. Fälle wurden basierend auf pulmonalem Behandlungsbedarf (Abnahme der Lungenfunktion, Dyspnoe oder pulmonale Fibrogenese), Behandlung mit Prednison oder MTX und Anwesenheit von Serum ausgewählt, das innerhalb von 6 Monaten vor Therapiebeginn gesammelt wurde. 98 Sarkoidose-Patienten wurden mit MTX und 69 Patienten mit Prednison behandelt. Alle Patienten waren Erwachsene > 18 Jahre mit Sarkoidose diagnostiziert gemäß den internationalen ATS/ERS/WASOG-Kriterien [1].

Baseline-Charakteristika (Alter bei Diagnose, Geschlecht, Komorbiditäten wie in den medizinischen Akten berichtet), Lungenfunktion, Löfgren-Syndrom sowie Organmanifestationen wurden bis zu 2 Jahre nach Therapiebeginn dokumentiert. Basierend auf den Ergebnissen der kürzlich berichteten SARCORT-Studie [28] sowie dem Sarkoidose-Behandlungsscore [29] klassifizierte eine Verbesserung des absoluten Scores von > 5 % FVC und/oder > 10 % DLCO nach 24 Wochen im Vergleich zum Ausgangswert (vor Behandlung) einen Patienten als „Responder". Alle anderen Patienten wurden als „Non-Responder" klassifiziert.

Diese Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki und GCP-Leitlinien durchgeführt. Die Studie wurde durch das Medizinische Forschungsethikkomitee United (MEC-U) des St. Antonius Hospital (R05-08A) genehmigt, und eine schriftliche Einwilligung wurde von allen Patienten eingeholt.

Studienkohorten Zuerst wurde die Entdeckungskohorte zusammengesetzt, eine Kohorte von 16 Prednison- und 16 MTX-Fällen, die nach Alter, Geschlecht, Ethnie und Raucheranamnese so gut wie möglich gematcht wurden. Für jede Behandlung wurden acht Patienten Responder und acht Patienten Non-Responder auf die Therapie. Die Replikationskohorte bestand aus den restlichen 49 Prednison- und 80 MTX-Fällen. In der Replikationskohorte bestand die Prednison-behandelte Gruppe aus 29 Respondern und 20 Non-Respondern, und die MTX-behandelte Gruppe bestand aus 42 Respondern und 38 Non-Respondern. Zusätzlich wurden 47 gesunde Kontrollproben aufgenommen.

Blutproben wurden vor Beginn jeglicher Behandlung gesammelt. Serum wurde durch Zentrifugation von Serum-Separator-Gerinnungsaktivatorröhrchen bei 1800 g für 5 Minuten isoliert und bei −80 °C in der St. Antonius Hospital BIOBANK bis zur weiteren Verwendung gelagert.

EV-Isolierung Die Isolierung der EV-Fraktion basierte auf dem Protokoll von Dekker et al. [30]; hier wurde jedoch Serum anstelle von Plasma verwendet (siehe detaillierte Beschreibung im Supplementmaterial). EVs wurden aus 25 µL Serum mit magnetischen Kügelchen (Nanomag®-D plain, 130 nm (1:25) (Micromod)) isoliert. Für die sequenzielle Isolierung der Fraktionen wurden Dextran-Sulfat (DS) (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) und Mangan(II)-chlorid ($MnCl_2$)-Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet. Die Präsenz isolierter EVs mit dieser Technik wurde zuvor mittels Elektronenmikroskopie und Western Blot bestätigt [30–32]. Verschiedene Fraktionen von EVs im Serum wurden durch EV-Ko-Präzipitation mit monolager Low-Density-Lipoprotein (LDL-Fraktion) und mit bilager Membranvesikel High-Density-Lipoprotein (HDL-Fraktion) erhalten. Vorher durchgeführte Experimente haben gezeigt, dass relativ kleine EVs (±101 nm) in der LDL-Fraktion vorhanden sind, während größere Partikel in der HDL-Fraktion gefunden werden (±120 nm) [30].

