Extracellular Vesicle 8 (2026) 100112

Contents lists available at ScienceDirect

Extracellular Vesicle

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vesic

Identifying protein signatures in vesicles associated with treatment response in pulmonary sarcoidosis

Raisa Kraaijvanger [a,f], Montse Janssen Bonás [a,f], Ioanna Paspali [b], Freek G. Bouwman [c], Claudia Roodenburg [a], Jelle R. Miedema [d], Dominique P.V. de Kleijn [b], Jan C. Grutters [a,e], Marcel Veltkamp [a,e], Coline H.M. van Moorsel [a,*]

[a] St Antonius Center of Excellence for ILD and Sarcoidosis, ERN-LUNG Site, St Antonius Hospital, Nieuwegein, the Netherlands
[b] Department of Vascular Surgery, Division of Surgical Specialties, University Medical Center Utrecht, Utrecht, the Netherlands
[c] Department of Human Biology, NUTRIM School of Nutrition and Translational Research in Metabolism, Maastricht University Medical Center, Maastricht, the Netherlands
[d] Department of Respiratory Medicine, Centre of Excellence for Interstitial Lung Diseases and Sarcoidosis, Erasmus Medical Center, Rotterdam, the Netherlands
[e] Division of Heart and Lungs, University Medical Center, Utrecht, the Netherlands

ARTICLE INFO

Keywords:
Extracellular vesicles
Sarcoidosis
Proteomics
Biomarkers
Therapy

ABSTRACT

Approximately 30% of patients with sarcoidosis require immunosuppressive therapy to relieve symptoms or prevent organ damage. Prednisone and methotrexate (MTX) are the most commonly used therapies; however, treatment response varies considerably between patients. This study aimed to identify extracellular vesicle (EV) protein signatures associated with treatment response. Proteomic analysis (LC–MS/MS) was performed in sarcoidosis patients treated with either prednisone (n = 20) or MTX (n = 20). Ten candidate proteins (five per treatment group) were selected for replication in a large retrospective cohort (n = 90) and subsequent validation in a prospective cohort (n = 22). We identified 67 differentially expressed proteins (DEPs) between responders and non-responders to prednisone and 38 DEPs for MTX. Reactome pathway analysis indicated that DEPs associated with prednisone response were primarily involved in metalloproteinase activity and Toll-like receptor signaling, whereas DEPs associated with MTX response were linked to GPCR signaling and hemostasis. Complement factor I (CFI) remained significantly different at baseline in prednisone responders (replication $p < 0.001$; validation $p = 0.023$). Complement component C8 (C8) showed differential expression in MTX responders (replication $p = 0.032$; validation $p = 0.066$).

These findings indicate that EV protein profiles differ between responders and non-responders to prednisone or MTX in pulmonary sarcoidosis and may support future personalized treatment selection

1. Introduction

Sarcoidosis is a systemic inflammatory disease characterized by the formation of non-caseating granulomas mainly affecting the lungs and lymph nodes.[1,2] Sarcoidosis has a heterogeneous and often unpredictable disease course, varying from self-limiting to a chronic, sometime progressive, course that requires treatment.[3,4] In sarcoidosis, about 10-30% of the patients require treatment but due to the heterogeneous course this remains a challenge [3–5]. The first choice for treatment of pulmonary sarcoidosis is oral corticosteroids, such as prednisone, as stated in the current guideline on management of sarcoidosis.[6] However, long term use is associated with impaired quality of life[7,8] and a significant portion of patients do not respond to prednisone therapy. In case prednisone is no option/ineffective, therapy with methotrexate (MTX) is initiated.[8,9] Recent studies have shown that the effect of MTX is non inferior to prednisone in terms of change in lung function,[10] further increasing the unmet need for biomarkers that can guide treatment steps and predict treatment response to both prednisone and MTX in sarcoidosis.[11] While variability in treatment response is a well-known phenomenon in sarcoidosis, it is not known whether treatment can be tailored to the ability to respond to therapy. Recent studies, both in interstitial lung diseases and in other disorders, have shown promising

* Corresponding author. ILD Center of Excellence, member of European Reference Network-Lung, St Antonius Hospital, Nieuwegein, the Netherlands.
E-mail address: c.van.moorsel@antoniusziekenhuis.nl (C.H.M. van Moorsel).
[f] Raisa Kraaijvanger and Montse Janssen Bonás contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.vesic.2026.100112
Received 2 April 2026; Received in revised form 25 August 2026; Accepted 17 September 2026
Available online 28 September 2026
2773-0417/© 2026 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of American Association of Extracellular Vesicles. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

results when analyzing blood-based extractions of extracellular vesicles (EVs),[12,13] making this an interesting novel compartment for the search of biomarkers in sarcoidosis. EVs were long thought to be used as a waste disposal system of cells, however, in the past two decades a shift occurred in which EVs are recognized as a crucial factor in intercellular communication.[14] EV is an umbrella term for all vesicles found in bodily fluids, including exosomes, micro-vesicles and apoptotic bodies. Most cell types, including respiratory cells, use EVs for intercellular communication by releasing them into the extracellular space. The lung is the organ with the highest vascular density in the human body. Therefore, it contributes substantially to the circulation of EVs, which in turn, play critical roles in normal lung physiology.[15] In previous research we explored the value of EVs as source of potential predictive biomarkers for treatment response in sarcoidosis patients.[16] We analyzed EVs for four preselected proteins and found that potential differences were present between responders and non-responders to prednisone and MTX therapy. In this study, we will perform an untargeted proteomics approach using label-free liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in search for specific biomarkers present inside EVs predicable for treatment response. Without depending on antibodies, MS-based proteomics is an ideal technology for the discovery of new biomarkers.[17]

2. Results

2.1. Patient characteristics

The characteristics of the sarcoidosis patients included in the three cohorts are displayed in Supplementary Table S2, with an asterisk for significant difference. No difference was observed for ethnicity, sex and smoking history between patients treated with prednisone and MTX for either cohort. Only cohort 2 showed a significantly younger cohort of patients treated with prednisone ($p = 0.021$). No difference was observed for lung function (FVC or DLCO) at baseline between patients treated with prednisone and MTX.

2.2. Sarcoidosis associated protein profile

For cohort 1 there was no significant difference in ethnicity, age, sex or smoking history between patients and healthy controls. Fig. 1 shows the distribution of proteins identified in patients with sarcoidosis compared to healthy controls. In total, 405 proteins were identified (272 in LDL and 113 in HDL). Of the 405 proteins that were identified, 96 (23.7%) were differentially expressed ($p < 0.10$) between patients with sarcoidosis and healthy controls, proteins are listed in Supplementary Table S3. These proteins are shown in red in the volcano plot (Fig. 1). Proteins with a positive fold change were up-regulated in healthy controls while proteins with a negative fold change were up-regulated in sarcoidosis patients. The majority of the proteins (65.6%) was identified in the LDL fraction. A protein-protein interaction network was constructed with the use of STRING for the differently expressed proteins (DEPs) to obtain an association network of these proteins. Fig. S1 shows the predicted protein network of the differently expressed proteins between sarcoidosis patients and healthy controls. Four networks were identified from the DEPs. These clusters were associated with pathways of complement activation and coagulation cascades. With the use of Reactome pathway analysis, we identified related molecular and biological processes of the differently expressed proteins. The pathways that met the threshold (-log10(p-value) ≥ 1.0) are shown in Fig. 2. According to the pathway analysis, the identified proteins played a role in the adaptive immune system, infectious disease and in immunoregulatory interactions between lymphoid and non-lymphoid cells. Pathways enriched by differently expressed proteins included most prominently toll-like receptor (TLR) cascades ($p < 0.001$), but also alternative complement activation and signaling by interleukins (Fig. 2).

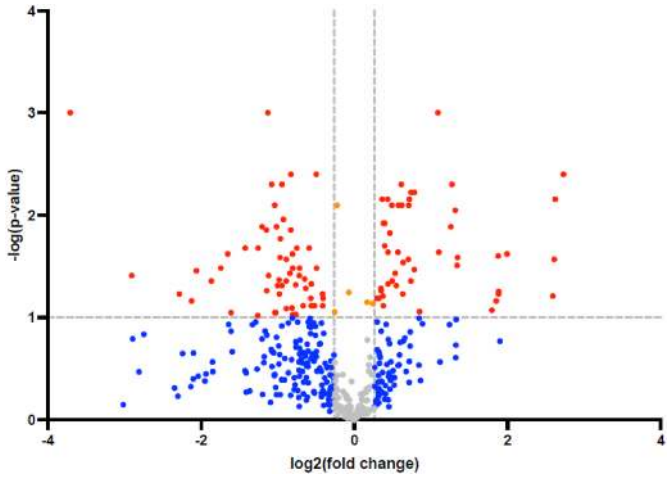

Fig. 1. Volcano plot of proteins detected by proteomics approach in sarcoidosis patients versus healthy controls. The x-axis indicates log2 fold change (healthy control/sarcoidosis patient). The y-axis indicates–log10 p-value. Each point represents a protein. Point at the far right- and left-hand sides of the plot have the largest fold changes and those along the top of the plot are the most statistically significant. The dotted vertical lines denote fold change thresholds of 1.2. The dotted horizontal line denotes p-value threshold of 0.10. Proteins in red have a fold change > 1.2 and p-value <0.1.

2.3. Predictive biomarker discovery

In cohort 1 half of the sarcoidosis patients received treatment with prednisone and the other half were treated with methotrexate. No significant difference was observed between baseline lung function between responders and non-responders for either prednisone or MTX. Using LC-MS/MS, 423 proteins were identified for the group treated with prednisone and 425 proteins for the group treated with MTX, with an overlap of 405 proteins identified in both treatment groups. To identify proteins with predictive potential for response to treatment, the FC was calculated. Fig. 3 shows 67 (15.8%) proteins that were potentially predictive in the patient group treated with prednisone and 38 (8.9%) proteins in the patient group treated with MTX (proteins with a p-value < 0.10). Of these 105 proteins, there was an overlap of only six proteins that were present in both treatment groups, these proteins included; biotinidase, ficolin-2, histidine-rich glycoprotein, phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D, platelet basic protein and serum amyloid A-1 protein.

Interaction of the DEPs between responders and non-responders for either prednisone or MTX was visualized in a protein-protein interaction network (Fig. S2). Two clusters were found for the DEPs identified in the group treated with prednisone and three clusters for the group treated with MTX. DEPs in the prednisone group associated with blood microparticles and activation of the complement system, while DEPs in the MTX group were involved in coagulation cascades, protein-lipid complexes and intermediate filament organization.

Of the DEPs with a FC > 1.2 or < -1.2, the top ten of the proteins with the highest significant difference between responders and non-responders for either prednisone or MTX are listed in Supplementary Table S4. For the proteins differently expressed between responders and non-responders treated with either prednisone or MTX a Reactome clustering pathway analysis was performed (Fig. 4). We noted that many proteins were involved in immune pathways.

