

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Veränderungen des Granulozytenproteoms  
in Erkrankungsmodellen bei Schwein und Pferd**

von  
Maria Anita Elisabeth Weigand  
aus Moosburg an der Isar

München 2021



Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring  
Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann  
Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka  
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Tag der Promotion: 6. Februar 2021



*Meiner Familie*



## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATUR .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Granulozyten.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Einteilung .....	3
2.1.2 Neutrophile Granulozyten.....	4
2.1.2.1 Lebenszyklus.....	5
2.1.2.2 Phagozytose und oxidativer Burst .....	7
2.1.2.3 Degranulation.....	7
2.1.2.4 Bildung von NETs.....	10
2.1.2.5 Subpopulationen .....	11
2.1.2.6 Immunregulation.....	13
<b>2.2 Diabetes mellitus .....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Definition.....	15
2.2.2 Ätiologie .....	16
2.2.3 Immunsystemveränderungen bei Diabetes mellitus .....	18
2.2.4 Translationale Tiermodelle in der Diabetesforschung.....	19
2.2.5 <i>INS<sup>C94Y</sup></i> transgene Schweine als Diabetesmodell .....	20
<b>2.3 Equine rezidivierende Uveitis .....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Bedeutung und Klinik .....	21
2.3.2 Beteiligte Immunzellen .....	22
<b>2.4 Differentielle Proteomanalyse.....</b>	<b>23</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>3</b>	<b>PUBLIKATION I .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>PUBLIKATION II .....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>93</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

2D-DIGE	Zweidimensionale Differenz-Gelelektrophorese
AGEs	engl. advanced glycation end products
ATP	Adenosintriphosphat
CCL	CC-Chemokinligand
CD	engl. cluster of differentiation
CRALBP	Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
CRLs	Cullin-haltige RING (engl. really interesting new gene)-Ligasen
CRP	C-reaktives Protein
CSN	COP9 Signalosom
CXCL	CXC-Chemokinligand
CXCR	CXC-Rezeptor
DCs	Dendritische Zellen
DDA	Datenabhängige Akquisition (engl. data dependent acquisition)
DIA	Datenunabhängige Akquisition (engl. data independent acquisition)
dl	Deziliter
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleid acid)
EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
engl.	Englisch
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
Fig.	Abbildung (engl. figure)
GAD	Glutamatdecarboxylase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. granulocyte colony-stimulating factor)
GLUT	Glukosetransporter
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. granulocyte–macrophage colony-stimulating factor)
G-MDSCs	engl. granulocytic myeloid-derived suppressor cells
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglobin
HbA <sub>1c</sub>	Glykiertes Hämoglobin
HDNs	engl. high-density neutrophils
HEC	Hyperinsulinämischer-euglykämischer Clamp
HOMA-IR	engl. homeostasis model of assessment of insulin resistance index
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IL	Interleukin

## Abkürzungsverzeichnis

---

I/NS	Insulin-Gen
IRBP	Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein
IκB	engl. inhibitory κB
I	Liter
LC	Flüssigchromatographie (engl. liquid chromatography)
LDGs	engl. low-density granulocytes
LDNs	engl. low-density neutrophils
LPS	Lipopolysaccharid
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. macrophage colony-stimulating factor)
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
MIDY	engl. mutant INS-gene-induced diabetes of youth
MLC-2C	regulatorische leichte Myosinkette 9 (engl. myosin regulatory light chain 9)
mmol	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MODY	engl. maturity-onset diabetes of the young
mol	Mol
MPO	Myeloperoxidase
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS1	Massenspektrum der Vorläuferionen
MS2	Massenspektrum der Produktionen
MYL9	Proteinkodierendes Gen von MLC-2C
NDM	Neonataler Diabetes mellitus
NDNs	engl. normal-density neutrophils
NE	Neutrophile Elastase
NETs	Neutrophile extrazelluläre Netze (engl. neutrophil extracellular nets)
NF-κB	engl. nuclear factor κB
NMII	Nicht-muskuläres Myosin Typ II
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. pathogen-associated molecular patterns)
PBMCs	Periphere mononukleäre Blutzellen (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMNs	Polymorpdkernige Neutrophile
RAGE	engl. receptor for advanced glycation end products
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)

## Abkürzungsverzeichnis

---

ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen ( <i>engl.</i> reactive oxygen species)
SGN2	Untereinheit 2 des COP9 Signalosoms
SNARE	<i>engl.</i> soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
tg	transgen
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>engl.</i> vascular endothelial growth factor)
XPT	Kreuz-Präsentation von Antigenen ( <i>engl.</i> antigen cross-presentation)

## Abkürzungsverzeichnis

---

## 1 EINLEITUNG

Granulozyten bilden zusammen mit Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs) und einer heterogenen Gruppe von spezialisierten lymphatischen Zellen den zellulären Teil der angeborenen Immunabwehr (Murphy et al. 2018). Sie stellen die erste Verteidigungsline des Körpers gegen eingedrungene Mikroorganismen dar, für deren erfolgreiche Bekämpfung sie verschiedene Strategien entwickelt haben, die teilweise vor gut 15 Jahren zum ersten Mal überhaupt beschrieben wurden (Brinkmann et al. 2004). Diese Entdeckung einer neutrophilen Immunabwehr über extrazelluläre DNA-Netze (engl. neutrophil extracellular nets, NETs) belebte das Forschungsfeld der neutrophilen Granulozyten nachhaltig, wie die seit 2008 stetig steigende Zahl der Veröffentlichungen belegt (PubMed-Recherche, September 2020, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die klassischen Abwehrmechanismen wie Phagozytose und die Freisetzung von antimikrobiellen Proteinen und aggressiven, reaktiven Sauerstoffverbindungen (engl. reactive oxygen species, ROS) wurden intensiv erforscht und werden, wie die NET-Bildung auch, als funktionelle Tests zur Beurteilung der Granulozytenreaktion vielfach angewendet (Herteman et al. 2017; Yang et al. 2019; Fingerhut et al. 2019; La Manna et al. 2019; Adrover et al. 2020; Hassani et al. 2020). Während also die schnelle, direkte Pathogenabwehr als Kernkompetenz dieser Zellen fest etabliert ist, deuten aktuelle Studien zunehmend darauf hin, dass Granulozyten weit mehr sind als nur eine homogene Population immunologischer Effektorzellen und auf bislang ungeahnte Weise an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen des Körpers mitwirken. So wird bei der Stoffwechselstörung Diabetes mellitus (DM) sowohl das erhöhte Infektionsrisiko als auch die verzögerte Wundheilung der Patienten auf eine funktionelle Beeinträchtigung der Granulozyten zurückgeführt (Wong et al. 2015; Toniolo et al. 2019). Ursächlich für diese gestörte Funktion der Immunzellen scheint die durch eine chronische Hyperglykämie und Hypoinsulinämie gekennzeichnete, diabetogene Stoffwechsellsage zu sein, vermutlich in Kombination mit der bei dieser Erkrankung auftretenden niedriggradig-systemischen Inflammation (Von Ah Morano et al. 2020; Hughes et al. 2020). Bei der Aufklärung dieser trotz Jahrzehntelanger Forschung noch unzureichend verstandenen Zusammenhänge erlauben transgene Tiermodelle die isolierte Betrachtung einzelner pathophysiologischer Aspekte getrennt voneinander (Renner et al. 2016). Dabei kommt Schweinen aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit zum Menschen im Hinblick auf Anatomie, Physiologie und Immunologie eine besondere Bedeutung zu (Renner et al. 2020). Beispielsweise lassen sich an *INS<sup>C94Y</sup>* transgenen Schweinen, einem Modell für den permanenten neonatalen DM des Menschen, die frühen Auswirkungen einer anhaltenden Hyperglykämie auf den Organismus beobachten (Renner et al. 2013).

## Einleitung

---

Ähnlich verhält es sich mit der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU), einer Autoimmunerkrankung, die sich am Auge der Pferde manifestiert und von wiederkehrenden Inflammationsschüben geprägt ist (Deeg et al. 2002a; Gerding and Gilger 2016). Die ERU stellt dabei das einzig spontane Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen dar (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2002b; Deeg et al. 2007b). Dort wurden autoreaktive T-Zellen, die gegen verschiedene okuläre Antigene gerichtet sind, als Auslöser der Entzündung identifiziert (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2007a). Zugleich treten bei der ERU aber auch Veränderungen der Granulozyten auf, was eine Beteiligung dieser Immunzellen an der Pathogenese der Erkrankung vermuten lässt (Degroote et al. 2013; Fingerhut et al. 2019). Ziel dieser Arbeit war es nun, Krankheits-assoziierte Veränderungen der Granulozyten in den beiden Großtiermodellen zu beschreiben und anhand der Ergebnisse Hypothesen zur jeweiligen Rolle der Immunzelle bei der Pathogenese der Erkrankung zu entwickeln.