Protein Konzentrationsmessungen Auf einer 96-Bohrer-Platte wurden LDL, HDL und ganzes Serum gleichzeitig gemessen. Proteinkonzentrationen in EV-Fraktionen und Serum wurden in einem etablierten Proteinpanel gemessen, bestehend aus: CD14, Cystatin C, Serpin C1 und Serpin G1 [20]. Fängenantikörper, biotinylierter Detektionsantikörper und Antigen aller vier Proteine wurden von R&D Systems gekauft. Proteine wurden quantitativ durch Luminex-basiertes Multiplex-Assay (Bio-Rad, Austin, USA) analysiert. Alle EV-Protein niveaus wurden für die Gesamtproteinmenge korrigiert.

Statistische Analyse Der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test wurde für nicht-normalverteilte Daten verwendet. Kategoriale Variablen wurden mit Chi-Quadrat- und Fishers exaktem Test verglichen, wo angemessen. Log-transformierte Werte der Proteinspiegel wurden verwendet, um den Effekt der Schiefe in der Verteilung der Proteinspiegel zu reduzieren. Um die Odds Ratio zu berechnen und den direkten Vergleich zwischen verschiedenen Proteinen zu ermöglichen, wurden EV-Protein niveaus in standardisierte Einheiten oder den z-Score konvertiert, indem der beobachtete Wert minus dem Mittelwert dividiert durch die Standardabweichung berechnet wurde. Um die Beziehung zwischen den Proteinspiegeln und dem Therapieansprechen zu untersuchen, wurde ein logistisches Regressionsmodell mit dem Outcome „Ansprechen auf Medikation" verwendet. Spearman's Rho-Korrelationen wurden berechnet, um direkte Beziehungen zwischen Proteinkonzentrationen und anderen Parametern zu bewerten. Für die Analyse in der Entdeckungskohorte wurden p-Werte < 0,1 als signifikant von Interesse betrachtet, für die Analyse mit der Replikationskohorte und der kombinierten Kohorte wurden p-Werte < 0,05 als signifikant betrachtet.

Ergebnisse

Entdeckungskohorte

Baseline-Charakteristika Die Baseline-Charakteristika der nach Alter, Geschlecht, Ethnie und Raucheranamnese gematchten Entdeckungskohorte der Patientengruppen, die mit MTX oder Prednison behandelt wurden, sind in Tabelle 1 dargestellt. Für die MTX-Gruppe war DLCO %pred in der respondenten Gruppe signifikant niedriger (p = 0,010).

Tabelle 1: Baseline-Charakteristika der Entdeckungskohorte von Sarkoidose-Patienten mit pulmonalem Behandlungsbedarf

(Details der Tabelle 1 – siehe Originaldokument)

Unterschiede in Proteinspiegeln zwischen EV und Serum bei Sarkoidose Die Proteine des Protein-Testpanels wurden in den EV-Fraktionen LDL, HDL und im ganzen Serum gemessen. Abbildung 2 zeigt die Konzentrationen der verschiedenen Proteine, gemessen in der Entdeckungskohorte (n = 32). Im Vergleich zu EV-Fraktionen waren die Serumproteinkonzentrationen höher für CD14, Cystatin C und Serpin C1, aber nicht für Serpin G1. Darüber hinaus waren die Proteinkonzentrationen für Serpin G1 und Serpin C1 in der HDL-Fraktion niedriger als in der LDL-Fraktion.

EV-abgeleitete Proteine sind bei Sarkoidose höher als bei Kontrollen Die Proteine des Protein-Testpanels, gemessen in der Entdeckungskohorte, wurden mit Proteinspiegeln bei gesunden Kontrollen (HC) (n = 47) verglichen. Baseline-Charakteristika sind in Supplement Tabelle S1 dargestellt. Die Proteinkonzentration war bei Sarkoidose-Patienten im Vergleich zu HC signifikant höher, wenn im ganzen Serum gemessen (Abbildung 3). Für die HDL-EV-Fraktion war nur Serpin C1 signifikant unterschiedlich zwischen Patienten und HC. Für die LDL-Fraktion wurde ein signifikanter Unterschied für alle Proteine des Testpanels beobachtet. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen waren die Konzentrationen von CD14 und Cystatin C in den LDL-Fraktionen der Patienten höher, während beide Serpin-Proteine in LDL-Fraktionen niedriger waren.