2.4. Replication of differently expressed proteins

For replication, a selection of the top five candidate proteins for each treatment from cohort 1 were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in a larger validation cohort (cohort 2). Selected

Fig. 2. Bubble plot of clustering pathway analysis of proteins differently expressed between patients with sarcoidosis and healthy controls.

proteins are listed in Supplementary Table S1. No difference was observed for ethnicity, sex, age or smoking status between responders and non-responders for either treatment group. In the prednisone treated group, however, baseline FVC (%pred) was significantly lower in the responder group ($p = 0.006$). Of the ten proteins selected for validation, four remained significantly different between responders and non-responders as shown in Fig. 5. Serpin A3, complement factor H (CFH) and complement factor I (CFI) were significantly higher at baseline for responder group treated with prednisone ($p = 0.034$; $p = 0.002$; $p < 0.001$, respectively). Furthermore, protein levels of CFH and CFI correlated with each other ($R = 0.67$; $p < 0.001$), but not with serpin A3.

In the patient group treated with MTX, complement component C8 (CC8) was significantly lower at baseline responding to treatment ($p = 0.032$).

To define the potential predictive value of these proteins, we compared the difference in concentration between responders and non-responders when derived from EVs with the proteins derived from whole serum. Concentration of CFI measured in EVs weakly correlated with the concentration measured in serum ($R = 0.28$; $p = 0.049$). Of the four proteins that were significantly different in EVs, none were significantly different between responders and non-responders when measuring in serum. This suggests that the observed associations are specific to the EV-enriched fraction rather than reflecting differences in total circulating protein concentrations.

Looking at lung function improvement after 24 weeks of treatment, EV concentrations of serpin A3 and CFH and CFI all moderately correlated with improvement in FVC %pred after 24 weeks of treatment with prednisone ($R = 0.38$, $p = 0.013$; $R = 0.47$, $p = 0.001$; $R = 0.57$, $p < 0.001$, respectively). Furthermore, CFH also correlated with improvement of DLCO %pred ($R = 0.41$, $p = 0.008$). In the MTX treated group, none of the proteins correlated with improvement in lung function after 24 weeks of treatment.

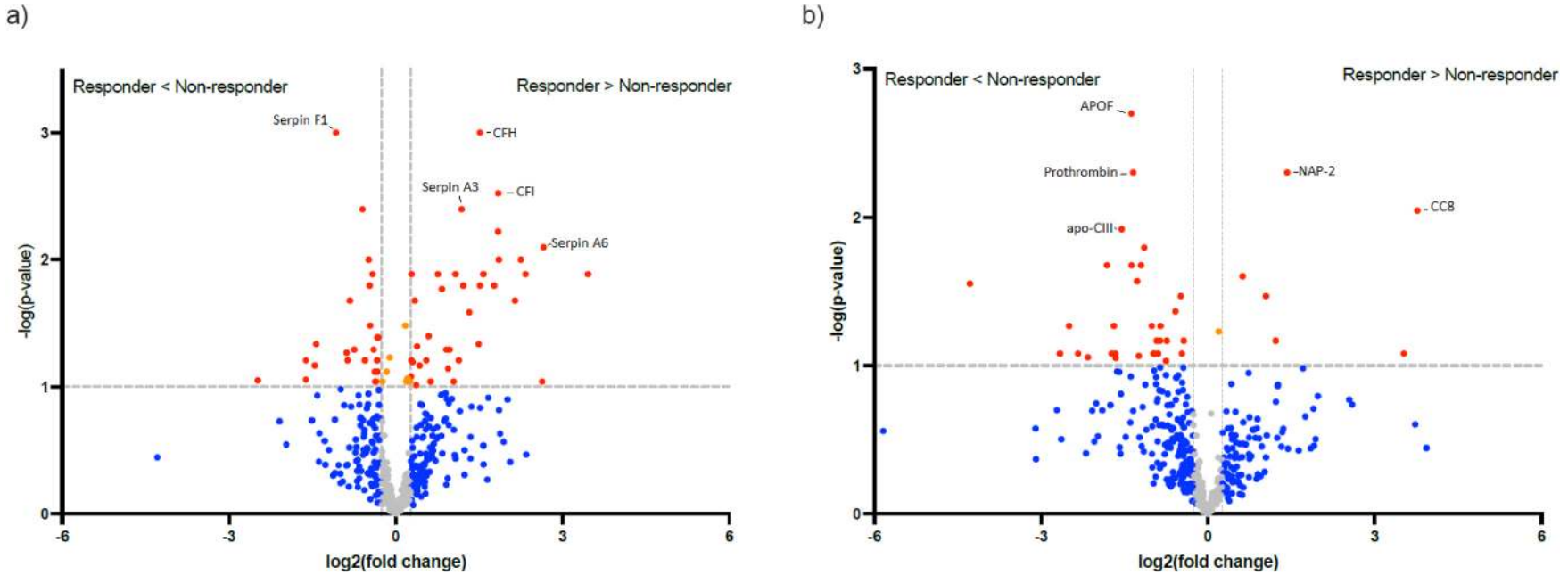

Fig. 3. Volcano plot of proteins detected by proteomics approach in sarcoidosis patients treated with (a) prednisone or (b) methotrexate. The x-axis indicates log2 fold change (response to therapy/no response to therapy). The y-axis indicates –log10 p-value. Each point represents a protein. The proteins selected for further investigations are shown by name. Points at the far right- and left-hand sides of the plot have the largest fold changes and those along the top of the plot are the most statistically significant. The dotted vertical lines denote fold change thresholds of 1.2. The dotted horizontal line denotes p-value threshold of 0.10. Proteins in red have a fold change >1.2 and a p-value <0.1. Apo-CIII: apolipoprotein C3; APOF: apolipoprotein F; CC8: complement component C8; CFH: complement factor H; CFI: complement factor I; NAP-2: platelet basic protein.

Fig. 4. Bubble plot of clustering pathway analysis of proteins differently expressed between responders and non-responders of sarcoidosis patients receiving treatment with (a) prednisone or (b) methotrexate.

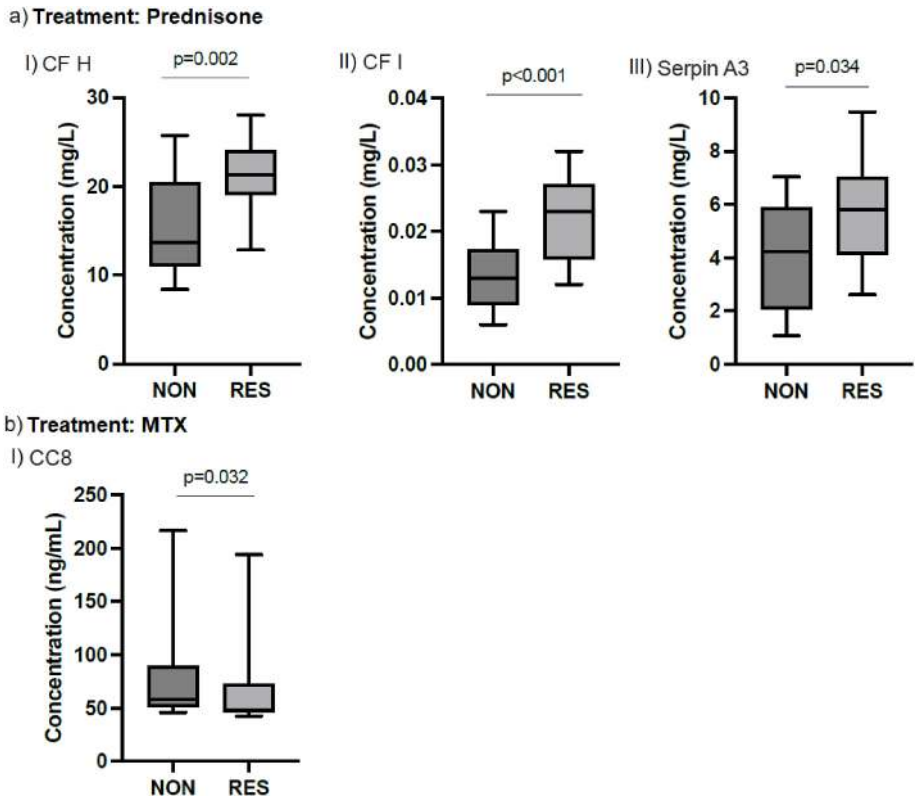

Fig. 5. Replication of differentially expressed proteins in cohort 2. Protein concentrations in responders (RES) and non-responders (NON) treated with a) prednisone and b) MTX. CFH: complement factor H, CFI: complement factor I, CC8: complement C8.

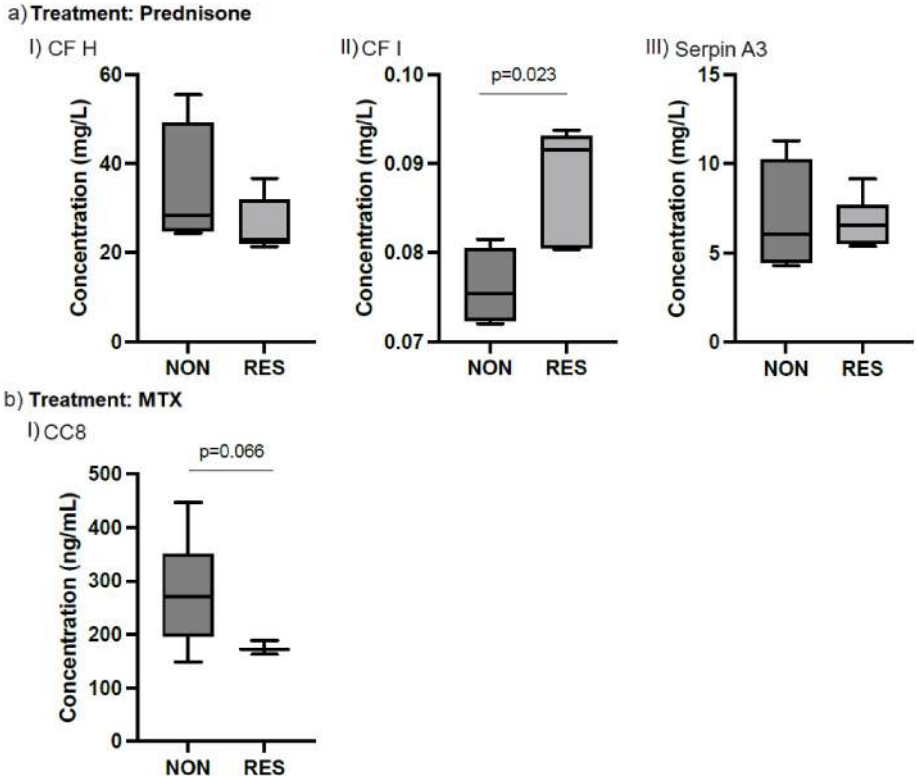

Fig. 6. Validation of differentially expressed proteins in cohort 3. Protein concentrations in responders (RES) and non-responders (NON) treated with a) prednisone and b) MTX. CFH: complement factor H, CFI: complement factor I, CC8: complement C8.