## 2 LITERATUR

### 2.1 Granulozyten

#### 2.1.1 Einteilung

Die Unterteilung der Granulozyten in Neutrophile, Eosinophile und Basophile erfolgt historisch bedingt anhand der unterschiedlichen Anfärbung ihrer Granula mit polychromen Färbelösungen, wie von Paul Ehrlich bereits Ende des 19. Jahrhunderts für humane Blutpräparate beschrieben (Ehrlich 1879). Die Klassifikation der Granulozyten im Tier baut grundsätzlich auf einem homologen Färbeverhalten der Zellen im Blutausstrich auf. Allerdings können je nach Zellart Unterschiede bezüglich Größe und Färbung der einzelnen Granulatypen zwischen den Spezies beobachtet werden (zusammengefasst in (Weiss and Wardrop 2011)).

Basophile machen bei allen Säugetieren den geringsten Anteil an der Granulozytenpopulation aus und ihr Granula beinhalten neben dem Allergiemediator Histamin weitere biogene Amine, proteolytische Enzyme, Proteoglykane und das Major Basic Protein (Weiss and Wardrop 2011). Als spezifischer Oberflächenmarker für Basophile innerhalb einer gemischten Leukozytenfraktion kann der IgE-Rezeptors fungieren, dessen Quervernetzung als Aktivierungssignal auch die basophile Degranulation auszulösen vermag (Nakashima et al. 2018). Basophile Granulozyten vermitteln ihre Funktion einerseits über die Exozytose ihrer regenerierbaren Granula und andererseits durch die Sekretion *de novo* synthetisierter Botenstoffe (Gessner et al. 2005; Gilmartin et al. 2008). So freigesetztes Interleukin (IL)-4 und IL-13 kann im Anschluss die Differenzierung naiver Lymphozyten zu Typ-2-T-Helferzellen (Th2-Zellen) auslösen (Oh et al. 2007), was die Beteiligung der Basophilen an Th2-medierten Immunreaktionen, wie der atopischen Dermatitis oder der Parasitenbekämpfung, in der Maus erklärt (Yamanishi et al. 2020; Inclan-Rico et al. 2020). Ebenfalls im Mausmodell belegt ist, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, die Entstehung von IL-17 produzierenden T-Helferzellen (Th17-Zellen) unter dem Einfluss des basophilen IL-6 (Yuk et al. 2017). Daneben scheinen Basophile über die Freisetzung des Tumornekrosefaktors (TNF) andere Granulozyten bei deren Immunreaktion zu unterstützen, was bei Mäusen im Rahmen einer mittels Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Endotoxämie gezeigt wurde (Piliponsky et al. 2019).

Die anhand ihrer prominenten Granula im Blutausstrich der meisten Säuger leicht identifizierbaren eosinophilen Granulozyten fördern ebenso wie Basophile die Bekämpfung von Parasiten, wobei Eosinophile hier v.a. bei intestinalen Helminthen erfolgreich zu sein scheinen (Huang and Appleton 2016). Die vorwiegend im Gewebe lokalisierten eosinophilen Granulozyten werden über verschiedene Faktoren aktiviert (z.B. IL-5, IL-3, GM-CSF (engl.

granulocyte–macrophage colony-stimulating factor)) und so zur Sekretion unterschiedlicher Zytokine und zytotoxischer Substanzen aus ihren Sekundärgranula angeregt, die die Membran eines potenziellen Pathogens attackieren (zusammengefasst in (Esnault and Kelly 2016)). Zusätzlich können Eosinophile bei der induzierten Zytolyse neben extrazellulären DNA-Strukturen, ähnlich der NETs bei Neutrophilen, intakte Granula entlassen, die über funktionelle Rezeptoren in der Außenhülle zu einer regulierten Sekretion ihrer Inhaltsstoffe in der Lage sind (Ueki et al. 2013). Eine neuere Studie beschreibt für Eosinophile sogar eine immunregulatorische Funktion, da sie *in vitro* je nach eingesetztem Stimulans murine Makrophagen in unterschiedlicher Weise polarisierten (Yoon et al. 2019). *In vivo* wurde darüber hinaus gezeigt, dass im Darm lokalisierte eosinophile Granulozyten bei der Maus dort als antigenpräsentierende Zellen fungieren könnten (Xenakis et al. 2018).

## 2.1.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile weisen bei allen Tieren unter den Granulozyten die höchste Abundanz im peripheren Blut auf und lassen sich durch die in der Regel kaum anfärbbaren Granula und ihren stark segmentierten Kern im Blutausstrich gut von den beiden anderen granulozytären Zelltypen differenzieren (Fingerhut et al. 2020). Noch junge neutrophile Granulozyten besitzen hingegen einen eher hufeisen- oder s-förmigen Nucleus und diese sogenannten stabkernigen Neutrophilen können bei erhöhtem Bedarf, beispielsweise im Falle einer Infektion oder akuten Entzündung, im peripheren Blut vermehrt auftreten (van Grinsven et al. 2019). Die konstitutive Expression von Adhäsionsmolekülen wie des P-Selektin Glykoproteinliganden 1 ermöglicht den zirkulierenden neutrophilen Granulozyten eine lose Bindung mit den aktivierten, Selektine-präsentierenden Endothelzellen einzugehen (Ley et al. 2007). Durch diese erste Verlangsamung ihrer Bewegung und bei Vorhandensein weiterer inflammatorischer Chemokine wird im Neutrophilen eine kaskadenartige Reaktion in Gang gesetzt, an deren Ende der nun fest dem Endothel anhaftende Granulozyt über die Gefäßwand in Richtung des Entzündungsherdes migrieren kann (Ley et al. 2007). Dass alle für Adhäsion und Transmigration nötigen Proteine zu diesem Zeitpunkt bereits in der Zelle vorhanden sind, erklärt, wieso neutrophile Granulozyten in der Regel die ersten Immunzellen vor Ort sind (Kubes 2018). Allerdings wird zunehmend klar, dass Neutrophile neben ihrer einfachen Abwehrfunktion auf komplexe Weise in physiologische Prozesse der Immunregulation mit eingebunden sind, unter anderem über eine enge Kommunikation mit den Zellen des adaptiven Immunsystems.

### 2.1.2.1 Lebenszyklus

Vollständig ausgereifte neutrophile Granulozyten verbleiben zunächst als Reservepool am Ort ihrer Entstehung im Knochenmark (Aroca-Crevillen et al. 2020). Sie werden dort zurückgehalten durch den chemotaktischen Reiz, den der von den medullären Stromazellen gebildete CXC-Chemokinligand 12 (CXCL12) auf den CXC-Rezeptor 4 (CXCR4) von murinen und humanen Neutrophilen ausübt (Martin et al. 2003; Pillay et al. 2020). Die sowohl für Mäuse als auch im Menschen belegten tageszyklischen Schwankungen bei der letztlich freigesetzten Menge an Neutrophilen (Ella et al. 2016) scheinen folglich ihren Ursprung in zirkadianen Veränderungen von CXCL12 innerhalb der hämatopoetischen Stammzellniche zu haben (Méndez-Ferrer et al. 2008). Frisch zirkulierende murine und humane Neutrophile exprimieren auf ihrer Oberfläche nur wenige CXCR4-Moleküle, was möglicherweise durch die hohen Mengen des Liganden CXCL12 im Knochenmark und die Internalisierung dieses Liganden-Rezeptorkomplexes bedingt ist (Martin et al. 2003; De Filippo and Rankin 2018). Den Gegenspieler zu CXCR4 stellt CXCR2 dar, der auf reifen neutrophilen Granulozyten bei Mäusen inner- und außerhalb des Knochenmarks nachgewiesen wurde (Eash et al. 2010; Evrard et al. 2018). Über CXCR2 wird auch die stimulierende Wirkung des hämatopoetischen Wachstumsfaktors G-CSF (engl. granulocyte colony-stimulating factor) auf die Neutrophilen-Freisetzung vermittelt, was durch Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie in der Maus *in vivo* bereits gezeigt wurde (Köhler et al. 2011).