Ansprechen auf Behandlung In der Prednison-Entdeckungskohorte wurden keine Unterschiede in den Proteinkonzentrationen zwischen Respondern und Non-Respondern in entweder LDL-, HDL-Fraktionen oder Serum gefunden.

In der MTX-Entdeckungskohorte waren die Konzentrationen von Serpin C1 niedriger (p = 0,059) in der Gruppe der Responder, während die Konzentrationen von CD14 signifikant höher in der Gruppe von Patienten, die als Responder klassifiziert wurden (p = 0,014), in der LDL-Fraktion waren. In der HDL-Fraktion waren die Cystatin-C-Konzentrationen niedriger in der Gruppe von Patienten, die als Non-

Responder klassifiziert wurden (p = 0,027) (Abbildung 4). Kein Unterschied wurde in Serumproteinspiegeln von Respondern und Non-Respondern gefunden (Supplement Abbildung S1).

Replikationskohorte

Baseline-Charakteristika In der zweiten Phase der Studie wurden die EV-Proteine in einer größeren Replikationskohorte von 80 Sarkoidose-Patienten quantifiziert, die mit Methotrexat behandelt wurden, und 49 Sarkoidose-Patienten, die mit Prednison behandelt wurden. Baseline-Charakteristika sind in Tabelle 2 dargestellt. Wie in der Entdeckungskohorte hatten alle eingeschlossenen Patienten einen pulmonalen Behandlungsbedarf.

Supplement Abbildung S2 zeigt die Konzentrationen aller Proteine, gemessen in der Replikationskohorte. Bezüglich der Proteine von Interesse, die in der Entdeckungskohorte identifiziert wurden, waren Serpin C1-Konzentrationen in der LDL-Fraktion signifikant niedriger in der Methotrexat-Responder- als in der Non-Responder-Gruppe der Replikationskohorte (p = 0,032; Abbildung 5a). Bezüglich CD14 in LDL und Cystatin C in HDL wurde jedoch kein Unterschied zwischen Respondern und Non-Respondern gefunden (p = 0,091 bzw. p = 0,215, Abbildung 5b, c).

EV-Proteine zur Vorhersage des Anspruchs auf MTX Um den prädiktiven Wert von Serpin C1 für das Therapieansprechenvorhersage zu bestimmen, kombinier ten wir die MTX-Entdeckungs- und Replikationskohorten für weitere Analyse. Werte wurden log-transformiert, um die Varianz zu stabilisieren. Die logistische Regression zeigte, dass Serpin C1, gemessen in der LDL-Subfraktion, ein signifikanter Prädiktor für das Ansprechen auf Behandlung war (OR 0,42 [95% KI 0,19–0,93] p = 0,032).

Um zu untersuchen, ob es eine direkte Beziehung gibt, wurden Spearman's Rangkorrelationen berechnet, um die Beziehung zwischen Veränderung in FVC 6 Monate nach Beginn der MTX-Therapie und Proteinkonzentrationen zum Zeitpunkt baseline zu bewerten. Es gab eine positive Korrelation zwischen Veränderung in FVC und CD14-Konzentrationen in der LDL-Fraktion (R = 0,35; p = 0,004). Keine der anderen Proteine korrelierte direkt mit Veränderung in FVC und keine Korrelation wurde für Veränderung in DLCO gefunden.

Diskussion

In dieser Studie zeigten wir, dass Proteinkonzentrationen im Serum und in EV-Fraktionen, die aus Serum isoliert wurden, sich signifikant voneinander unterscheiden können und dass dies von dem analysierten Protein abhängt. Zweitens fanden wir, dass Proteinspiegel in EV-Fraktionen sich signifikant zwischen Sarkoidose und gesunden Kontrollen unterschieden. Drittens zeigten wir, dass EV-Proteine, insbesondere Serpin C1 in der LDL-EV-Fraktion, zum Zeitpunkt baseline signifikant niedriger in der Gruppe von Patienten waren, die auf Behandlung mit MTX reagierten, was wir in einer zweiten Kohorte bestätigten. Baseline-Serpin C1 wurde als Marker mit prädiktivem Wert für das Ansprechen auf MTX-Therapie gezeigt.