2.5. Validation of candidate biomarkers in prospective samples

Proteins that remained significant in cohort 2 were validated in a third cohort consisting of 11 patients treated with prednisone and 11 patients treated with MTX. In regard to clinical characteristics, no difference was seen for age, sex, ethnicity or Scadding Stage between responders and non-responders for either of the treatment groups. moreover, no significant difference was observed for baseline lung function between responders and non-responders for either treatment group.

At baseline a significant difference was observed for CFI ($p = 0.023$) and a trend for CC8 ($p = 0.066$) between responders and non-responders (Fig. 6). Additionally, concentrations of the candidate proteins were also compared to concentrations of ACE and sIL-2R. None of the proteins correlated with baseline concentrations of ACE or sIL-2R. Blood was taken at different time point during treatment; baseline (0 weeks), 4 weeks, 16 weeks and after 24 weeks. For serpin A3 the change in concentration correlated with improvement of FVC %pred during 24 weeks of treatment with prednisone ($R = 0.66$; $p = 0.039$).

3. Discussion

Differentially expressed proteins in extracellular vesicles (EVs) represent a promising approach to support personalized treatment strategies. In this study, we performed untargeted proteomic analysis using LC-MS/MS to identify potential biomarkers associated with treatment response in sarcoidosis. Using bioinformatics approaches, we identified differentially expressed proteins (DEPs), their interactions, and associated biological pathways in patients with sarcoidosis. Additionally, we evaluated the predictive potential of these proteins for treatment response with either prednisone or MTX. Early selection of the most optimal therapy could substantially improve patient outcomes by reducing non-responsiveness, limiting treatment switching and side effects, and preventing irreversible organ damage. In total, we identified four proteins (3 for prednisone and 1 for MTX) in EV-samples that were consistently differentially expressed between responders and non-responders.

Proteomics has been recognized as a high priority area to advance understanding of sarcoidosis.[18] Comparing protein expression between sarcoidosis patients and healthy controls revealed pathways involved with the adaptive immune system and immunoregulatory interactions between lymphoid and non-lymphoid cells, with Toll-like receptor (TLR) signaling being among the most significantly enriched pathways. Already decades ago sarcoidosis was hypothesized to result from dysregulated TLR responses rather than from a single causative pathogen [19–21]. In line with these findings, we observed enrichment of TLR-related pathways in the comparison between prednisone responders and non-responders. Glucocorticoids are known to modulate TLR-mediated signaling by suppressing pro-inflammatory cytokines such as TNF-α and IL-1β while inducing anti-inflammatory cytokines such as IL-10,[22] which may explain their differential efficacy across patients.

Pathway analysis further showed that DEPs associated with prednisone response were mainly involved in matrix metalloproteinase (MMP) activity and TLR cascades, whereas DEPs linked to MTX response were primarily associated with G protein-coupled receptor (GPCR) signaling and hemostasis. Notably, of the 105 DEPs identified across both treatment groups, only six were shared, suggesting substantial biological heterogeneity within the sarcoidosis population that may influence treatment outcomes. From these DEPs, five proteins per treatment group were selected for replication in a larger retrospective cohort. In this replication cohort, three proteins (serpin A3, complement factor H, and complement factor I) remained significantly different between responders and non-responders treated with prednisone and one protein (complement C8) remained significant in the MTX group. Subsequent validation in a smaller prospective cohort confirmed CFI as significant, with C8 showing a similar trend.

The complement system, consisting of more than 50 proteins, plays a central role in host defense through recognition and clearance of foreign components. Monocytes produce a broad range of complement proteins, including complement C8, a terminal pathway component that contributes to the formation of the membrane attack complex leading to cell lysis.[23] Tight regulation of this system is essential to prevent damage to host tissues, and key regulatory proteins include CFH and CFI [24–26]. Previous studies have demonstrated local production of CFH and CFI by fibroblasts, macrophages, and endothelial cells in inflamed tissue, such as in rheumatoid arthritis.[27,28] CFI regulates both classical and alternative complement pathways, often in conjunction with cofactors such as CFH.[29,30] In our study, levels of CFH and CFI correlated, and lower baseline levels of these proteins were observed in non-responders to prednisone. Deficiency of CFH or CFI can lead to uncontrolled complement activation, impaired immune complex clearance, reduced phagocytosis, and diminished antibody production. Immunosuppressive therapies may also influence antibody formation against these regulators.[25,29]

Importantly, complement signaling interacts closely with innate immune pathways. Crosstalk between complement components and TLR signaling in monocytes, macrophages, neutrophils, and dendritic cells can amplify inflammation via activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) signaling and subsequent NF-kB activation [31–33]. We have previously demonstrated involvement of these pathways in response to prednisone treatment.[34] Furthermore, overexpression of CFI has been linked to increased MMP production,[35] which is relevant given the established role of MMPs in tissue remodeling, fibrosis and degradation of the lung parenchyma.[36]

For MTX we found that involvement of the GPCR signaling pathway predicted response. GPCR–GPI protein complexes are known to mediate diverse biological functions and represent important therapeutic targets.[37] A well-characterized GPCR relevant to MTX action is the adenosine receptor.[38] MTX increases extracellular adenosine levels at the site of inflammation, thereby promoting anti-inflammatory effects, including induction of IL-10.[39,40] GPCR signaling plays a critical role in regulating macrophage function and innate immunity,[41,42] and interactions with glycophosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins further modulate those processes.[37] We previously demonstrated that GPI-anchored proteins are associated with treatment response in MTX-treated patients.[43] In the present study, lower levels of complement C8 were potentially associated with better response to MTX.

Our study comes with some limitations. First, because of the retrospective design of the study not all information was available. Patients who did not have lung function data up to 24 weeks after start of treatment could not be included in the study. Furthermore, treatment with prednisone or MTX was not 1:1 randomized, so possibly other factors may have played a role in the prescription of MTX instead of standard treatment with prednisone. This may have caused a selection bias in our cohorts. Secondly, longitudinal protein measurements were performed in a relatively small cohort with an overrepresentation of responders. Future studies in larger cohorts, such as the PREDMETH study are needed to validate these findings and facilitate clinical translation. Third, response to treatment was measured by improvement of lung function, based on FVC or DLCO. Declines in spirometry are often minimal, making it problematic to distinguish disease-related changes from the background variation that is often observed with serial testing [44–46]. To mitigate this, we applied clinically relevant thresholds ($\geq$5% change in FVC or $\geq$10% in DLCO) to define response. Although no established minimal clinically important difference (MCID) has been defined for sarcoidosis, these thresholds are commonly used in clinical practice distinguish meaningful changes in lung function from normal measurement variability.[10,47] Fourth, although extracellular vesicles were isolated and analyzed using an established protocol, additional characterization techniques such as transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA), and EV marker validation were not performed within the current study. Furthermore, the isolation

method may co-isolate lipoproteins and soluble plasma proteins, and therefore their contribution to the detected protein signals cannot be completely excluded. Likewise, the current data do not allow discrimination between proteins encapsulated within EVs and proteins associated with the EV surface. However, to support the validity of our approach, we refer to previous work in which this isolation method was validated using electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, and co-localization of proteins with EV markers [48–50]. In addition, Wang et al. showed that dextran sulfate precipitation enriches for EVs that can be separated from co-isolated lipoproteins by density-gradient fractionation, with most proteins detected in EV-containing fractions.[49] However, the current study cannot fully exclude contributions from co-isolated plasma components.

Furthermore, the relatively small sample size, especially after dividing patients into responder and non-responder groups within the prednisone and methotrexate cohorts, did not allow for robust multivariable-adjusted analyses without a substantial risk of overfitting. Larger studies are needed to validate these findings and account for potential confounding factors.

Nevertheless, a major strength of this study is the comprehensive proteomic discovery approach, followed by replication in a large retrospective cohort and validation in a prospective cohort. Additionally, our findings highlight that EV protein profiles differ from those in serum and may provide a more sensitive and biologically relevant source of biomarkers. Altogether, these results underscore the potential of EV-derived proteins as candidate predictive biomarkers to guide personalized treatment in sarcoidosis.