Bei den schließlich im Blutgefäßsystem angekommenen Neutrophilen unterscheidet man zwischen dem wesentlich kleineren, frei zirkulierenden Pool und einem marginalen Pool, von dem der größte Anteil sich in Organen mit ausgedehntem Kapillarbett wie Milz, Leber und Lunge aufhält (Christoffersson and Phillipson 2018; Devi et al. 2013). Dass Neutrophile nicht nur dort, sondern auch in weiteren Geweben und unter Steady State Bedingungen eine transendotheliale Migration zeigen, wurde im Mausmodell aufgedeckt (Casanova-Acebes et al. 2018). Dieser als neutrophile Clearance bezeichnete Prozess folgt einer zirkadianen Rhythmik, die mit dem physiologischen Alterungsprozess von zirkulierenden Neutrophilen korreliert (Adrover et al. 2019). Mit diesem einher geht eine vermehrte CXCR4-Präsentation an der Plasmamembran der alternden Neutrophilen (Nagase et al. 2002). Selbst wenn die neutrophilen Granulozyten zuvor aktiv an den Ort eines Inflammationsgeschehen transmigriert sind, ist ihre Rückkehr in das Gefäßsystem und sogar bis ins Knochenmark möglich, wie mittels intravitalem Imaging in einem Mausmodell bewiesen wurde (Wang et al. 2017). Verantwortlich war auch hier eine gesteigerte CXCR4-Expression auf der Zelloberfläche der Neutrophilen (Wang et al. 2017).

Für die Anpassung der neutrophilen Granulopoese an den aktuellen Bedarf scheint die Phagozytose apoptotischer Neutrophiler von entscheidender Bedeutung zu sein (Ley et al.

2018). Experimente mit murinen Knock-out-Modellen, bei denen die Auswanderung der zirkulierenden Granulozyten ins periphere Gewebe gestört war, ergab eine massive Neutrophilie in den betroffenen Tieren (Stark et al. 2005). Die Autoren wiesen nach, dass sich bei Makrophagen und DCs im Gewebe nach der Phagozytose neutrophiler Granulozyten die IL-23-Sekretion verringerte, was in der Folge wiederum die IL-17-Produktion von nicht-konventionellen Lymphozyten senkte (Stark et al. 2005). Da die Ausschüttung von G-CSF durch medullären Stromazellen IL-17-vermittelt abläuft (Fossiez et al. 1996), sorgen die Makrophagen und DCs so auf indirekte Weise für eine Reduktion der Granulopoese (Stark et al. 2005). Nebenbei verhindern sie durch die Phagozytose der apoptotischen Neutrophilen so zusätzlich, dass es zu einer unkontrollierten Freisetzung des zytotoxischen Zellinhalts kommt, weshalb dieser spezielle Fall von Phagozytose auch als Efferozytose bezeichnet wird (Greenlee-Wacker 2016). Auf ähnliche Weise induzieren medulläre Makrophagen zudem durch die Beseitigung gealterter Neutrophiler eine Verringerung der CXCL12-Expression im Knochenmark, was über die CXCL12-CXCR4-Achse die vermehrte Freisetzung neuer Neutrophiler zur Folge hat (Casanova-Acebes et al. 2013; Furze and Rankin 2008).

Wie lange neutrophile Granulozyten unter physiologischen Bedingungen im Gefäßsystem verbleiben, bevor sie ins Gewebe auswandern, ist nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. Für Isotop-gelabelte, humane Neutrophile wies eine niederländische Forschungsgruppe eine durchschnittliche Zeit von knapp vier Tagen nach (Pillay et al. 2010), was in deutlichem Gegensatz zu den bis dahin allgemein akzeptierten 4-18 Stunden stand (Tak et al. 2013). Da diese vorherigen Ergebnisse aber mittels Reinfusion von ex vivo unterschiedlich markierten Zellen gewonnen wurden, erklärt die Aktivierung der Neutrophilen während der Markierung möglicherweise diese zeitliche Diskrepanz (Tak et al. 2013). Mit Verwendung eines schnelleren Labeling-Protokolls in einer späteren Studie wurde die vaskuläre Halbwertszeit der Neutrophilen dann auch wieder mit etwa 19 Stunden angegeben (Lahoz-Beneytez et al. 2016). Im Gegensatz zu ihren Kollegen (Pillay et al. 2010) legten die Autoren ihren Berechnungen allerdings ein Zwei- statt ein Ein-Kompartimentenmodell zugrunde und zeigten, dass unter Berücksichtigung dieser Aufteilung des neutrophilen Zellpools auf die beiden Kompartimente Knochenmark und Gefäßsystem die Auswertung des niederländischen Datensatzes ebenfalls in einer niedrigeren Halbwertszeit als die zuvor veröffentlichten vier Tage resultierte (Lahoz-Beneytez et al. 2016). Bislang fehlen jedoch klare, experimentelle Belege, um zu beurteilen, welches der beiden Modelle die reale Dynamik neutrophiler Granulozyten zwischen den beiden Kompartimenten abbildet und damit die bessere Berechnungsgrundlage darstellt (Hidalgo et al. 2019). Unter pathologischen Umständen scheinen kultivierte Neutrophile auf alle Fälle mehrere Tage vital zu sein, auch wenn Daten beim Menschen *in vivo* dazu noch ausstehen (zusammengefasst in (Hidalgo et al. 2019)). *In vitro* wurde aber beispielsweise bereits gezeigt, dass bei septischen Patienten eine erhöhte

Abundanz des Hitzeschockproteins Hsp90 das Überleben der zirkulierenden polymorpdkernigen Neutrophilen (PMNs) verlängert, indem das Protein den Ubiquitin-vermittelten Abbau von c-Src-Kinase und Caspase-8 hemmt und so die neutrophile Apoptose verhindert (Gupta et al. 2018).

### **2.1.2.2 Phagozytose und oxidativer Burst**

Die Phagozytose ist ein über die Evolution hinweg in allen Tieren konservierter Abwehrmechanismus gegenüber potenziell schädigenden Eindringlingen (Mayadas et al. 2014) und selbst in so nieder entwickelten Tieren wie Schwämmen existieren spezialisierte phagozytotische Zellen (Millar and Ratcliffe 1989). Im angeborenen Immunsystem der Säugetiere bilden Makrophagen, Monozyten, DCs und neutrophile Granulozyten zusammen die Gruppe der Phagozyten, obwohl auch Eosinophile in geringem Maße phagozytotisch aktiv sein können (Murphy et al. 2018). Die Erkennung der Pathogene erfolgt bei Neutrophilen mittels spezieller Oberflächenrezeptoren, die entweder direkt an konservierte, Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) oder bei bereits opsonierten Mikroorganismen die Komplementfaktoren oder Antikörper binden (Rosales 2020). Kürzlich wurde durch Versuche *in vitro* mit frisch isolierten murinen Neutrophilen und einer humanen neutrophilen-ähnlichen Zelllinie auch für die bislang bei Neutrophilen nur im Rahmen der Chemotaxis untersuchten Formylpeptidrezeptoren eine mutmaßliche Beteiligung an der Phagozytose beschrieben (Wen et al. 2019). Möglicherweise können neutrophile Granulozyten darüber hinaus wie Makrophagen eine Rezeptor-unabhängige, dem Vorgang der Mikropinozytose ähnelnde Form der Phagozytose ausüben (Allen and Criss 2019). Nach erfolgreichem Einschluss des Pathogens im Phagosom entwickelt sich dieses im Laufe eines Reifungsprozesses durch die Fusion mit Vesikeln von Golgi-Apparat, endoplasmatischem Retikulum und schließlich lysosomalen Granula zum Phagolysosom (Fingerhut et al. 2020). Darin wirken nun neben den zytotoxischen Verbindungen der neutrophilen Granula auch reaktive Sauerstoffverbindungen an der Zerstörung des pathogenen Inhalts mit (Rosales 2020). Letztere werden in einem als oxidativer Burst bezeichnetem Vorgang von dem Membran-gebundenen Enzymkomplex der NADPH-Oxidase gebildet, deren einzelne Bestandteile über die Integration der Granula- in die Phagosomenmembran fusioniert wurden (Yin and Heit 2018).