Unsere Daten zeigen, dass die Messung von Proteinen spezifisch in EVs neue Informationen in der Sarkoidose-Forschung im Vergleich zur Messung derselben Proteine im Serum allein bieten kann. Obwohl EVs den Nachteil eines zusätzlichen Isolationsschritts haben, bieten sie auch Vorteile wie Stabilität, leichte Zugänglichkeit und minimale Probenvolumina [18]. Darüber hinaus werden EVs zunehmend als Quelle von Proteinen anerkannt, die direkt mit der Krankheitspathogenese verbunden sind [33].

Der Unterschied in der Proteinexpression zwischen Patienten und gesunden Kontrollen ist in der LDL-Fraktion deutlicher als in der HDL-Fraktion. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liegt in dem Unterschied in der Zusammensetzung der Vesikel; HDL-Vesikel sind größer und werden vermutet, mehr Proteine von den urspringenden Zellen zu enthalten [34, 35]. Während die LDL-Fraktion aus kleineren EVs

einschließlich Exosomen besteht, die von aktivierten Immunzellen freigesetzt werden und die Fähigkeit haben, andere Immunzellen zu aktivieren. Das übermäßig aktive Immunsystem bei Sarkoidose-Patienten könnte zu einer erhöhten Freisetzung von Exosomen führen, was schließlich zu höheren EV-Proteinkonzentrationen bei Patienten gegenüber gesunden Kontrollen führt [36].

Die Proteinkonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine CD14 und Cystatin C wurden in mehreren entzündlichen Erkrankungen erhöht gezeigt [37, 38] und waren auch in der LDL-Fraktion bei Sarkoidose-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht. Beide Serpin C1 und G1 waren bei gesunden Kontrollen erhöht. Diese Serpine üben antientzündliche Eigenschaften aus [21, 39]. Allerdings, wie frühere Forschung beschreibt, nimmt die Anzahl der EVs mit fortschreitendem Alter ab [40]. Wir müssen auch die Möglichkeit eines altersbedingten Effekts auf die Unterschiede in EV-Proteinkonzentrationen zwischen Patienten und gesunden Kontrollen in Betracht ziehen, da die gesunden Kontrollen signifikant jünger waren. Beim Vergleichen der Konzentrationen der Proteine mit dem Alter des gesunden Kontrollsubjekts korrelierte keines der Proteine mit dem Alter, was zu einem minimalen Einfluss des Alters auf den Unterschied in EV-Proteinkonzentrationen zwischen Patienten und gesunden Kontrollen führte.

Im Hinblick auf das diagnostische Potenzial dieser Biomarker gab es keinen Mehrwert von EV gegenüber Serum, da alle vier Proteine auch signifikant zwischen Patienten und gesunden Kontrollen im Serum unterschieden. Weitere Analysen unter Verwendung von Serumproben vom Zeitpunkt der Diagnose von Patienten mit Sarkoidose und Differentialdiagnosen sind erforderlich, um das diagnostische Potenzial der Marker zu bestimmen. Die EV-Proteine in unserem Panel sind allgemeine Entzündungsmarker, die auf der Zelloberfläche gefunden werden, von den Zellen abgesondert werden oder aktiv in zellulären entzündlichen Prozessen beteiligt sind. Daher ist es nicht überraschend, dass wir einen Unterschied in den Proteinkonzentrationen zwischen gesunden Kontrollen und Patienten fanden.