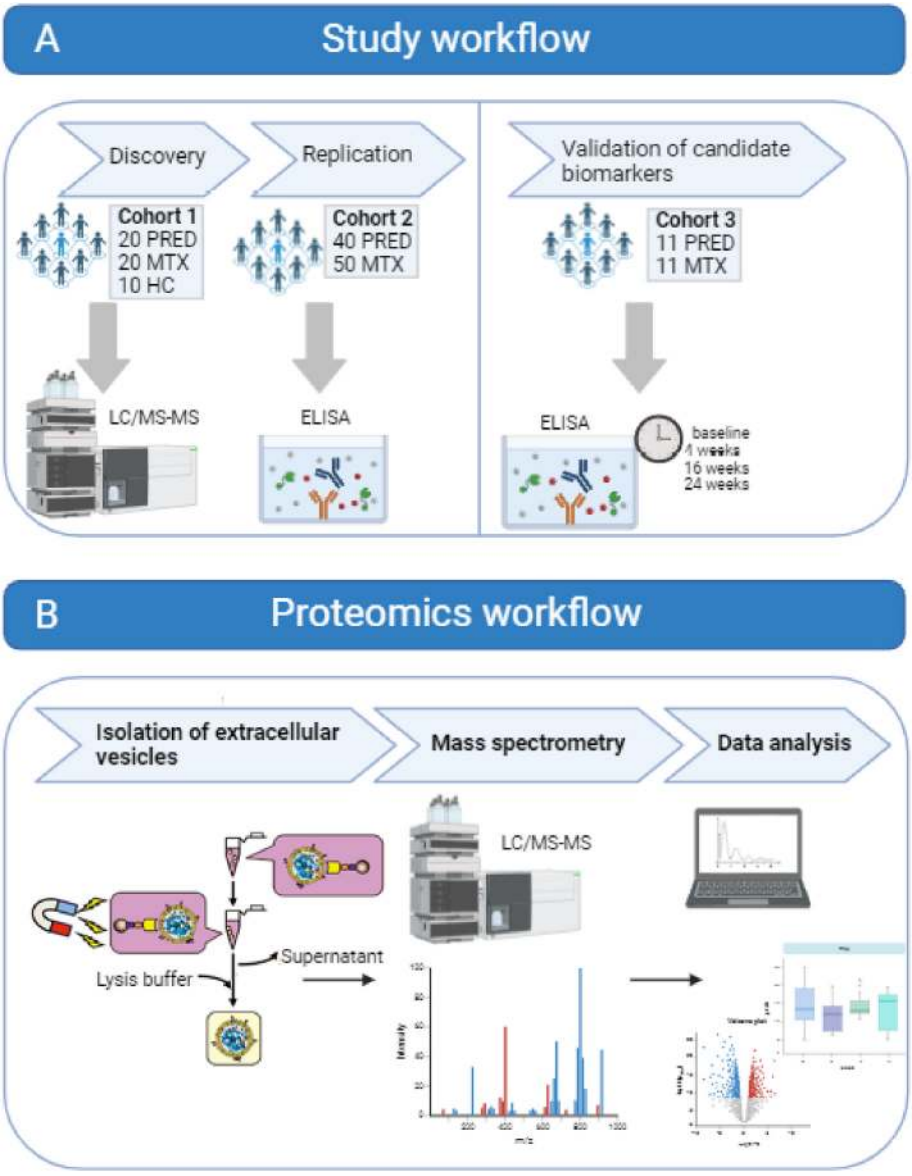

Fig. 7. Graphical summary of the workflow used to identify predictive biomarkers in EVs for response to treatment of sarcoidosis patients. a) Graphical summary of study workflow. In short, samples from cohort 1 were evaluated using a high-throughput proteomic workflow. The proteome from sarcoidosis patients was compared with that of healthy controls and between sarcoidosis patients depending on prescribed therapy (prednisone (PRED) or methotrexate (MTX)). Replication was performed in an independent replication cohort (cohort 2) using an ELISA workflow. Protein that showed potential as predictive biomarker for treatment response were confirmed in a prospective validation cohort (cohort 3) with an ELISA workflow. Protein concentrations were measured over time during treatment. **b)** Graphical summary of proteomic workflow. For the proteomics approach, we isolated extracellular vesicles (EVs) from serum of pulmonary sarcoidosis patients with the use of magnetic beads. Prior to LC-MS/MS protein fractionation was included and protein identification was obtained with the UniProt human database.

4. Conclusion

EV protein profiles differ markedly between responders and non-responders to prednisone and methotrexate in pulmonary sarcoidosis, reflecting distinct underlying biological mechanisms. These findings support the potential of EV proteomics as a minimally invasive tool to guide personalized treatment selection and improve clinical outcomes.

5. Materials and methods

5.1. Study patients and ethics

Patients with a treatment indication for pulmonary sarcoidosis were selected from the ILD biobank database of the St. Antonius Hospital. All patients with sarcoidosis were diagnosed according to the international ATS/ERS/WASOG criteria.[51] Patients were classified as "responders" in case of an increase and "non-responders" in case of a decrease of $\geq$5% for FVC % pred or $\geq$10% for DLCO % pred after 24 $\pm$ 2 weeks compared to baseline (before treatment), as was previously reported.[34] Furthermore, patients could only be included if serum samples were available within 6 months before starting prednisone or MTX. Baseline characteristics, lung function and organ manifestation were recorded.

This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and GCP guidelines. The retrospective aspect of the study was approved by the Medical research Ethics Committees United (MEC-U) of the St. Antonius Hospital (R05-08A) and the prospective aspect of the study was approved by the MEC-U of the Erasmus Medical Center with the protocol reference number MEC-2019-0730. Written consent was obtained from all patients.

5.2. Predictive EV biomarkers: analysis and validation

EV isolation was based on previous research.[16,34] As described in previous validation studies, this dextran sulfate-based isolation method enriches for EVs but may also co-isolate lipoproteins and circulating proteins [48–50]. The workflow for EV isolation and mass-spectrometry EV biomarker discovery analysis and validation is described in the supplementary and summarized in Fig. 7. Additional EV characterization by transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA), and EV marker validation was not performed in the current study, as the isolation protocol had been previously validated using these complementary methods [48–50].

The study is subdivided into three phases as follows:

Cohort 1: For the biomarker discovery phase, 40 sarcoidosis patients were selected. A total of 20 patients had been treated with prednisone (n = 10 responder vs n = 10 non-responder). Equally, 20 patients treated with MTX were selected (n = 10 responder vs n = 10 non-responder). In addition, 10 healthy controls were added. The control cohort was of similar age and ethnicity as the sarcoidosis cohort.

Cohort 2: A second cohort consisted of 90 sarcoidosis patients was used for replication of a selection of differentially expressed proteins from the proteomics approach detected in cohort 1. This resulted in 40 patients treated with prednisone (22 responders vs 18 non-responders) and 50 patients treated with MTX (28 responders vs 22 non-responders).

Cohort 3: For the validation of the candidate biomarkers and to monitor protein behavior over time, sarcoidosis patients from the prospective PREDMETH cohort[11] that received treatment in our hospital were selected. Blood withdrawal was performed at baseline (before start of treatment) and after 4, 16 and 24 weeks of treatment with either prednisone or MTX. This resulted in a cohort of 11 sarcoidosis patients treated with prednisone (8 responders vs 3 non-responders) and 11 patients treated with MTX (7 responders vs 4 non-responders).

5.3. Data analysis

To detect significant changes in proteins identified by the LC-MS/MS a fold change (FC) was calculated by dividing protein concentrations of the responders by concentrations of non-responders. A fold change $>$ 1.2 was considered clinically valuable.[52,53] The log2 abundance of each protein was calculated to reduce the effect of skewness in the distribution of the protein-levels. To calculate significant differences in protein abundance a moderated *t*-test was performed. Non-parametric tests were used for non-normally distributed data (Mann-Whitney *U* test). A PPI network of the differently expressed proteins was constructed through the use of a STRING Protein-Protein Interaction Database (http://string-db.org/). The PPI network was obtained by setting confidence value at 0.4 and was visualized using Cytoscape software version 3.10.0. The differently expressed proteins were further functionally analyzed using the Reactome database and the R package clusterProfiler.[54] Due to the discovery cohort's small sample size, proteins that showed a differential expression with a p-value $<$0.1 were considered potentially predictive.

CRediT authorship contribution statement

Raisa Kraaijvanger: Writing – original draft, Visualization, Validation, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Montse Janssen Bonás:** Writing – original draft, Visualization, Methodology, Data curation. **Ioanna Paspali:** Writing – review & editing, Methodology, Data curation. **Freek G. Bouwman:** Writing – review & editing, Methodology, Data curation. **Claudia Roodenburg:** Writing – review & editing, Methodology, Data curation. **Jelle R. Miedema:** Writing – review & editing. **Dominique P.V. de Kleijn:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology. **Jan C. Grutters:** Writing – review & editing, Supervision. **Marcel Veltkamp:** Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition, Conceptualization. **Coline H.M. van Moorsel:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Funding acquisition, Conceptualization.

Funding information

This study is funded by the Lungfoundation, the Netherlands under Grant [number 5.1.19.035]; and by the St. Antonius Onderzoeksfonds under Grant [number 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.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.vesic.2026.100112.

References

1. Patterson KC, Chen ES. The pathogenesis of pulmonary sarcoidosis and implications for treatment. *Chest*. 2018;153(6):1432–1442. https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.030 [Internet].
2. 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 Oct;14(4):735–737. https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.14d02.x [Internet].
3. Broos CE, Koth LL, Van Nimwegen M, et al. Increased T-helper 17.1 cells in sarcoidosis mediastinal lymph nodes. *Eur Respir J*. 2018.
4. Zhou T, Casanova N, Pouladi N, Wang T, Lussier Y, Knox KS, et al. Identification of Jak-STAT signaling involvement in sarcoidosis severity via a novel microRNA-regulated peripheral blood mononuclear cell gene signature. *Sci Rep*. 2017 Dec 26;7(1):1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04109-6 [Internet].