### **2.1.2.3 Degranulation**

Für eine schnelle Verteidigung sind neutrophile Granulozyten mit einem breiten Spektrum präformierter Granula ausgestattet, die zahlreiche mikrobiotische Proteine und aktive Proteasen enthalten (Cassatella et al. 2019). Bereits während der Entwicklung eines Neutrophilen im

Knochenmark bilden sich diese charakteristischen Granula, die entsprechend ihres erstmaligen Auftretens während der Granulopoese als primäre, sekundäre und tertiäre Granula bezeichnet werden (Borregaard and Cowland 1997). Hierbei scheint der Zeitpunkt der Bildung zugleich die Protein Zusammensetzung im Inneren des Granulums zu bestimmen (Mora-Jensen et al. 2011; Rørvig et al. 2013). Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  induziert dabei die Proteinexpression der primären und C/EBP $\epsilon$  zusammen mit C/EBP $\delta$  die der sekundären und tertiären Granula (Evrard et al. 2018). Bedingt durch die kontinuierliche Granulabildung während der neutrophilen Reifung (Borregaard 2010), finden sich allerdings Überschneidungen im Proteom der einzelnen Untergruppen (Masgrau-Alsina et al. 2020; Rørvig et al. 2013). Die aktuelle Klassifikation der Granula baut daher auf bestimmte Markerproteine auf, die die Zuordnung zu einer Untergruppe auch noch im reifen Neutrophilen erlauben (Rørvig et al. 2013). Primäre Granula, auch als azurophile Granula bezeichnet, enthalten beim Menschen neben der Myeloperoxidase (MPO) und dem CD63-Antigen eine Vielzahl antimikrobieller Proteine (Cassatella et al. 2019). Darunter befinden sich aktive Serinproteasen wie die neutrophile Elastase (NE),  $\alpha$ -Defensine und das bakterizide permeabilitätssteigernde Protein (Kettritz 2016). Die spezifischen (sekundären) Granula werden durch das Vorhandensein von Lactoferrin und neutrophilem Gelatinase-assoziierten Lipocalin sowie das Fehlen von Gelatinasen und der MPO definiert (Kjeldsen et al. 1993). Erstmals in stabkernigen Neutrophilen erscheinen die tertiären Granula, die vor allem die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) enthalten und daher auch als Gelatinase-Granula bezeichnet werden (Rørvig et al. 2013). Die sogenannten Ficolin-1-reichen Granula sind nur schwach MMP-9-positiv, enthalten aber große Mengen des Lektins Ficolin-1 und stellen vermutlich einen eigenen Gruppe innerhalb der neutrophilen Granula dar (Rørvig et al. 2009). Neben diesen Granulatypen, deren Aufbau bei Verlassen des Knochenmarks abgeschlossen ist, existieren sekretorische Vesikel als weitere durch eine Doppelmembran abgegrenzte Kompartimente im Zytoplasma segmentkerniger Neutrophiler. Ihre Bildung findet auch noch in bereits in den Blutkreislauf entlassenen Granulozyten statt und scheint, anders als die drei zuvor genannten Gruppen, nicht über Abschnürungen des Golgi-Apparates sondern Endozytose-vermittelt abzulaufen (Cassatella et al. 2019). Diese Theorie stützt sich auf die Beobachtung, dass die Zusammensetzung der Vesikelmembran große Ähnlichkeit mit der der neutrophilen Plasmamembran aufweist und als Marker für diesen Granulatyp unter anderem das Plasmaprotein Albumin identifiziert wurde (Borregaard et al. 1992; Rørvig et al. 2013). Nachdem die granulären Inhaltsstoffe der Haussäugetiere (zusammengefasst in (Fingerhut et al. 2020) weitestgehend denen des Menschen entsprechen, wird das humane Klassifikationsschema der Granula im Tier analog verwendet. Bei der Beurteilung der tatsächlichen Wirkung einzelner Inhaltsstoffe, muss aber berücksichtigt werden, dass sich die quantitative Zusammensetzung der Granula bei den Tierarten durchaus unterscheiden kann.

Zwar mangelt es im Veterinärbereich bislang noch an derart detaillierte Studien wie der von Rørvig et al. durchgeführten Massenspektrometer-gestützten Proteomanalyse der humanen Granulatypen (Rørvig et al. 2013), dennoch kann aus älteren Experimenten zur Aktivität einzelner granulärer Enzyme geschlossen werden, dass beispielsweise Pferde im Gegensatz zu Carnivoren eine vergleichsweise große Menge alkalischer Phosphatase in ihren Neutrophilen lagern (Rausch and Moore 1975).

Die Degranulation wird in Neutrophilen durch die Bindung einer Vielzahl unterschiedlicher Liganden an ihre Oberflächenrezeptoren ausgelöst, darunter sind neben dem bakteriellen LPS auch körpereigene Moleküle wie IL-8 oder der Komplementfaktor 5a (Minns et al. 2019). Um Kollateralschäden durch die zytotoxischen Komponenten auf ein Minimum zu begrenzen (Rosales 2020), läuft die Exozytose der Granula kontrolliert ab und es bedarf einer ersten, „vorbereitenden“ Stimulation, dem Priming, bevor schließlich ein zweites Signal die eigentliche Degranulation auslösen kann (Catz and McLeish 2020). Die Exozytose der neutrophile Granula erfolgt als abgestufter Prozess und zwar in der umgekehrten Reihenfolge ihrer Synthese (Sengeløv et al. 1995). Zuerst verschmelzen die sekretorischen Vesikel mit der neutrophilen Plasmamembran und erhöhen so die Zahl der für Adhäsion und Transmigration benötigten Rezeptoren (Uriarte et al. 2008). Anschließend sorgt die Freisetzung der Enzyme aus den spezifischen und Gelatinase-haltigen Granula dafür, dass der neutrophile Granulozyt leichter durch die Extrazellulärmatrix in Richtung des chemotaktischen Reizes migrieren kann (Delclaux et al. 1996; Caster et al. 2018). Erst am Ort der Entzündung kommt es zur Exozytose der primären MPO-haltigen Granula (Schürmann et al. 2017).

Eine Familie kleiner GTPasen, die Rab-Proteine, spielen zusammen mit ihren Effektoren eine Schlüsselrolle bei der Regulation und Ausrichtung des intrazellulären Vesikel-Transportsystems (Masgrau-Alsina et al. 2020). Beispielsweise besitzt nur ein Teil der azuropheilen Granula das für die Fusion mit der Plasmamembran nötige Rab27a, weshalb auch bei maximale Stimulation nicht alle Granula dieser Untergruppe exozytiert werden (Lodge et al. 2020). Neben diesen Proteinen sorgen zusätzlich verschiedene SNARE-Komplexe (engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) in der Membran der Granula für eine Spezifität des Vesikeltransports (Ramadass and Catz 2016). Darüber hinaus ist der rasche Umbau des kortikalen Aktinskeletts über Rho-GTPasen für eine effiziente neutrophile Degranulation essentiell (Mitchell et al. 2008). Dass eine Reduktion der Granulamenge in den im Blutkreislauf zirkulierenden Neutrophilen nicht nur als Folge einer stimulierten Degranulation auftritt, sondern auch unter homöostatischen Bedingungen beobachtet werden kann, ist eine erst kürzlich publizierte neue Entdeckung (Adrover et al. 2020). Die Autoren der Studie konnten mittels Transmissionselektronenmikroskopie und proteomischer Analysen zeigen, dass der Gehalt an intrazellulären Granula von murinen und humanen Neutrophilen im Laufe des Tages kontinuierlich abnimmt (Adrover et al. 2020).

### 2.1.2.4 Bildung von NETs

Kurz nach der erstmaligen Beschreibung der NETs und ihrer antimikrobieller Wirkung durch Brinkmann et al. (2004) wurde die Freisetzung dieser langen, mit granulären und zytosolischen Proteinen besetzten Chromatin-Fäden als eine spezielle, ROS-, MPO- und NE-abhängige, aktive Form des Zelltods neutrophiler Granulozyten, die NETose, identifiziert (Fuchs et al. 2007). Die Immunzelle leistet so noch über ihren Tod hinaus einen Beitrag zur effektiven Bekämpfung der eingedrungenen Mikroorganismen.

Da die mit der DNA in den Extrazellulärraum entlassenen Substanzen aber auch schädigend auf umliegendes Gewebe wirken (Narasaraju et al. 2011; Kolaczkowska et al. 2015; Castanheira and Kubes 2019), kommt es idealerweise nur dann zur Freisetzung von NETs, wenn das Pathogen tatsächlich nicht mittels Phagozytose eliminiert werden kann. Dies wird über folgenden Kontrollmechanismus gewährleistet: Durch die Fusion von Phagosom und Primärgranulum wird die nukleäre Translokation der darin enthaltenen neutrophilen Elastase verhindert und die für die DNA-Dekondensation und NET-Bildung nötige Proteolyse der Histonen durch das Enzym unterbleibt (Branzk et al. 2014). Kann das Pathogen also phagozytiert werden, fehlt einer der ersten Schritte der NETose. Andererseits kann eine Effizienzsteigerung dieser neutrophilen Abwehrstrategie gegenüber großen Pathogenen durch die synchrone NET-Freisetzung von mehreren, Schwarmbildenden Neutrophilen erreicht werden, wie erst kürzlich in einem neu entwickelten *in vitro* Assay für humane Granulozyten gezeigt wurde (Hopke et al. 2020). Dass eine gesteigerte NET-Bildung aber auch negative Folgen für den Organismus haben kann, bewiesen Kang et al. (2020) unlängst in einem murinen Schlaganfallmodell, wo NETs die erfolgreiche Revaskularisierung behinderten. Darüber hinaus scheinen NETs im Rahmen einer Krebserkrankung die primären Tumorzenellen bei einer Metastasierung in die Leber zu unterstützen, wie sowohl im Mausmodell als auch an humanen Patienten gezeigt wurde (Tohme et al. 2016; Hsu et al. 2019; Yang et al. 2020).