Allerdings wurde eine interessante Beobachtung für Serpin C1 gemacht. In den LDL- und HDL-EV-Fraktionen waren die Serpin C1-Konzentrationen bei Patienten niedriger als bei Kontrollen, während im ganzen Serum die Serpin C1-Konzentration bei Patienten höher als bei Kontrollen war. Der Effekt von Serpin C1 ist anders in der Zirkulation als als zellulärer Oberflächenmarker, wo es eine erhöhte antientzündliche Wirkung hat. Wie previously vorgeschlagen, könnte mehr Serpin C1 bei Patienten mit Sarkoidose im Vergleich zu gesunden Kontrollen abgesondert worden sein [41], was unseren erhöhten Spiegeln im Serum der Patienten entspricht.

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand war die Bewertung, ob Proteinkonzentrationen in EV einen prädiktiven Wert für das Ansprechen auf Therapie haben könnten. Um dies zu bewerten, wurden Patienten, die entweder Prednison oder MTX erhielten, basierend auf Veränderung der Lungenfunktion in Responder und Non-Responder eingeteilt. Das Protein-Testpanel ergab keinen Unterschied in EV-Fraktionen zwischen Respondern und Non-Respondern in der Gruppe der Patienten, die mit Prednison behandelt wurden. Für die Patientengruppe, die mit MTX behandelt wurde, waren Serpin C1-Konzentrationen signifikant niedriger in der Gruppe von Patienten, die auf Behandlung reagierten, während CD14-Konzentrationen in der Responder-Gruppe höher waren, leider war der Unterschied zwischen Respondern und Non-Responder für CD14 nicht länger signifikant. Zusätzlich fanden wir eine positive Korrelation zwischen CD14-Konzentrationen beim baseline und Veränderung in FVC über den Verlauf von 6 Monaten MTX-Behandlung ($p = 0,004$).

Dieses Protein wurde zuvor von Futami et al. als EV-Marker für Sarkoidose identifiziert, die beschrieben, dass CD14-Spiegel in EVs bei Patienten mit Sarkoidose signifikant erhöht sind und zeigten, dass CD14 im Prozess der Granulombildung hochreguliert wurde [42]. Bei MTX-behandelten RA-Patienten wurde eine positive Korrelation zwischen der Konzentration von löslichem CD14 (sCD14) und dem Ansprechen auf MTX beschrieben, wobei RA-Patienten mit der höchsten sCD14-Konzentration zum Zeitpunkt baseline am besten auf MTX-Behandlung reagierten. Unsere Befunde legen einen ähnlichen Effekt nahe, da Responder die höchste Konzentration von CD14 in den Vesikeln zum Zeitpunkt baseline haben und dies mit der höchsten Veränderung in FVC korreliert [43]. In Zukunft wäre es interessant zu sehen, wie sich die CD14-

Konzentration in EVs während der 6 Monate der Behandlung verhält. Aufgrund fehlender Folgemessungen waren wir jedoch nicht in der Lage, dies zu messen.

Serpin C1 war das einzige der vier Proteine mit einem Unterschied in der Baseline-Konzentration zwischen Respondern und Non-Respondern auf Behandlung mit MTX sowohl in der Entdeckungs- als auch in der Replikationskohorte. Signifikant niedrigere Proteinkonzentrationen von Serpin C1 wurden in der LDL-EV-Fraktion von Patienten gefunden, die auf MTX-Behandlung reagierten, als bei nicht-respondierenden Patienten.