5. Valeyre D, Prasse A, Nunes H, Uzunhan Y, Brillet PY, Müller-Quernheim J. Sarcoidosis. *Lancet*. 2014 Mar;383(9923):1155–1167 [Internet] https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613606807.
6. Baughman RP, Valeyre D, Korsten P, Mathioudakis AG, Wuyts WA, Wells A, et al. ERS clinical practice guidelines on treatment of sarcoidosis. *Eur Respir J*. 2021; (May), 2004079. https://doi.org/10.1183/13993003.04079-2020 [Internet].
7. Judson MA, Chaudhry H, Louis A, Lee K, Yucel R. The effect of corticosteroids on quality of life in a sarcoidosis clinic: the results of a propensity analysis. *Respir Med*. 2015;109(4):526–531.
8. Rahaghi FF, Baughman RP, Saketkoo LA, Sweiss NJ, Barney JB, Birring SS, et al. Delphi consensus recommendations for a treatment algorithm in pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir Rev*. 2020.
9. Cremers JP, Drent M, Bast A, Shigemitsu H, Baughman RP, Valeyre D, et al. Multinational evidence-based world association of sarcoidosis and other granulomatous disorders recommendations for the use of methotrexate in sarcoidosis: integrating systematic literature research and expert opinion of sarcoidologists worldwide. *Curr Opin Pulm Med*. 2013.
10. Kahlmann V, Janssen Bonás M, Moor CC, et al. First-line treatment of pulmonary sarcoidosis with prednisone or methotrexate. *N Engl J Med*. 2025;393(3):231–242.
11. Kahlmann V, Janssen Bonás M, Moor CC, et al. Design of a randomized controlled trial to evaluate effectiveness of methotrexate versus prednisone as first-line treatment for pulmonary sarcoidosis: the PREDMETH study. *BMC Pulm Med*. 2020; 20(1).
12. Futami Y, Takeda Y, Koba T, et al. Identification of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein as novel biomarkers for sarcoidosis using proteomics of serum extracellular vesicles. *Int Immunol*. 2022;34(6):327–340.
13. d'Alessandro M, Gangi S, Soccio P, et al. The effects of interstitial lung diseases on alveolar extracellular vesicles profile: a multicenter study. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4).
14. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology J Cell Biol*; Feb, 2013:373–383 [Internet] https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23420871/.
15. Fujita Y, Kosaka N, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis. *Trends Mol Med*. 2015;21(9):533–542. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.07.004 [Internet].
16. Kraaijvanger R, Bonás MJ, Grutters JC, et al. Decreased serpin C1 in extracellular vesicles predicts response to methotrexate treatment in patients with pulmonary sarcoidosis. *Respir Res*. 2024:1–12.
17. Ong SE, Mann M. Mass spectrometry–based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol*. 2005;1(5):252–262.
18. Crouser ED, Fingerlin TE, Yang IV, et al. Application of "omics" and systems biology to sarcoidosis research. *Ann Am Thorac Soc*. 2017 Dec;14(Supplement_6):S445–S451 [Internet] https://www.atsjournals.org/doi/10.1513/AnnalsATS.201707-567OT.
19. Veltkamp M, Van Moorsel CHMM, Rijkers GT, Ruven HJT, Grutters JC. Genetic variation in the Toll-like receptor gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) influences disease course in sarcoidosis. *Tissue Antigens*. 2012;79(1):25–32.
20. Veltkamp M, Wijnen PAHM, Van Moorsel CHM, et al. Linkage between toll-like receptor (TLR) 2 promotor and intron polymorphisms: functional effects and relevance to sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(3):453–462.
21. Gabrilovich MI, Walrath J, Van Lunteren J, et al. Disordered toll-like receptor 2 responses in the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*. 2013;173 (3):512–522.
22. Broering R, Montag M, Jiang M, et al. Corticosteroids shift the Toll-like receptor response pattern of primary-isolated murine liver cells from an inflammatory to an anti-inflammatory state. *Int Immunol*. 2011;23(9):537–544.
23. Lubbers R, van Essen MF, van Kooten C, Trouw LA. Production of complement components by cells of the immune system. *Clin Exp Immunol*. 2017;188(2): 183–194.
24. Banda NK, Thurman JM, Kraus D, et al. Alternative complement pathway activation is essential for inflammation and joint destruction in the passive transfer model of collagen-induced arthritis. *J Immunol*. 2006;177(3):1904–1912.
25. Durey MAD, Sinha A, Togarsimalemath SK, Bagga A. Anti-complement-factor H-associated glomerulopathies. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(9):563–578.
26. Galindo-Izquierdo M, Alvarez JLPLP. Complement as a therapeutic target in systemic autoimmune diseases. *Cells*. 2021;10(1):1–18.
27. Linton SM, Morgan BP. Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis. *Mol Immunol*. 1999;36(13–14):905–914.
28. Neumann E, Barnum SR, Tarner IH, et al. Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum*. 2002;46(4):934–945.
29. González-Rubio C, Ferreira-Cerdán A, Ponce IM, Arpa J, Fontán G, López-Trascasa M. Complement factor I deficiency associated with recurrent meningitis coinciding with menstruation. *Arch Neurol*. 2001;58(11):1923–1928.
30. Fraczek LA, Martin BK. Transcriptional control of genes for soluble complement cascade regulatory proteins. *Mol Immunol*. 2010;48(1–3):9–13.
31. Seow V, Lim J, Iyer A, et al. Inflammatory responses induced by lipopolysaccharide are amplified in primary human monocytes but suppressed in macrophages by complement protein C5a. *J Immunol*. 2013 Oct 15;191(8):4308–4316 [Internet] [cited 2024 Oct 24] https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24043889/.
32. Zaal A, Lissenberg-Thunnissen SN, van Schijndel G, Wouters D, van Ham SM, ten Brinke A. Crosstalk between toll like receptors and C5a receptor in human monocyte derived DCs suppress inflammatory cytokine production. *Immunobiology*. 2013 Feb; 218(2):175–180 [Internet][cited 2024 Oct 24] https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22559913/.
33. Zhang X, Kimura Y, Fang C, et al. Regulation of toll-like receptor–mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):228 [Internet][cited 2024 Oct 24] https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1896115/.
34. Kraaijvanger R, Janssen Bonás M, Paspali I, Grutters JC, Veltkamp M, De Kleijn DP V, et al. Targeted proteomics in extracellular vesicles identifies biomarkers predictive for therapeutic response in sarcoidosis. [cited 2025 May 6]; Available from: https://doi.org/10.1183/23120541.00672-2024.
35. Rahmati Nezhad P, Riihilä P, Piipponen M, et al. Complement factor I upregulates expression of matrix metalloproteinase-13 and -2 and promotes invasion of cutaneous squamous carcinoma cells. *Exp Dermatol*. 2021;30(11):1631–1641.
36. Henry MT, McMahon K, Mackarel AJ, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF. *Eur Respir J*. 2002;20(5): 1220–1227.
37. Lin H-H. Functional partnerships between GPI-anchored proteins andadhesion GPCRs. *Bioessays*. 2023;45(10), e2300115.
38. Zhao J, Wei K, Jiang P, et al. G-Protein-Coupled receptors in rheumatoid arthritis: recent insights into mechanisms and functional roles. *Front Immunol*. 2022;13(July): 1–16.
39. Montesinos MC, Desai A, Delano D, et al. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum*. 2003;48(1):240–247.
40. Koźmiński P, Halik PK, Chesori R, Gniazdowska E. Overview of dual-acting drug methotrexate in different neurological diseases, autoimmune pathologies and cancers. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10).
41. Lattin J, Zidar DA, Schroder K, Kellie S, Hume DA, Sweet MJ. G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *J Leukoc Biol*. 2007;82 (1):16–32.
42. Vroon A, Lombardi MS, Kavelaars A, Heijnen CJ. Changes in the G-protein-coupled receptor desensitization machinery during relapsing-progressive experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2003;137(1–2):79–86.
43. Kraaijvanger R, Janssen Bonás M, Paspali I, Grutters JC, Veltkamp M, De Kleijn DP V, et al. Targeted Proteomics in Extracellular Vesicles Identifies Biomarkers Predictive for Therapeutic Response in Sarcoidosis.
44. McKinzie BP, Bullington WM, Mazur JE, Judson MA. Efficacy of short-course, low-dose corticosteroid therapy for acute pulmonary sarcoidosis exacerbations. *Am J Med Sci*. 2010;339(1):1–4.
45. Judson MA, Gilbert GE, Rodgers JK, Greer CF, Schabel SI. The utility of the chest radiograph in diagnosing exacerbations of pulmonary sarcoidosis. *Respirology*. 2008; 13(1):97–102.
46. James WE, Judson MA. Therapeutic strategies for pulmonary sarcoidosis. *Expert Rev Respir Med*. 2020;14(4):391–403.
47. Dhooria S, Sehgal IS, Agarwal R, 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(3) [Internet][cited 2024 Feb 15] https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37690784/.
48. Dekker M, Waissi F, van Bennekom J, et al. Plasma extracellular vesicle proteins are associated with stress-induced myocardial ischemia in women presenting with chest pain. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69297-0 [Internet].
49. Wang JW, Zhang YN, Sze SK, et al. Lowering low-density lipoprotein particles in plasma using dextran sulphate co-precipitates procoagulant extracellular vesicles. *Int J Mol Sci*. 2018.
50. Zhang YN, Vernooij F, Ibrahim I, et al. Extracellular vesicle proteins associated with systemic vascular events correlate with heart failure: an observational study in a dyspnoea cohort. *PLoS One*. 2016.
51. Hunninghake GW, Costabel U, Ando M, et al. Statement on sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Aug;160(2):736–755 [Internet] http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.160.2.ats4-99.
52. Bhargava M, Viken KJ, Barkes B, et al. Novel protein pathways in development and progression of pulmonary sarcoidosis. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–24.
53. Benedikter BJ, Bouwman FG, Heinzmann ACA, et al. Proteomic analysis reveals procoagulant properties of cigarette smoke-induced extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2019;8(1). https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1585163 [Internet].
54. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS A J Integr Biol*. 2012;16(5):284–287.

Unlizensierte Übersetzung für unsere Lesenden:

Identifizierung von Protein-Signaturen in Vesikeln, die mit dem Therapieansprechen bei pulmonaler Sarkoidose assoziiert sind

Raisa Kraaijvanger a,f, Montse Janssen Bonás a,f, Ioanna Paspali b, Freek G. Bouwman c, Claudia Roodenburg a, Jelle R. Miedema d, Dominique P.V. de Kleijn b, Jan C. Grutters a,e, Marcel Veltkamp a,e, Coline H.M. van Moorsel a,*

a St. Antonius Center of Excellence for ILD and Sarcoidosis, ERN-LUNG Site, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, Niederlande b Department of Vascular Surgery, Division of Surgical Specialties, University Medical Center Utrecht, Utrecht, Niederlande c Department of Human Biology, NUTRIM School of Nutrition and Translational Research in Metabolism, Maastricht University Medical Center, Maastricht, Niederlande d Department of Respiratory Medicine, Centre of Excellence for Interstitial Lung Diseases and Sarcoidosis, Erasmus Medical Center, Rotterdam, Niederlande e Division of Heart and Lungs, University Medical Center, Utrecht, Niederlande

---

ARTIKELINFORMATIONEN: Schlüsselwörter: Extrazelluläre Vesikel Sarkoidose Proteomik Biomarker Therapie

---

ZUSAMMENFASSUNG

Ungefähr 30 % der Patienten mit Sarkoidose benötigen eine immunsuppressive Therapie zur Linderung von Symptomen oder zur Verhinderung von Organschäden. Prednison und Methotrexat (MTX) sind die am häufigsten verwendeten Therapien; jedoch variiert das Therapieansprechen erheblich zwischen Patienten. Ziel dieser Studie war es, Protein-Signaturen extrazellulärer Vesikel (EVs) zu identifizieren, die mit dem Therapieansprechen assoziiert sind. Eine proteomische Analyse (LC–MS/MS) wurde bei Sarkoidose-Patienten durchgeführt, die entweder mit Prednison (n = 20) oder MTX (n = 20) behandelt wurden. Zehn Kandidatenproteine (fünf pro Behandlungsgruppe) wurden für eine Replikation in einer großen retrospektiven Kohorte (n = 90) und anschließende Validierung in einer prospektiven Kohorte (n = 22) ausgewählt. Wir identifizierten 67 differentexprimierte Proteine (DEPs) zwischen Respondern und Non-Respondern auf Prednison und 38 DEPs für MTX. Die Reactome-Pfadanalyse zeigte, dass DEPs, die mit dem Prednison-Ansprechen assoziiert waren, primär an Metalloproteinasen-Aktivität und Toll-like-Rezeptor-Signalisierung beteiligt waren, während DEPs, die mit dem MTX-Ansprechen assoziiert waren, mit GPCR-Signalisierung und Hämostase verknüpft waren. Komplementfaktor I (CFI) blieb beim Prednison-Responder zum Zeitpunkt baseline signifikant unterschiedlich (Replikation $p < 0,001$; Validierung $p = 0,023$). Komplementkomponente C8 (C8) zeigte eine differentielle Expression bei MTX-Respondern (Replikation $p = 0,032$; Validierung $p = 0,066$).

Diese Befunde zeigen, dass EV-Proteinprofile sich zwischen Respondern und Non-Respondern auf Prednison oder MTX bei pulmonaler Sarkoidose unterscheiden und zukünftige personalisierte Therapiewahl unterstützen können.