Ob Neutrophile neben der „suizidalen“ Form der NET-Freisetzung über weitere Mechanismen zur Ausbildung derartiger DNA-Strukturen verfügen, ist Gegenstand aktueller Forschung und wird kontrovers diskutiert (Yousefi and Simon 2016; Yousefi et al. 2020). So wurde 2009 erstmals eine ROS-abhängige Form beschrieben, bei der mitochondriale DNA den Ursprung der extrazellulären Chromatinfäden bildet und die NET-Freisetzung daher unabhängig vom Zelltod des Neutrophilen möglich ist (Yousefi et al. 2009). Eine nicht-lytische Form der NET-Bildung, die innerhalb weniger Minuten auftrat und bei der die Zellen während der DNA-Freisetzung zeitgleich Gram-positive Bakterien phagozytierten, wurde via Live-Imaging in einem Mausmodell nach intradermaler Verabreichung von humanen neutrophilen Granulozyten nachgewiesen (Yipp et al. 2012). Da hier nukleäres Chromatin als Grundgerüst für die NETs fungierte, blieben Neutrophile mit diffus im Zytoplasma verteilten Kernresten oder

teils völlig kernlos zurück (Yipp et al. 2012). Beide Varianten können innerhalb weniger Minuten nach Stimulation beobachtet werden und passen daher wesentlich besser in das Konzept einer ersten schnellen, Neutrophilen-vermittelten Immunantwort als die mehrere Stunden in Anspruch nehmende NETose (Kubes 2018).

Obwohl eine Vielzahl von NETs-induzierenden Stimulanzien bekannt ist, werden in einem Großteil der Studien zu dieser Thematik Substanzen verwendet, mit denen neutrophile Granulozyten physiologischerweise nicht in Kontakt kommen (z. B. Phorbol-12-myristat-13-acetat, PMA) (Hoppenbrouwers et al. 2017). Da man aber mittlerweile weiß, dass sich das NETom, also die Zusammensetzung der mit der DNA ausgestoßenen Proteine, je nach Umgebung und Auslöser unterscheiden kann (Lim et al. 2018; Petretto et al. 2019), gilt es, beim Design zukünftiger Experimente hierauf ein besonderes Augenmerk zu legen, um so die Vorgänge im Körper *in vitro* möglichst exakt nachzubilden.

### 2.1.2.5 Subpopulationen

Die vormals als homogene Population erachteten neutrophilen Granulozyten, stellen tatsächlich vielmehr eine Gruppe mehrerer Subpopulationen mit verschiedenen Funktionen und einer unterschiedlichen Beteiligung an pathologischen Vorgängen dar (Ng et al. 2019). Schon eine Studie mit 125 gesunden Blutspendern fand beim Vergleich der Genexpressions- und Methylierungsmuster heraus, dass die interindividuellen Unterschiede bei neutrophilen Granulozyten deutlich größer sind als bei Monozyten oder naiven T-Zellen (Chen et al. 2016; Ecker et al. 2017).

Bereits lange bekannt sind die sogenannten „low-density neutrophils“ (LDNs), die bei der Dichtegradientenzentrifugation von Vollblut in der Fraktion der peripheren mononukleären Blutzellen (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) auftauchen (Ley et al. 2018). Sie werden von den Granulozyten höherer Dichte (engl. high-density neutrophils, HDNs) – auch „normal-density neutrophils“ (NDNs) genannt – unterschieden, die zusammen mit den Erythrozyten die untere Zellfraktion bilden (Hassani et al. 2020). Das Auftreten der LDN darf nicht per se als pathologisch angesehen werden, weil die Dichteverteilung über die Gesamtheit der Neutrophilen hinweg auch im Gesunden eine Gauß-Kurve folgt (Pember et al. 1983; Hassani et al. 2020). Ein vermehrtes Vorkommen von LDNs wurde beim Menschen jedoch schon in den 90er Jahren mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht (Hacbarth and Kajdacsy-Balla 1986). Von Maus und Ratte als Versuchstier einmal abgesehen, finden sich im Bereich der Tiermedizin nur vereinzelt Beschreibungen zu dieser neutrophilen Subpopulation: Die aktuellste Studie zu diesem Thema kommt aus der Pfermedizin, wo LDNs in Tieren mit Asthma und gesunden Kontrolltieren vergleichend analysiert wurden (Herteman et al. 2017). Aber auch zuvor wurden Granulozyten schon in der

equinen PBMC-Fraktion nachgewiesen (Degroote et al. 2012). Bei Schweinen fanden sich vermehrt Granulozyten mit einer den PBMCs ähnlichen Dichte, nachdem die Tiere experimentell mit der klassischen Schweinepest infiziert wurden (Summerfield et al. 1998). Zwar wurden auch bei Hunden schon Neutrophile als Kontamination in der PBMC-Fraktion beschrieben, allerdings scheinen die Granulozyten bei dieser Tierart generell eine geringere Dichte aufzuweisen (Buurman et al. 1982). Da in der Regel Trennmedien mit einer Dichte von 1,077 mg/dl für die Blutzellpräparation verwendet werden, erfolgt die Unterscheidung der beiden Subpopulationen LDN und NDN voneinander üblicherweise anhand dieses Grenzwertes.

Abgesehen von der Dichte scheinen sich LDNs aber auch in funktioneller Hinsicht von HDNs zu unterscheiden: So wurde in einer aktuellen Studie beim Menschen gezeigt, dass die LDNs von gesunden Probanden die Proliferation von zuvor stimulierten Lymphozyten in Kultur stärker zu supprimieren vermochten als eine gemischte Neutrophilenpopulation oder reine HDNs (Hassani et al. 2020). Mit einem Granulozyten-Multifunktionstest wiesen die Autoren der Studie *in vitro* außerdem bei den LDNs eine höhere antibakterielle Kapazität gegenüber Fluoreszenz-markierten *Staphylococcus aureus* nach, verglichen mit den autologen HDNs (Hassani et al. 2020). Ähnliches beobachtete eine kanadische Forschungsgruppe bei equinen LDNs, die ebenfalls unabhängig vom Gesundheitszustand der Tiere ganz allgemein zu einer stärkeren NET-Bildung neigten (Herteman et al. 2017). Anders scheint es sich hingegen mit den Neutrophilen zu verhalten, die im Rahmen eines aktiven Infektionsgeschehens vermehrt in der PBMC-Fraktion nachgewiesen werden. Denn die LDNs von Tuberkulose-Patienten waren weder in der Lage lebende Mykobakterien zu phagozytieren, noch NETs oder ROS zu bilden (La Manna et al. 2019). Um diesen teils widersprüchlichen Ergebnisse zu begegnen, definieren einzelne Autoren weitere Subtypen innerhalb der LDNs, wie beispielsweise proinflammatorische LDNs – manchmal missverständlich „low-density granulocytes“ (LDGs) genannt – oder immunsuppressive LDNs – häufiger als granulozytäre myeloide Suppressorzellen (G-MDSCs) bezeichnet (Scapini et al. 2016). LDGs wurden vorwiegend in vergleichenden Studien im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen analysiert (Scapini et al. 2016). So scheinen LDGs beispielsweise über die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interferon (IFN)- $\gamma$  und eine verstärkte NETose an der Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses beteiligt zu sein (Denny et al. 2010; Carmona-Rivera et al. 2015). Ein großer Teil der Veröffentlichungen zu G-MDSCs kommt hingegen aus dem onkologischen Bereich und diese Zellen scheinen besonders bei der Metastasierung von Primärtumoren in Leber und Lunge proaktiv mitzuwirken, wie von mehreren Autoren in Mausmodellen nachgewiesen wurde (Hsu et al. 2019; Long et al. 2020). Zwar wurden für murine G-MDSCs vereinzelt spezifische Kombinationen von Oberflächenrezeptoren beschrieben (Perez et al. 2020), zuverlässig identifizieren lässt sich diese neutrophile

Subpopulation damit beim Menschen allerdings nicht (Mandruzzato et al. 2016), weshalb für eine eindeutige Charakterisierung die Verknüpfung phänotypischer und funktioneller Merkmale vorgeschlagen wurde (Bronte et al. 2016).