Serpin C1, auch bekannt als Antithrombin III (AT III), ist ein Protein, das an der Hemmung der Aktivierung von protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) durch Thrombin beteiligt ist, was zu antientzündlicher Aktivität führt [26]. MTX wurde beschrieben, seine immunmodulatorischen Eigenschaften durch Hemmung oder Aktivierung einer Reihe von Signalwegen auszuüben, einschließlich des Adenosin-Monophosphat-Proteinkinase (AMPK)-Signalwegs [44]. Ein Teil der antientzündlichen Wirkung von Serpin C1 entfaltet sich durch Aktivierung des AMPK-Signalwegs [45]. Die Hochregulierung des AMPK-Signalwegs führt zur Hemmung von Nuclear Factor-kB (NF-kB)-Signaling, was folglich zu AMPK-abwärtsgerichteten Veränderungen in der Zytokinproduktion und Leukozytenaktivierung führt [46]. In der Gruppe von Sarkoidose-Patienten mit unzureichendem Ansprechen auf MTX fanden wir höhere Konzentrationen von Serpin C1 in der LDL-Fraktion der EVs. Mehr Serpin C1-Aktivität könnte zu einer hochregulierten Signalgebung des AMPK-Weges führen. Wenn der AMPK-Weg bereits in Patienten mit höheren Konzentrationen von Serpin C1 hochreguliert ist, könnte dies zu einer Abnahme verfügbarer ATP in den Zellen führen [47]. Dieses ATP wird für die Modifikation der Adenosin-Signalgebung als Effekt der MTX-Therapie benötigt [48]. Wenn weniger ATP aufgrund der anhaltenden AMPK-Aktivierung durch Serpin C1-Aktivität verfügbar ist, könnte dies einen negativen Effekt auf die Wirksamkeit von MTX in Bezug auf Adenosin-Signaling haben.

Frühere Studien zu EV bei Sarkoidose wurden mit EVs durchgeführt, die aus Bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) isoliert wurden, was zu EVs führte, die von den in den Atemwegen und Alveolen vorhandenen Zellen abstammen. Aus diesen Studien wurde gesehen, dass EVs reichlicher waren und Proteine in BALF von Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen hochreguliert waren [9, 49]. Weil es einen Unterschied in der Zusammensetzung der Immunzellen in BALF versus Blut gibt, wird es anschließend einen Unterschied in der Zusammensetzung zwischen BALF- und Serum-EV geben. Dennoch sind BALF-abgeleitete EVs von Sarkoidose-Patienten in der Lage, PBMCs von gesunden Kontrollen in vitro zu aktivieren, wie von Wahlund et al. demonstriert [9]. Obwohl die Bewertung des pulmonalen Kompartiments pulmonale Entzündung besser widerspiegeln mag, würde die Verwendung von EVs, die aus peripherem Blut stammen, die klinische Anwendbarkeit in der Zukunft erhöhen.

Unsere Studie hat eine Reihe von Limitationen. Erstens hat die Studie ein retrospektives Design; daher war nicht alle Patientinformationen verfügbar, wie fehlende Daten zum Scadding-Stadium. Zweitens wurde die Analyse unter Verwendung von Proben von einem einzigen Zeitpunkt durchgeführt; vor Beginn der Behandlung. Proteinkonzentrationen können sich über die Zeit ändern, als Reaktion auf Krankheitsaktivität. Im Falle von Serpin C1 ist nicht bekannt, wie sich diese Spiegel vor und nach Beginn der MTX-Behandlung verhalten. Allerdings zeigte dieser Artikel, dass archiviertes Serum von Patienten, die eine reale Behandlung erhalten, eine wertvolle Ressource für EV-Biomarker-Entdeckungsstudien darstellt. Zukünftige dynamische und prospektive Studien sind erforderlich, um den Wert dieses Proteins als prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf Therapie weiter zu validieren.

Schlussfolgerung

Diese Studie zeigte, dass die Messung entzündlicher Biomarker in EVs Ergebnisse liefert, die sich stark von der Messung derselben Biomarker in der ursprünglichen Serumprobe unterscheiden. EVs haben hohes

Potenzial bei der Suche nach neuen diagnostischen oder prädiktiven Biomarkern bei Sarkoidose. In zukünftigen Studien verdient Serpin C1 besondere Aufmerksamkeit, da wir eine Assoziation zwischen EV-Konzentration von Serpin C1 und Therapieansprechen bei Patienten mit pulmonaler Sarkoidose, die mit MTX behandelt wurden, fanden.

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AMPK	Adenosin Monophosphat Protein Kinase
AT III	Antithrombin III
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
DLCO	Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid
DS	Dextran-Sulfat
EVs	Extrazelluläre Vesikel
FVC	Forcierte Exspiratorische Vitalkapazität
HC	Gesunde Kontrolle
HDL	High-Density Lipoprotein
LDL	Low-Density Lipoprotein
MEC-U	Medical Research Ethics Committees United
$MnCl_2$	Mangan(II)-chlorid
MTX	Methotrexat
NF-kB	Nuclear Factor-kappa B
sIL-2R	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor

Ergänzungsinformationen

Die Online-Version enthält ergänzendes Material verfügbar unter https://doi.org/10.1186/s12931-024-02809-y.