---

1. Einleitung

Sarkoidose ist eine systemische entzündliche Erkrankung, die durch die Bildung nicht-kaösierender Granulome charakterisiert ist, die hauptsächlich Lungen und Lymphknoten betreffen.1,2 Sarkoidose hat einen heterogenen und oft unberechenbaren Krankheitsverlauf, der von selbstlimitierend bis zu einem chronischen, manchmal progressiven Verlauf reicht, der eine Behandlung erfordert.3,4 Bei Sarkoidose benötigen etwa 10–30 % der Patienten eine Behandlung, aber aufgrund des heterogenen Verlaufs bleibt dies eine Herausforderung.3–5 Die erste Wahl zur Behandlung pulmonaler Sarkoidose sind orale Kortikosteroide wie Prednison, wie in den aktuellen Leitlinien zum Management der Sarkoidose angegeben.6 Allerdings ist Langzeitgebrauch mit beeinträchtigter Lebensqualität7,8 verbunden, und ein signifikanter Teil der Patienten spricht nicht auf Prednison-Therapie an. Wenn Prednison keine Option/unwirksam ist, wird eine Therapie mit Methotrexat (MTX) eingeleitet.8,9 Kürzliche Studien haben gezeigt, dass die Wirkung von MTX in

Bezug auf Veränderung der Lungenfunktion nicht unterlegen zu Prednison ist,10 was den ungedeckten Bedarf an Biomarkern weiter erhöht, die Therapiestufen steuern und das Therapieansprechen sowohl auf Prednison als auch auf MTX bei Sarkoidose vorhersagen können.11 Während Variabilität im Therapieansprechen ein bekanntes Phänomen bei Sarkoidose ist, ist nicht bekannt, ob die Therapie auf die Fähigkeit zum Ansprechen angepasst werden kann. Kürzliche Studien, sowohl bei interstitiellen Lungenerkrankungen als auch bei anderen Störungen, haben vielversprechende Ergebnisse bei der Analyse von blutbasierten Extraktionen extrazellulärer Vesikel (EVs)12,13 gezeigt, was dies zu einem interessanten neuen Kompartiment für die Suche nach Biomarkern bei Sarkoidose macht. EVs wurden lange als Abfallentsorgungssystem von Zellen angesehen; jedoch fand in den letzten zwei Jahrzehnten ein Wandel statt, bei dem EVs als kritischer Faktor in der interzellulären Kommunikation anerkannt werden.14 EV ist ein Oberbegriff für alle in Körperflüssigkeiten gefundenen Vesikel, einschließlich Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körperchen. Die meisten Zelltypen, einschließlich respiratorischer Zellen, verwenden EVs für interzelluläre Kommunikation, indem sie sie in den extrazellulären Raum freisetzen. Die Lunge ist das Organ mit der höchsten vaskulären Dichte im menschlichen Körper. Daher trägt sie substantiell zur Zirkulation von EVs bei, die wiederum kritische Rollen in der normalen Lungenphysiologie spielen.15 In früheren Forschungen untersuchten wir den Wert von EVs als Quelle potenzieller prädiktiver Biomarker für das Therapieansprechen bei Sarkoidose-Patienten.16 Wir analysierten EVs auf vier vorausgewählte Proteine und stellten fest, dass potenzielle Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern auf Prednison- und MTX-Therapie vorhanden waren. In dieser Studie werden wir einen ungerichteten Proteomik-Ansatz unter Verwendung von markierungsfreier Flüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) durchführen, um nach spezifischen Biomarkern innerhalb von EVs zu suchen, die für das Therapieansprechen vorhersagbar sind. Ohne Abhängigkeit von Antikörpern ist MS-basierte Proteomik eine ideale Technologie zur Entdeckung neuer Biomarker.17

---

2. Ergebnisse

2.1. Patientenmerkmale

Die Merkmale der in die drei Kohorten eingeschlossenen Sarkoidose-Patienten sind in Supplemetar Tabelle S2 dargestellt, mit einem Stern für signifikanten Unterschied. Keiner Unterschied wurde für Ethnie, Geschlecht und Raucheranamnese zwischen Patienten beobachtet, die mit Prednison und MTX behandelt wurden, für jede Kohorte. Nur Kohorte 2 zeigte eine signifikant jüngere Kohorte von Patienten, die mit Prednison behandelt wurden ($p = 0,021$). Keiner Unterschied wurde für Lungenfunktion (FVC oder DLCO) beim baseline zwischen Patienten beobachtet, die mit Prednison und MTX behandelt wurden.

2.2. Sarkoidose-assoziiertes Proteinprofil

Für Kohorte 1 gab keinen signifikanten Unterschied für Ethnie, Alter, Geschlecht oder Raucheranamnese zwischen Patienten und gesunden Kontrollen. Abbildung 1 zeigt die Verteilung der Proteine, die bei Patienten mit Sarkoidose im Vergleich zu gesunden Kontrollen identifiziert wurden. Insgesamt wurden 405 Proteine identifiziert (272 in LDL und 113 in HDL). Von den 405 identifizierten Proteinen waren 96 (23,7 %) differentexprimiert ($p < 0,10$) zwischen Patienten mit Sarkoidose und gesunden Kontrollen, Proteine sind in Supplemetar Tabelle S3 aufgelistet. Diese Proteine sind in rot im Volcano-Plot dargestellt (Abbildung 1). Proteine mit positiver Fold Change waren bei gesunden Kontrollen hochreguliert, während Proteine mit negativer Fold Change bei Sarkoidose-Patienten hochreguliert waren. Der Großteil der Proteine (65,6 %) wurde in der LDL-Fraktion identifiziert. Ein Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk wurde mit Hilfe von STRING für die differentexprimierten Proteine (DEPs) konstruiert, um ein Assoziationsnetzwerk dieser Proteine zu erhalten. Abbildung S1 zeigt das vorhergesagte Proteinnetzwerk der differentexprimierten Proteine zwischen Sarkoidose-Patienten und gesunden Kontrollen. Vier Netzwerke wurden aus den DEPs identifiziert. Diese Cluster waren mit Pfaden der Komplementaktivierung und Gerinnungskaskaden assoziiert. Mit Hilfe der Reactome-Pfadanalyse identifizierten wir verwandte molekulare und biologische

Prozesse der differentexprimierten Proteine. Die Pfade, die den Schwellenwert erreichten (-log10(p-Wert) ≥ 1,0), sind in Abbildung 2 dargestellt. Laut der Pfadanalyse spielten die identifizierten Proteine eine Rolle im adaptiven Immunsystem, Infektionskrankheiten und immunregulatorischen Interaktionen zwischen lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen. Pfade, die durch differentexprimierte Proteine angereichert wurden, umfassten am prominentesten Toll-like-Rezeptor (TLR)-Kaskaden ($p < 0,001$), aber auch alternative Komplementaktivierung und Signalgebung durch Interleukine (Abbildung 2).

2.3. Prädiktiver Biomarker-Entdeckung

In Kohorte 1 erhielt die Hälfte der Sarkoidose-Patienten Behandlung mit Prednison und die andere Hälfte wurde mit Methotrexat behandelt. Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen baseline Lungenfunktion zwischen Respondern und Non-Respondern für entweder Prednison oder MTX beobachtet. Unter Verwendung von LC-MS/MS wurden 423 Proteine für die Gruppe identifiziert, die mit Prednison behandelt wurde, und 425 Proteine für die Gruppe, die mit MTX behandelt wurde, mit einer Überlappung von 405 Proteinen, die in beiden Behandlungsgruppen identifiziert wurden. Um Proteine mit prädiktivem Potenzial für das Ansprechen auf Behandlung zu identifizieren, wurde die FC berechnet. Abbildung 3 zeigt 67 (15,8 %) Proteine, die potenziell prädiktiv in der Patientengruppe waren, die mit Prednison behandelt wurde, und 38 (8,9 %) Proteine in der Patientengruppe, die mit MTX behandelt wurde (Proteine mit einem p-Wert < 0,10). Von diesen 105 Proteinen gab es eine Überlappung von nur sechs Proteinen, die in beiden Behandlungsgruppen vorhanden waren; diese Proteine umfassten: Biotinidase, Ficolin-2, histidinreiches Glykoprotein, Phosphatidylinositol-Glykan-spezifische Phospholipase D, Thrombozytenbasisprotein und Serumamyloid A-1-Protein.

Interaktion der DEPs zwischen Respondern und Non-Respondern für entweder Prednison oder MTX wurde in einem Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk visualisiert (Abbildung S2). Zwei Cluster wurden für die DEPs gefunden, die in der mit Prednison behandelten Gruppe identifiziert wurden, und drei Cluster für die mit MTX behandelte Gruppe. DEPs in der Prednison-Gruppe waren mit Blutmikropartikeln und Aktivierung des Komplementsystems assoziiert, während DEPs in der MTX-Gruppe an Gerinnungskaskaden, Protein-Lipid-Komplexen und intermediärer Filamentorganisation beteiligt waren.

Von den DEPs mit einer FC > 1,2 oder < -1,2, sind die Top zehn der Proteine mit dem größten signifikanten Unterschied zwischen Respondern und Non-Respondern für entweder Prednison oder MTX in Supplemetar Tabelle S4 aufgelistet. Für die Proteine, die differentexprimiert waren zwischen Respondern und Non-Respondern, die entweder mit Prednison oder MTX behandelt wurden, wurde eine Reactome-Clustering-Pfadanalyse durchgeführt (Abbildung 4). Wir bemerkten, dass viele Proteine an Immunpfaden beteiligt waren.

2.4. Replikation differentexprimierter Proteine

Zur Replikation wurde eine Auswahl der Top fünf Kandidatenproteine für jede Behandlung aus Kohorte 1 durch Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in einer größeren Validierungskohorte (Kohorte 2) quantifiziert. Ausgewählte Proteine sind in Supplemetar Tabelle S1 aufgelistet. Keiner Unterschied wurde für Ethnie, Geschlecht, Alter oder Raucherstatus zwischen Respondern und Non-Respondern für jede Behandlungsgruppe beobachtet. In der mit Prednison behandelten Gruppe war jedoch baseline FVC (%pred) in der Responder-Gruppe signifikant niedriger ($p = 0,006$). Von den zehn Proteinen, die zur Validierung ausgewählt wurden, blieben vier signifikant unterschiedlich zwischen Respondern und Non-Respondern, wie in Abbildung 5 dargestellt. Serpin A3, Komplementfaktor H (CFH) und Komplementfaktor I (CFI) waren beim baseline für die Responder-Gruppe, die mit Prednison behandelt wurde, signifikant höher ($p = 0,034$; $p = 0,002$; $p < 0,001$, respective). Darüber hinaus korrelierten Proteinspiegel von CFH und CFI miteinander ($R = 0,67$; $p < 0,001$), aber nicht mit Serpin A3. In der mit MTX behandelten Patientengruppe war Komplementkomponente C8 (CC8) beim baseline signifikant niedriger, die auf Behandlung reagierten ($p = 0,032$).

Um den potenziellen prädiktiven Wert dieser Proteine zu definieren, verglichen wir den Konzentrationsunterschied zwischen Respondern und Non-Respondern, wenn aus EVs abgeleitet, mit den Proteinen, die aus ganzem Serum abgeleitet wurden. Die Konzentration von CFI, gemessen in EVs, korrelierte schwach mit der im Serum gemessenen Konzentration (R = 0,28; p = 0,049). Von den vier Proteinen, die in EVs signifikant unterschiedlich waren, waren keine signifikant unterschiedlich zwischen Respondern und Non-Respondern, wenn im Serum gemessen. Dies legt nahe, dass die beobachteten Assoziationen spezifisch für die EV-anreicherte Fraktion sind, anstatt Unterschiede in den Gesamt-zirkulierenden Proteinkonzentrationen widerzuspiegeln.