In der Krebsforschung werden außerdem bei der Population der Tumor-assoziierten Neutrophilen zwei Fraktionen unterschieden, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Beteiligung am Krankheitsgeschehen analog zu Makrophagen im gleichen Kontext (Biswas and Mantovani 2010) als Tumor-unterdrückende N1 oder Tumor-fördernde N2 benannt werden (Fridlender et al. 2009). Letztere unterstützen über Umbaprozesse in der Extrazellulärmatrrix und entsprechende Wachstumsfaktoren die Vaskularisierung, weshalb sie mitunter auch als proangiogenetische Neutrophile bezeichnet werden (Nozawa et al. 2006). Dieser proangiogenetische Subtyp kann sowohl in der Maus als auch im Menschen anhand seiner hohen Rezeptorexpression für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (*engl. vascular endothelial growth factor, VEGF*) identifiziert werden und schüttet diesen außerdem, ebenso wie auch MMP-9, vermehrt aus (Christoffersson et al. 2012; Massena et al. 2015). Welche Verbindung zwischen der N2-Population und G-MDSCs besteht, deren stimulierende Wirkung auf die Metastasierung ebenfalls mit einer Sekretion von VEGF und MMP-9 in Zusammenhang gebracht wird, ist unklar und nur ein Beispiel für die Schwierigkeiten, die es bezüglich Charakterisierung und Nomenklatur der neutrophilen Subpopulationen noch zu überwinden gilt (Long et al. 2020; Bronte et al. 2016).

Ungeklärt ist außerdem, ob sich all diese Subpopulationen schon im Knochenmark bei der Granulopoiese bilden oder erst später über unterschiedliche Aktivierungsprozesse oder das Mikromilieu in den verschiedenen Zielgeweben (Hidalgo et al. 2019). Die Entdeckung der reversen transendothelialen Migration von Neutrophilen (Woodfin et al. 2011) in Kombination mit den Veränderungen, welche die einmal ins Gewebe ausgewanderten Granulozyten entwickeln (Injarabian et al. 2019), weist möglichweise darauf hin, dass die Heterogenität innerhalb der zirkulierenden Neutrophilen erst außerhalb des Knochenmarks entsteht (Silvestre-Roig et al. 2016). Dies könnte ferner eine Antwort auf die Frage liefern, was neutrophile Granulozyten dazu befähigt, auf infektiöse und sterile Entzündungsherde unterschiedlich zu reagieren (Kubes 2018).

### 2.1.2.6 Immunregulation

Neben ihrer essentiellen Funktion im Rahmen der direkten Erregerabwehr spielen neutrophile Granulozyten außerdem eine wichtige Rolle bei der Immunregulation, sowohl im gesunden Organismus als auch bei pathologischen Zuständen. Schon lange ist bekannt, dass aktivierte Neutrophile ein großes Spektrum an Zytokinen und Chemokinen sekretieren und so inflammatorischer Prozesse regulatorisch beeinflussen können (Altstaedt et al. 1996;

Tamassia et al. 2018). Bei der Interaktion mit Lymphozyten können Neutrophile je nach Umgebung oder ursächlichem Reiz eine inhibierende oder aktivierende Rolle einnehmen. Dafür scheint die Fähigkeit der Neutrophilen, ihr Proteom und die Expression ihrer Oberflächenmoleküle entsprechend anzupassen, entscheidend zu sein (Silvestre-Roig et al. 2019). In der Milz von Maus und Mensch wurde beispielsweise im dortigen marginalen Neutrophilen-Pool eine Subpopulation gefunden, die vorhandene B-Zellen über Zytokine zur Proliferation und Antikörper-Produktion anregt und deren Zellen daher auch als B-Zell-Helfer Neutrophile bezeichnet werden (Puga et al. 2011). Dagegen führt *in vitro* die Stimulation humaner Neutrophile mit Toll-like-Rezeptor (TLR) 8-Agonisten zur Sekretion von IL-23, was die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th17-Zellen bewirkt (Tamassia et al. 2019). Aber Neutrophile beeinflussen Lymphozyten nicht nur über diesen direkten Weg bei deren Entwicklung. Die alleinige Co-Kultivierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit aktivierten DCs (ein Modell, das die Verhältnisse, wie sie *in vivo* beispielsweise in Lymphknoten vorliegen, widerspiegeln soll) löst keine Induktion einer IL-17 produzierenden Th17-Zelle (Souwer et al. 2018). Erst die Zugabe eines Überstandes von degranulierten Neutrophilen, genauer gesagt der aktiven neutrophilen Elastase, führte über die Prozessierung des von den aktivierten DCs freigesetzten CXCL8 zur Entwicklung der Th17-Zellen (Souwer et al. 2018). In einem murinen Hautsensibilisierungsmodell wiederum verhinderten neutrophile Granulozyten über das von ihnen sezernierte Cathepsin G die IL-12-Produktion der Hapten-präsentierenden DCs und damit die Entwicklung von Hapten-reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Kish et al. 2019). Neutrophile Granulozyten können also zusätzlich zur eigenen Zytokin-Sekretion über die Freisetzung von Proteasen via Degranulation oder NETs die bereits in ihrer Umgebung vorhandenen Signalmoleküle modifizieren (Clancy et al. 2018). Dass die unterschiedlichen aus humanen Neutrophilen aufgereinigten Proteasen dabei äußerst effektiv zusammenarbeiten, zeigten erst kürzlich Versuche mit insgesamt 69 rekombinanten Zyro- und Chemokinen *in vitro* (Fu et al. 2020). Dabei identifizierten die Autoren der Studie einige Zytokine (TNF-α, IL-5, CCL5, CCL2, IL-8, M-CSF), die sich gegenüber dem enzymatischen Abbau durch die granulozytären Proteasen als generell weniger anfällig erwiesen, möglicherweise um nach dem Eintreffen der neutrophilen Granulozyten am Entzündungsherd die effektive Rekrutierung weiterer Immunzellen zu ermöglichen (Fu et al. 2020). Ein von Neutrophilen aus ihren Sekundärgranula selbst freigesetztes Chemokin, das Cathelicidin LL-37, bewirkt einerseits die positive Migration von CD4<sup>+</sup> Zellen und fungiert als T-Zell-Antigen (Lande et al. 2014; Agerberth et al. 2000; De et al. 2000). Andererseits supprimiert es die Aktivierung von DCs und die T-Zell-Proliferation (Di Nardo et al. 2007; Kandler et al. 2006; Nijnik et al. 2009). Damit ist LL-37 nur eines der vielen Beispiele, für die gegensätzlichen Einflüsse auf das adaptiven Immunsystem, die über die Inhalte neutrophiler Granula vermittelt werden (zusammengefasst in (Minns et al. 2019)). Daneben scheinen Neutrophile auch über die Freisetzung von ROS regulatorisch auf andere

Immunzellen einwirken zu können. So wurde in einem Mausmodell mit Paracetamol-induzierter Leberschädigung gezeigt, dass die Umwandlung der proinflammatorischen Makrophagen in einen regenerativen Typ und damit die Ausheilung des Leberschadens von der neutrophilen ROS-Produktion abhängig war (Yang et al. 2019).

Ein Meilenstein bei der Beschreibung der immunregulatorischen Funktion von neutrophilen Granulozyten war schließlich der Nachweis, dass diese Zellen in Lymphknoten als atypische antigenpräsentierende Zellen die Proliferation von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen stimulieren können (Vono et al. 2017; Cassatella 2017; Lok et al. 2019). Zusammen mit den immer wieder neuen Beschreibungen neutrophiler Subpopulationen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen macht gerade diese letzte Beobachtung deutlich, dass auf dem Forschungsfeld der neutrophilen Granulozyten vermutlich noch mit weiteren bedeutenden Entdeckungen zu rechnen ist.

## 2.2 Diabetes mellitus

### 2.2.1 Definition

Die allgemein verwendete Bezeichnung „Diabetes mellitus“ (DM) bildet eigentlich den Übergriff für eine Reihe unterschiedlicher Stoffwechselerkrankungen, deren Leitbefund eine chronische Hyperglykämie infolge einer gestörten Insulinwirkung/-produktion darstellt (Petersmann et al. 2019). Die American Diabetes Association fasst in ihren aktuellen Richtlinie die Diagnosekriterien für einen DM wie folgt zusammen: eine Nüchtern-Plasmaglukose von  $\geq 126$  mg/dl ( $\geq 7,0$  mmol/l) oder ein HbA<sub>1c</sub>-Wert (glykiertes Hämoglobin) von  $\geq 6,5\%$  (48 mmol/mol Hb) oder venöse Plasmaglukosewerte von  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11,1$  mmol/l) nach einem zweistündigen oralen Glukosetoleranztest oder eine Kombination aus Gelegenheits-Plasmaglukosewerte von  $\geq 200$  mg/dl ( $\geq 11,1$  mmol/l) und den klinischen Symptomen einer Hyperglykämie (Association 2020).