Zusätzliche Datei 1: Isolierung von Serumfraktionen extrazellulärer Vesikel. LDL- und HDL-Fraktionen können aus Serum durch eine DS- und $MnCl_2$-Lösung erhalten werden: DS: 0,05 %, $MnCl_2$: 0,05 M und DS: 0,65 %, $MnCl_2$: 0,2 M, jeweils. Für die LDL-Fraktionsisolierung wurden 25 µL Serum in 95 µL Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Gibco) verdünnt, gefolgt von Zugabe von 5 µL magnetischen Kügelchen (Nanomag®-D plain, 130 nm (1:25) (Micromod)). DS und $MnCl_2$ wurden in das Gesamtvolumen von 125 µL gegeben und gemischt. Die Mischung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Bio-Plex-Handmagnet (Bio-Rad) gelegt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Das gebildete Pellet ist die LDL-Fraktion. Für die HDL-Isolierung wird das Protokoll wiederholt, wobei 115 µL Überstand oberhalb des LDL-Pelletts verwendet werden. Die Pellets wurden mit 125 µL Roche Complete Lyse-M mit Proteaseninhibitoren (Roche) lysiert. Zur Entfernung magnetischer Kügelchen und anderer Debris wurden die Proben bei 3200×g, 10 Minuten zentrifugiert.

Tabelle S1. Baseline-Charakteristika der Entdeckungskohorte von Sarkoidose-Patienten mit pulmonalem Behandlungsbedarf und gesunder Kontrolle.

Abbildung S1. Konzentrationen von EV-Biomarkern bei Patienten mit Sarkoidose, die mit Prednison der Entdeckungskohorte (n = 16) behandelt wurden.

Abbildung S2. Konzentrationen von EV-Biomarkern bei Patienten mit pulmonaler Sarkoidose, die mit MTX der Replikationskohorte behandelt wurden.

Danksagungen

Nicht zutreffend.

Autorenbeiträge RK und MJB trugen zum Studiendesign, Datenerhebung und -analyse, statistischer Analyse, Entwurf und Bearbeitung des Manuskripts bei. IP trug zur Datenerhebung bei. JG überwachte das Projekt und bearbeitete das Manuskript. MV nahm am Studiendesign teil, an der Dateninterpretation, Aufsicht und Bearbeitung des Manuskripts. DdK überwachte einen Teil des Projekts und bearbeitete das Manuskript. CvM entwarf die Studie, überwachte das Projekt und bearbeitete das Manuskript.

Förderung Diese Studie wird von der Lung Foundation (Nr. 5.1.19.035), Niederlande, und von der St. Antonius Onderzoeksfonds (Nr. 21.07) finanziert. Geldgeber waren nicht an der Studiendesign, der Sammlung, Analyse und Interpretation der Daten, der Verfassen des Berichts oder der Entscheidung einreichen die Papier für die Veröffentlichung beteiligt.

Verfügbarkeit von Daten und Material Die Datensätze, die während der aktuellen Studie verwendet und/oder analysiert wurden, sind bei entsprechender Anfrage vom entsprechenden Autor erhältlich.

Erklärungen

Ethikgenehmigung und Einwilligung zur Teilnahme Diese Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki und GCP-Leitlinien durchgeführt. Die Studie wurde durch das Medizinische Forschungsethikkomitee United (MEC-U) (R14.023) und die lokale Institutionelle Überprüfungskommission (Z.19.004) des St. Antonius Hospital genehmigt.

Einwilligung zur Veröffentlichung Nicht zutreffend.

Interessenkonflikte Die Autoren erklären keine Interessenkonflikte.

Eingereicht: 3. November 2023 **Akzeptiert:** 9. April 2024

übersetzt mit lumo.proton.me