Unter Betrachtung der Verbesserung der Lungenfunktion nach 24 Wochen Behandlung korrelierten EV-Konzentrationen von Serpin A3 und CFH sowie CFI moderat mit Verbesserung in FVC %pred nach 24 Wochen Behandlung mit Prednison (R = 0,38, p = 0,013; R = 0,47, p = 0,001; R = 0,57, p < 0,001, respective). Darüber hinaus korrelierte CFH auch mit Verbesserung von DLCO %pred (R = 0,41, p = 0,008). In der mit MTX behandelten Gruppe korrelierte keines der Proteine mit Verbesserung der Lungenfunktion nach 24 Wochen Behandlung.

2.5. Validierung von Kandidaten-Biomarkern in prospektiven Proben

Proteine, die in Kohorte 2 signifikant blieben, wurden in einer dritten Kohorte validiert, bestehend aus 11 Patienten, die mit Prednison behandelt wurden, und 11 Patienten, die mit MTX behandelt wurden. Hinsichtlich klinischer Merkmale wurde kein Unterschied für Alter, Geschlecht, Ethnie oder Scadding-Stadium zwischen Respondern und Non-Respondern für jede der Behandlungsgruppen gesehen. Darüber hinaus wurde kein signifikanter Unterschied für baseline Lungenfunktion zwischen Respondern und Non-Respondern für jede Behandlungsgruppe beobachtet.

Beim baseline wurde ein signifikanter Unterschied für CFI (p = 0,023) und ein Trend für CC8 (p = 0,066) zwischen Respondern und Non-Respondern beobachtet (Abbildung 6). Zusätzlich wurden Konzentrationen der Kandidatenproteine auch mit Konzentrationen von ACE und sIL-2R verglichen. Keines der Proteine korrelierte mit baseline Konzentrationen von ACE oder sIL-2R. Blut wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Behandlung genommen; baseline (0 Wochen), 4 Wochen, 16 Wochen und nach 24 Wochen. Für Serpin A3 korrelierte die Konzentrationsänderung mit Verbesserung von FVC %pred während 24 Wochen Behandlung mit Prednison (R = 0,66; p = 0,039).

---

3. Diskussion

Differentexprimierte Proteine in extrazellulären Vesikeln (EVs) repräsentieren einen vielversprechenden Ansatz, um personalisierte Behandlungsstrategien zu unterstützen. In dieser Studie führten wir eine ungerichtete proteomische Analyse unter Verwendung von LC-MS/MS durch, um potenzielle Biomarker zu identifizieren, die mit dem Therapieansprechen bei Sarkoidose assoziiert sind. Unter Verwendung bioinformatischer Ansätze identifizierten wir differentexprimierte Proteine (DEPs), ihre Interaktionen und assoziierte biologische Pfade bei Patienten mit Sarkoidose. Zusätzlich bewerteten wir das prädiktive Potenzial dieser Proteine für das Therapieansprechen entweder mit Prednison oder MTX. Frühe Selektion der optimalsten Therapie könnte Patientenergebnisse substantiell verbessern, indem Nichtansprechen reduziert, Therapiewechsel und Nebenwirkungen begrenzt und irreversible Organschäden verhindert werden. Insgesamt identifizierten wir vier Proteine (3 für Prednison und 1 für MTX) in EV-Proben, die konsistent differentexprimiert waren zwischen Respondern und Non-Respondern.

Proteomik wurde als hohe Prioritätsbereich erkannt, um das Verständnis von Sarkoidose voranzutreiben.18 Vergleich von Proteinexpression zwischen Sarkoidose-Patienten und gesunden Kontrollen offenbarte Pfade, die am adaptiven Immunsystem und immunregulatorischen Interaktionen zwischen lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen beteiligt waren, mit Toll-like-Rezeptor (TLR)-Signalisierung als einer der am meisten signifikant angereicherten Pfade. Bereits vor Jahrzehnten wurde Sarkoidose hypothesiert, aus deregulierter

TLR-Antwort zu resultieren, anstatt von einem einzelnen kausalen Pathogen.19–21 Im Einklang mit diesen Befunden beobachteten wir Anreicherung von TLR-verwandten Pfaden im Vergleich zwischen Prednison-Respondern und Non-Respondern. Glukokortikoide sind bekannt dafür, TLR-vermittelte Signalisierung zu modulieren durch Suppression proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α und IL-1β, während sie antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 induzieren,22 was ihren differentiellen Effizienz bei Patienten erklären könnte.

Pfadanalyse zeigte weiterhin, dass DEPs, die mit Prednison-Ansprechen assoziiert waren, hauptsächlich an Matrix-Metalloproteinasen (MMP)-Aktivität und TLR-Kaskaden beteiligt waren, während DEPs, die mit MTX-Ansprechen verknüpft waren, primär mit G-Protein-gekoppeltem Rezeptor (GPCR)-Signalisierung und Hämostase assoziiert waren. Bemerkenswert, von den 105 DEPs identifiziert in beiden Behandlungsgruppen, waren nur sechs geteilt, was substantielle biologische Heterogenität innerhalb der Sarkoidose-Population nahelegt, die Behandlungsergebnisse beeinflussen könnte. Von diesen DEPs wurden fünf Proteine pro Behandlungsgruppe für Replikation in einer größeren retrospektiven Kohorte ausgewählt. In dieser Replikationskohorte blieben drei Proteine (Serpin A3, Komplementfaktor H und Komplementfaktor I) signifikant unterschiedlich zwischen Respondern und Non-Respondern, die mit Prednison behandelt wurden, und ein Protein (Komplement C8) blieb signifikant in der MTX-Gruppe. Anschließend Validierung in einer kleineren prospektiven Kohorte bestätigte CFI als signifikant, wobei C8 einen ähnlichen Trend zeigte.

Das Komplementsystem, bestehend aus mehr als 50 Proteinen, spielt eine zentrale Rolle in der Host-Verteidigung durch Erkennung und Clearing fremder Komponenten. Monozyten produzieren eine breite Palette von Komplementproteinen, einschließlich Komplement C8, eine terminale Pfadkomponente, die zur Bildung des Membranangriffskomplexes beiträgt, die zu Zellyse führt.23 Strikte Regulation dieses Systems ist essentiell, um Schäden an Host-Gewebe zu verhindern, und Schlüsselregulationsproteine umfassen CFH und CFI.24–26 Frühere Studien haben lokale Produktion von CFH und CFI durch Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen in entzündetem Gewebe, wie in rheumatoider Arthritis, demonstriert.27,28 CFI reguliert sowohl klassische als auch alternative Komplementpfade, oft zusammen mit Kofaktoren wie CFH.29,30 In unserer Studie korrelierten Spiegel von CFH und CFI, und niedrigere baseline Spiegel dieser Proteine wurden bei Non-Respondern auf Prednison beobachtet. Defizit von CFH oder CFI kann zu unkontrollierter Komplementaktivierung, beeinträchtigtem Immunkomplex-Clearing, reduzierter Phagozytose und verminderter Antikörperproduktion führen. Immunsuppressive Therapien können auch Antikörperbildung gegen diese Regulatoren beeinflussen.25,29

Wichtig, Komplement-Signalisierung interagiert eng mit angeborenen Immunpfaden. Cross-talk zwischen Komplementkomponenten und TLR-Signalierung in Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen kann Entzündung via Aktivierung von Mitogen-aktivierter Proteinkinase/Extrazellulär-Signal-regulierter Kinase (MAPK/ERK)-Signalisierung und nachfolgende NF-kB-Aktivierung amplifizieren.31–33 Wir haben zuvor Beteiligung dieser Pfade bei Reaktion auf Prednison-Behandlung demonstriert.34 Darüber hinaus wurde Überexpression von CFI mit erhöhter MMP-Produktion verknüpft,35 was relevant angesichts der etablierten Rolle von MMPs in Geweberemodellierung, Fibrose und Degradation des Lungparenchyms.36

Für MTX fanden wir, dass Beteiligung der GPCR-Signalweg das Ansprechen vorhersagte. GPCR-GPI-Proteinkomplexe sind bekannt, diverse biologische Funktionen zu vermitteln und wichtige therapeutische Ziele darzustellen.37 Eine gut charakterisierte GPCR, relevant für MTX-Wirkung, ist der Adenosinrezeptor.38 MTX erhöht extrazelluläre Adenosinspiegel am Ort der Entzündung, wodurch antiinflammatorische Wirkungen fördert, einschließlich Induktion von IL-10.39,40 GPCR-Signalisierung spielt eine kritische Rolle in der Regulation von Makrophagenfunktion und angeborener Immunität,41,42 und Interaktionen mit glykophosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen modulieren diese Prozesse weiter.37 Wir demonstrierten zuvor, dass GPI-verankerte Proteine mit Therapieansprechen bei MTX-

behandelten Patienten assoziiert sind.43 In der vorliegenden Studie waren niedrigere Spiegel von Komplement C8 potentiell mit besserem Ansprechen auf MTX assoziiert.

Unsere Studie kommt mit einigen Limitationen. Erstens, wegen des retrospektiven Designs der Studie war nicht alle Informationen verfügbar. Patienten, die keine Lungenfunktionsdaten bis 24 Wochen nach Therapiebeginn hatten, konnten nicht in die Studie eingeschlossen werden. Darüber hinaus war Behandlung mit Prednison oder MTX nicht 1:1 randomisiert, sodass möglicherweise andere Faktoren eine Rolle bei der Verschreibung von MTX anstelle von Standardbehandlung mit Prednison gespielt haben könnten. Dies könnte einen Selektionsbias in unseren Kohorten verursacht haben. Zweitens wurden longitudinale Proteinmessungen in einer relativ kleinen Kohorte mit einer Überrepräsentation von Respondern durchgeführt. Zukünftige Studien in größeren Kohorten, wie die PREDMETH-Studie, sind erforderlich, um diese Befunde zu validieren und klinische Translation zu erleichtern. Drittens wurde das Ansprechen auf Behandlung durch Verbesserung der Lungenfunktion gemessen, basierend auf FVC oder DLCO. Rückgänge in der Spirometrie sind oft minimal, was problematisch ist, krankheitsbedingte Veränderungen von Hintergrundvariation zu unterscheiden, die oft bei seriellen Tests beobachtet wird.44–46 Um dies abzuschwächen, wandten wir klinisch relevante Schwellenwerte an (≥5 % Änderung in FVC oder ≥10 % in DLCO), um Ansprechen zu definieren. Obwohl kein etablierter minimaler klinisch wichtiger Unterschied (MCID) für Sarkoidose definiert wurde, werden diese Schwellenwerte üblicherweise in der klinischen Praxis verwendet, um bedeutsame Veränderungen der Lungenfunktion von normaler Messvariabilität zu unterscheiden.10,47 Viertens, obwohl extrazelluläre Vesikel isoliert und unter Verwendung eines etablierten Protokolls analysiert wurden, wurden zusätzliche Charakterisierungstechniken wie Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) und EV-Marker-Validierung innerhalb der aktuellen Studie nicht durchgeführt. Darüber hinaus kann die Isolierungsmethode Lipoproteine und lösliche Plasmaproteine ko-isolieren, und daher kann ihr Beitrag zu den detektierten Proteinsignalen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Ebenso erlauben die aktuellen Daten keine Unterscheidung zwischen Proteinen, die innerhalb von EVs verkapselt sind, und Proteinen, die mit der EV-Oberfläche assoziiert sind. Jedoch, zur Unterstützung der Validität unseres Ansatzes, verweisen wir auf frühere Arbeiten, in denen diese Isolierungsmethode unter Verwendung von Elektronenmikroskopie, Nanopartikel-Tracking-Analyse und Ko-lokalisation von Proteinen mit EV-Markern validiert wurde.48–50 Außerdem zeigten Wang et al., dass Dextran-Sulfat-Fällung EVs anreichert, die durch Dichte-Gradienten-Fraktionierung von ko-isolierten Lipoproteinen getrennt werden können, wobei die meisten Proteine in EV-enthaltenden Fraktionen detektiert wurden.49 Jedoch kann die aktuelle Studie nicht vollständig Beiträge von ko-isolierten Plasmakomponenten ausschließen.