Die aktuelle Klassifikation sieht für Diabetes mellitus die Einteilung in vier Kategorien vor (Association 2020): Neben dem immunmedierten Typ 1 (T1DM), bei dem es infolge einer Autoimmunreaktion zur Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen im Pankreas kommt (DiMeglio et al. 2018), sind die meisten Patienten vom Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) betroffen, der durch eine Insulinresistenz und zahlreiche Komorbiditäten gekennzeichnet ist (Viigimaa et al. 2020). Bei einer diabetogenen Stoffwechselleid, die während Schwangerschaft erstmals diagnostiziert wird, muss unterschieden werden zwischen einem zum Zeitpunkt der Konzeption bereits bestehenden, aber unentdeckten DM und dem Gestationsdiabetes, für dessen Diagnose niedrigere Werte beim oralen Glukosetoleranztest gelten (Rosik et al. 2020). Die vierte Kategorie umfasst all diejenigen Erscheinungsformen

eines Diabetes, die nicht aufgrund ihrer Ätiologie einer der anderen Gruppen zugeordnet werden können, und beinhaltet neben monogenen diabetischen Syndromen, Erkrankungen des exokrinen Pankreas und Medikamenten-induzierte Diabetesformen (Association 2020).

## 2.2.2 Ätiologie

Das von den  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas produzierte Peptidhormon Insulin spielt die zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase (Czech 2017). Über den ubiquitär exprimierten Insulinrezeptor, der nach Aktivierung und erfolgter Signalübermittlung eine Clathrin-vermittelten Endozytose unterläuft (Hall et al. 2020), wird u.a. die Glukoseaufnahme in Leber, Muskulatur und Fettgewebe stimuliert und so der Blutglukosespiegel gesenkt. Daher führt eine gestörte Insulinwirkung unmittelbar zu einer Hyperglykämie und ein Anhalten dieser Störung zu schwerwiegenden Spätfolgen (Toniolo et al. 2019; Viigimaa et al. 2020; Hughes et al. 2020).

Der als chronische Autoimmunerkrankung klassifizierte T1DM ist die häufigste Stoffwechselerkrankung im Kindesalter mit kontinuierlich steigender Inzidenzrate (Xia et al. 2019) und gekennzeichnet durch einen absoluten Insulinmangel, da es zu einer immunmedierten Zerstörung der Langerhans'schen Inselzellen kommt (Ilonen et al. 2019). Trotz intensiver Forschung in diesem Bereich ist die genaue Ätiologie nach wie vor ungeklärt (Norris et al. 2020), vermutet wird allerdings eine Kombination aus Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition (Robertson and Rich 2018). An der Zerstörung der  $\beta$ -Zellen sind autoreaktive CD4 $^{+}$  und CD8 $^{+}$  T-Zellen maßgeblich beteiligt (Di Dedda et al. 2019). Während letztere durch die direkte Wirkung ihrer zytolytischen Proteine die Insulitis dominieren (Trivedi et al. 2016), induzieren CD4 $^{+}$  T-Zellen über die Interaktion mit B-Zellen die Produktion von Autoantikörpern, die zum Zeitpunkt der Manifestation des DM nachweisbar und am häufigsten gegen die körpereigenen pankreatischen Inselzellen, Insulin, die Tyrosinphosphatasen IA-2 oder IA-2 $\beta$ , die Glutamatdecarboxylase (insbesondere Isoform GAD65) oder den Zinktransporter 8 gerichtet sind (Lund-Blix et al. 2019).

Hingegen wird das Erkrankungsbild des progredient verlaufende T2DM durch die Kombination aus einer peripheren Insulinresistenz und der nachfolgend inadäquaten Insulinsekretion charakterisiert (Chow and Chan 2020). Laut der International Diabetes Federation repräsentiert dieser Typ 90% der weltweiten Diabetesfälle (Federation 2019) und neben Risikofaktoren wie Adipositas und Bewegungsmangel wurde auch eine genetische Prädisposition mit der multifaktoriellen Ätiologie des T2DM in Verbindung gebracht (Zhang et al. 2020). So haben genomweite Assoziationsstudien bereits über 400 Allele identifiziert, die das Risiko für eine Erkrankung beeinflussen (Krentz and Gloyn 2020). Die Wahrscheinlichkeit einer T2DM-Manifestation ist zudem bei Patienten mit Metabolischem Syndrom oder bereits

gestörter Glukosetoleranz, dem sogenannten Prädiabetes, erhöht (Avolio et al. 2020; Punthakee et al. 2018).

Etwa 1-4% der humanen Diabetes mellitus-Erkrankungen sind auf monogenetische Defekte zurückzuführen, wobei die meisten Fälle entweder dem neonatalen Diabetes mellitus (NDM) oder einer heterogenen Gruppe diabetischer Erscheinungsformen, die unter dem Begriff „Maturity-Onset Diabetes of the Young“ (MODY) zusammengefasst sind, zugeordnet werden (Shields and Colclough 2017). Bei letzteren beschreibt bereits der Name eines der phänotypischen Charakteristika, die innerhalb dieser Gruppe beobachtet werden: die Manifestation des Diabetes vor dem 25. Lebensjahr (Bishay and Greenfield 2016). Daneben zeigen die in der Regel nicht adipösen Betroffenen nur eine moderate Hyperglykämie und weisen weder Autoantikörper gegen Inselzellen noch eine Insulinresistenz auf (Carlsson et al. 2020). Allerdings schätzt man, dass möglicherweise bis zu 80% der MODY-Patienten nicht korrekt diagnostiziert und in der Folge mit Insulin therapiert werden, weil fälschlicherweise von der bei Kindern und jungen Erwachsenen am häufigsten vorkommenden Form des T1DM ausgegangen wird (Peixoto-Barbosa et al. 2020). Daher wird bei der Diagnosestellung zunehmend auch auf das Screening von Autoantikörpern gesetzt, die beim T1DM in etwa 90% der Fälle nachweisbar sind und dort einen sehr hohen prädiktiven Wert besitzen (Bonifacio et al. 2018; Shields and Colclough 2017; Carlsson et al. 2020). Die häufigsten Lokalisationen der für MODY verantwortlichen Genmutationen finden sich in den DNA-Abschnitten, die für den Hepatozyten-Nuklearfaktor-1 $\alpha$ , -4 $\alpha$  oder die Glukokinase kodieren (Peixoto-Barbosa et al. 2020). Da alle drei Proteine an der Regulation der Insulinausschüttung aus den pankreatischen  $\beta$ -Zellen beteiligt sind, wird als Resultat der Mutation eine unzureichende Insulinsekretion auf einen Glukosereiz beobachtet (Shields et al. 2010; Osbak et al. 2009). Tritt die diabetogene Stoffwechsellage hingegen innerhalb der ersten sechs Lebensmonate auf, spricht man von einem NDM (Sousa and Bruges-Armas 2019). Abhängig von der Dauer, in der der Patient therapiebedürftig ist, wird zwischen einer transienten und einer permanenten, über den 18. Lebensmonat hinaus bestehenden Form unterschieden (Gaal and Balogh 2019), wobei nicht zwangsläufig ein Zusammenhang zwischen dem betroffenen Genlocus und der Verlaufsform besteht (Gole et al. 2018). Beispielsweise wurden Mutationen im KCNJ11-Gen sowohl bei Kindern mit transientem, als auch mit permanentem NDM identifiziert (Gole et al. 2018; Greeley et al. 2018). Insgesamt sind Veränderungen in einer der Untereinheiten des ATP-abhängigen Kaliumkanals, der als Glukosesensor in den  $\beta$ -Zellen fungiert (Pipatpolkai et al. 2020), der häufigste Auslöser eines NDM und mehrere hundert verschiedene Genmutationen wurden diesbezüglich bereits beschrieben (De Franco et al. 2015; De Franco et al. 2020).

Die zweithäufigste Ursache für einen permanenten NDM stellen die meist autosomal dominant vererbten Mutationen im Insulin-Gen (*IINS*) selbst dar, das daraus resultierende Krankheitsbild

wird auch als „Mutant INS-gene-induced Diabetes of Youth“ (MIDY) bezeichnet (Liu et al. 2010). Meist verursacht eine Akkumulation des veränderten, fehlgefalteten Insulinproteins über eine Stressreaktion im endoplasmatischen Retikulum die progrediente  $\beta$ -Zell-Apoptose (Liu et al. 2018).