Darüber hinaus erlaubte die relativ kleine Stichprobengröße, besonders nach Aufteilung von Patienten in Responder- und Non-Responder-Gruppen innerhalb der Prednison- und Methotrexat-Kohorten, keine robuste multivariable-adjustierte Analyse ohne ein substantielles Risiko der Überanpassung. Größere Studien sind erforderlich, um diese Befunde zu validieren und potenzielle Confounding-Faktoren zu berücksichtigen.

Dennoch ist eine große Stärke dieser Studie der umfassende proteomische Entdeckungsansatz, gefolgt von Replikation in einer großen retrospektiven Kohorte und Validierung in einer prospektiven Kohorte. Zusätzlich heben unsere Befunde hervor, dass EV-Proteinprofile sich von denen im Serum unterscheiden und eine sensitivere und biologisch relevantere Quelle von Biomarkern darstellen können. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse das Potenzial von EV-ableiteten Proteinen als Kandidaten-prädiktive Biomarker, um personalisierte Behandlung bei Sarkoidose zu steuern.

---

4. Schlussfolgerung

EV-Proteinprofile unterscheiden sich erheblich zwischen Respondern und Non-Respondern auf Prednison und Methotrexat bei pulmonaler Sarkoidose, was unterschiedliche zugrundeliegende biologische

Mechanismen widerspiegelt. Diese Befunde unterstützen das Potenzial der EV-Proteomik als minimal-invasives Werkzeug, um personalisierte Therapiewahl zu steuern und klinische Ergebnisse zu verbessern.

---

5. Materialien und Methoden

5.1. Studienpatienten und Ethik

Patienten mit Behandlungsindikation für pulmonale Sarkoidose wurden aus der ILD-Biobank-Datenbank des St. Antonius Hospitals ausgewählt. Alle Patienten mit Sarkoidose wurden entsprechend den internationalen ATS/ERS/WASOG-Kriterien diagnostiziert.51 Patienten wurden als "Responder" im Fall einer Zunahme und "Non-Responder" im Fall einer Abnahme von ≥5 % für FVC % pred oder ≥10 % für DLCO % pred nach 24 ± 2 Wochen im Vergleich zu baseline (vor Behandlung) klassifiziert, wie zuvor berichtet.34 Darüber hinaus konnten Patienten nur eingeschlossen werden, wenn Serumproben innerhalb von 6 Monaten vor Beginn von Prednison oder MTX verfügbar waren. Baseline-Merkmale, Lungenfunktion und Organmanifestationen wurden aufgezeichnet.

Diese Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki und GCP-Leitlinien durchgeführt. Der retrospektive Aspekt der Studie wurde durch das Medizinische Forschungsethikkomitee United (MEC-U) des St. Antonius Hospital (R05-08A) genehmigt, und der prospektive Aspekt der Studie wurde durch das MEC-U des Erasmus Medical Center mit der Protokollreferenznummer MEC-2019-0730 genehmigt. Schriftliche Einwilligung wurde von allen Patienten eingeholt.

5.2. Prädiktive EV-Biomarker: Analyse und Validierung

EV-Isolierung basierte auf vorheriger Forschung.16,34 Wie in vorherigen Validierungsstudien beschrieben, reichert diese Dextran-Sulfat-basierte Isolierungsmethode EVs an, kann aber auch Lipoproteine und zirkulierende Proteine ko-isolieren.48–50 Der Workflow für EV-Isolierung und Massenspektrometrie-EV-Biomarker-Entdeckungsanalyse und Validierung ist im Supplement beschrieben und in Abbildung 7 zusammengefasst. Zusätzliche EV-Charakterisierung durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) und EV-Marker-Validierung wurde in der aktuellen Studie nicht durchgeführt, da das Isolierungsprotokoll zuvor unter Verwendung dieser komplementären Methoden validiert wurde.48–50

Die Studie ist in drei Phasen unterteilt wie folgt:

Kohorte 1: Für die Biomarker-Entdeckungsphase wurden 40 Sarkoidose-Patienten ausgewählt. Insgesamt hatten 20 Patienten Behandlung mit Prednison erhalten (n = 10 Responder vs n = 10 Non-Responder). Gleichermaßen wurden 20 Patienten, die mit MTX behandelt wurden, ausgewählt (n = 10 Responder vs n = 10 Non-Responder). Zusätzlich wurden 10 gesunde Kontrollen hinzugefügt. Die Kontrollkohorte war ähnlich alt und ethnisch wie die Sarkoidose-Kohorte.

Kohorte 2: Eine zweite Kohorte bestand aus 90 Sarkoidose-Patienten, die für Replikation einer Auswahl differentexprimierter Proteine aus dem Proteomik-Ansatz verwendet wurden, die in Kohorte 1 entdeckt wurden. Dies ergab 40 Patienten, die mit Prednison behandelt wurden (22 Responder vs 18 Non-Responder) und 50 Patienten, die mit MTX behandelt wurden (28 Responder vs 22 Non-Responder).

Kohorte 3: Für die Validierung der Kandidaten-Biomarker und zur Überwachung von Proteinverhalten über die Zeit wurden Sarkoidose-Patienten aus der prospektiven PREDMETH-Kohorte11, die Behandlung in unserem Hospital erhielten, ausgewählt. Blutentnahme wurde beim baseline (vor Behandlungsbeginn) und nach 4, 16 und 24 Wochen Behandlung mit entweder Prednison oder MTX durchgeführt. Dies ergab eine Kohorte von 11 Sarkoidose-Patienten, die mit Prednison behandelt wurden (8 Responder vs 3 Non-Responder) und 11 Patienten, die mit MTX behandelt wurden (7 Responder vs 4 Non-Responder).

5.3. Datenanalyse

Um signifikante Veränderungen in Proteinen zu detektieren, die durch LC-MS/MS identifiziert wurden, wurde eine Fold Change (FC) berechnet, indem Proteinkonzentrationen der Responder durch Konzentrationen der Non-Responder dividiert wurden. Eine Fold Change > 1,2 wurde als klinisch wertvoll betrachtet.52,53 Die log2-Abundanz jedes Proteins wurde berechnet, um den Effekt der Schiefe in der Verteilung der Proteinspiegel zu reduzieren. Um signifikante Unterschiede in Protein-Abundanz zu berechnen, wurde ein moderierter t-Test durchgeführt. Nicht-parametrische Tests wurden für nicht-normalverteilte Daten verwendet (Mann-Whitney-U-Test). Ein PPI-Netzwerk der differentexprimierten Proteine wurde durch die Verwendung einer STRING-Protein-Protein-Interaktions-Datenbank (http://string-db.org/) konstruiert. Das PPI-Netzwerk wurde durch Setzen des Konfidenzwerts auf 0,4 erhalten und mit Cytoscape-Software Version 3.10.0 visualisiert. Die differentexprimierten Proteine wurden funktionell weiter analysiert unter Verwendung der Reactome-Datenbank und des R-Pakets clusterProfiler.54 Aufgrund der kleinen Stichprobengröße der Entdeckungsdurchgangskohorte wurden Proteine, die differentielle Expression mit einem p-Wert <0,1 zeigten, als potenziell prädiktiv betrachtet.

CRediT-Autorenschaftsbeitragsstatement

Raisa Kraaijvanger: Schreiben – ursprüngliches Entwurf, Visualisierung, Validierung, Projektverwaltung, Methodik, Untersuchung, Formale Analyse, Datenerfassung, Konzeptualisierung. **Montse Janssen Bonás:** Schreiben – ursprüngliches Entwurf, Visualisierung, Methodik, Datenerfassung. **Ioanna Paspali:** Schreiben – Überprüfung & Redigierung, Methodik, Datenerfassung. **Freek G. Bouwman:** Schreiben – Überprüfung & Redigierung, Methodik, Datenerfassung. **Claudia Roodenburg:** Schreiben – Überprüfung & Redigierung, Methodik, Datenerfassung. **Jelle R. Miedema:** Schreiben – Überprüfung & Redigierung. **Dominique P.V. de Kleijn:** Schreiben – Überprüfung & Redigierung, Aufsicht, Methodik. **Jan C. Grutters:** Schreiben – Überprüfung & Redigierung, Aufsicht. **Marcel Veltkamp:** Schreiben – Überprüfung & Redigierung, Aufsicht, Mittelakquisition, Konzeptualisierung. **Coline H.M. van Moorsel:** Schreiben – Überprüfung & Redigierung, Aufsicht, Methodik, Mittelakquisition, Konzeptualisierung.

Förderinformations

Diese Studie wird finanziert von der Lungfoundation, Niederlande unter Grant [Nummer 5.1.19.035]; und von dem St. Antonius Onderzoeksfonds unter Grant [Nummer 21.07]. Geldgeber hatten keine Beteiligung am Studiendesign; bei der Sammlung, Analyse und Interpretation der Daten; bei der Verfassen des Berichts oder bei der Entscheidung, das Papier für die Veröffentlichung einzureichen.

Erklärung des Interessenkonflikts

Die Autoren erklären, dass sie keine bekannten konkurrierenden finanziellen Interessen oder persönlichen Beziehungen haben, die darauf hätten Einfluss nehmen können, die in diesem Papier berichtete Arbeit.

Appendix A. Ergänzungsdaten

Ergänzungsdaten zu diesem Artikel können online gefunden werden unter https://doi.org/10.1016/j.vesic.2026.100112.

Referenzen

(Die vollständige Referenzliste aus dem Originaldokument wird hier belassen, da es sich um zitierfähige Quellen handelt)

übersetzt mit lumo.proton.me