### 2.2.3 Immunsystemveränderungen bei Diabetes mellitus

Die Assoziation zwischen DM und einem systemisch-inflammatorischen Zustand wurde zwar vielfach hergestellt, der zugrundeliegende Mechanismus aber bislang nicht vollständig aufgeklärt (Keane et al. 2017; Praticchizzo et al. 2018; Lu et al. 2020; Kuo et al. 2020). Detaillierte Studien zu diesem Thema existieren vor allem für den T2DM. Beispielsweise wird eine Neutrophilen-vermittelte systemische Inflammation als ätiologische Erklärung für die beschriebene Multimorbidität von chronisch obstruktiver Lungenerkrankung, Atherosklerose und diesem Diabetes-Typ herangezogen (Hughes et al. 2020). Man geht davon aus, dass die für T2DM pathognomonische periphere Insulinresistenz überwiegend durch die erhöhte Körperfettmasse der Betroffenen ausgelöst wird (Boles et al. 2017). Da Fettgewebe neben seiner Speicherfunktion als endokrinologisch aktives Organ fungiert, folgt auf eine Zunahme seiner Masse schließlich ein Anstieg der von Adipozyten sezernierten Zytokine, wie z. B. des proinflammatorischen TNF- $\alpha$  und IL-6 (Jaganathan et al. 2018). Diese Zytokine werden darüber hinaus auch noch von sogenannten proinflammatorischen M1-Makrophagen freigesetzt, deren Polarisierung im Fettgewebe adipöser Patienten verstärkt beobachtet wurde (Zatterale et al. 2020). Da TNF- $\alpha$  die Signalwirkung des Insulins hemmt (Hotamisligil et al. 1996), zeigen Körperzellen zu Beginn der Erkrankung eine zunehmende Insensibilität gegenüber dem Hormon, insbesondere im Muskel- und Fettgewebe (van Niekerk et al. 2019). Letzteres ist zusätzlich problematisch, weil dadurch dort die insulinvermittelte Hemmung der Lipolyse fehlt und es durch den gesteigerten Abbau des Speicherfetts zur Freisetzung großer Mengen an freien Fettsäuren kommt. Freie Fettsäuren können vom TLR4 auf Immunzellen gebunden werden und in diesen wiederum inflammatorische Signalwege aktivieren (McLaughlin et al. 2017). In Makrophagen sorgen freie Fettsäuren für eine verstärkte ROS-Produktion, was über die Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 das inflammatorische Milieu bei T2DM weiter fördert (Guo et al. 2015). Aber auch bei den in der Regel normalgewichtigen Typ-1-Diabetikern finden sich vermehrt Makrophagen des proinflammatorischen M1-Subtypes. Hier scheinen für die Polarisierung überwiegend Zytokine verantwortlich zu sein, die im Rahmen der gegen die  $\beta$ -Zellen gerichteten, zytotoxischen Reaktion von CD8 $^{+}$  T-Zellen nach direkter Interaktion mit CD4 $^{+}$  T-Zellen im Pankreas sezerniert werden (Calderon et al. 2008).

Die Zerstörung der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen ist aus einem weiteren Grund problematisch, da Insulin nicht nur wichtige regulatorische Funktionen im Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel und der zellulären Glukoseaufnahme besitzt, sondern auch selbst über eine anti-inflammatorische Wirkung verfügt (van Niekerk et al. 2019). Obwohl bei T1DM von Beginn an ein absoluter Insulinmangel besteht, kann allein die unabhängig vom Typ persistente Hyperglykämie bei DM neben zahlreicher Folgeerkrankungen Veränderungen im Immunsystem auslösen (Von Ah Morano et al. 2020). So wird beispielsweise das vermehrte Vorkommen von glykierten Proteinen im hyperglykämischen Blut mit einer Aktivierung des Komplementsystems in Zusammenhang gebracht, das über seine Effektorproteine letztlich ebenfalls auf systemischer Ebene proinflammatorisch wirkt (Tang and Yiu 2020). Daneben wird auch die schlechte Wundheilung bei Diabetikern auf eine verstärkte Neigung der neutrophilen Granulozyten zur NETose und den dadurch verursachten chronischen Entzündungsreiz zurückgeführt (Wong et al. 2015). Im Gegenzug zeigen Neutrophile bei DM sowohl eine verminderte ROS-Produktion als auch Beeinträchtigungen bei der Phagozytose, was die erhöhte Infektanfälligkeit der Patienten erklärt (Toniolo et al. 2019; Kumar and Dikshit 2019). Beide Effekte lassen sich *in vitro* mit Neutrophilen gesunder Probanden bereits durch kurzzeitige Inkubation in Kulturmedien mit erhöhtem Glukosegehalt simulieren (Perner et al. 2003; Jafar et al. 2016), was die Hypothese stützt, dass die beobachteten funktionellen Immunsystemveränderungen allein durch die hohen Blutglukosewerte bei DM bedingt sind.

## 2.2.4 Translationale Tiermodelle in der Diabetesforschung

Obwohl ein spontan auftretender DM als Pathologie bei mehreren Tierarten beschrieben ist, wird die Stoffwechselstörung in den Modellen der Grundlagenforschung in aller Regel experimentell induziert (Fang et al. 2019). Dafür stehen unterschiedliche Techniken zur Verfügung.

In verschiedenen Spezies einsetzbar und wegen der vergleichsweise einfachen und schnellen Durchführbarkeit weit verbreitet ist die DM-Induktion über Injektion eines Glukose-Analogons wie Streptozotocin oder Alloxan. Über Glukosetransporter Typ 2 (GLUT2) in die Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen aufgenommen, lösen die Wirkstoffe dort die Produktion freier Radikale aus, was letztlich zur Apoptose der Zellen führt (Lenzen 2008). Allerdings wird GLUT2 neben dem Pankreas auch in Leber und Niere exprimiert, weshalb zum erwünschten hyperglykämischen und hypoinsulinämischen Zustand toxische Organschäden hinzukommen können (Lenzen 2008). Alternativ kann in den größeren Tiermodellen wie Schwein und Hund eine Pankreatektomie durchgeführt werden, die aber aufgrund der hohen Letalität mittlerweile in der Regel nur noch für Inselzelltransplantationsstudien eingesetzt wird (Renner et al. 2020). Für Laborratten existiert hingegen zusätzlich ein fütterungsinduziertes DM-Modell, bei dem

über eine kalorien- und fettreiche Diät die Charakteristika des humanen Metabolischen Syndroms nachgebildet werden (Kleinert et al. 2018). Allerdings entwickelt keines der bisher bekannten Tiermodelle das komplette Spektrum pathologischer Veränderungen, wie sie beim humanen Krankheitsbild vorkommen (Renner et al. 2016). Die Etablierung des Genom-Editing via CRISPR/Cas erlaubt die präzise Erschaffung transgener Tiermodelle zur gezielten Aufklärung einzelner Fragestellungen im Rahmen der Diabetesforschung (Pickar-Oliver and Gersbach 2019). Mittlerweile existieren zahlreiche gentechnisch modifizierte DM-Modelle und zwar sowohl im Klein- als auch im Großtierbereich (Renner et al. 2020).

Schweine haben hier für die biomedizinischen Forschung in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung als Großtiermodell gewonnen (Wolf et al. 2014). Da sie dem Menschen in physiologischer, anatomischer und metabolischer Hinsicht deutlich stärker ähneln als Mäuse oder Ratten, stellen sie im Rahmen der translationalen Diabetesforschung eine wesentliche Verbesserung gegenüber den Nagermodellen dar (Renner et al. 2016). Zusätzlich besitzen Schweine durch ihre frühe Geschlechtsreife, die kurze Tragezeit und die saisonal unabhängigen multiparen Würfe gute reproduktive Eigenschaften vergleichbar mit denen klassischer Labortiere (Walters et al. 2012; Aigner et al. 2010). Die Glukosewerte im nüchternen Zustand sind bei Mensch und Schwein ähnlich, obwohl letztere etwas niedrigere Plasmainsulinspiegel aufweisen (Renner et al. 2010). Ihre Größe erlaubt beim Schwein außerdem die wiederholte Entnahme von Blutproben für metabolische Tests, wodurch die Entwicklung relevanter Krankheitsparameter präzise abgebildet werden kann (Renner et al. 2016).

## 2.2.5 *INS<sup>C94Y</sup>* transgene Schweine als Diabetesmodell

*INS<sup>C94Y</sup>* transgene (tg) Schweine exprimieren aufgrund einer gentechnischen Modifikation die Insulin-Variante C94Y, was der C96Y-Mutante in MIDY-Patienten entspricht (Wolf et al. 2014). Dies macht sie zu einem Großtiermodell für den permanenten NDM des Menschen (Renner et al. 2013), der nach aktueller Klassifikation in die vierte Kategorie der Diabetesformen einzuordnen ist (Association 2020). Der Aminosäureaustausch von Cystein durch Tyrosin führt zu einer gestörten Disulfidbrückenbindung und daraus resultierend einer Fehlfaltung des Proinsulin, wodurch in den β-Zellen über die „Unfolded Protein Response“ letztlich die Apoptose induziert wird (Liu et al. 2010). Zwar zeigen *INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweine bereits nach 24 Stunden eine signifikant erhöhte Nüchternblutglukose, zur Manifestation des diabetischen Phänotyps kommt es allerdings erst nach und nach durch den progredienten β-Zell-Verlust (Renner et al. 2013). Im Alter von viereinhalb Monaten besitzen die transgenen Schweine nur noch knapp 30% der β-Zell-Masse, die ihre wildtypischen Wurfgeschwister zu diesem Zeitpunkt aufweisen, und sind auch deutlich kleiner als diese (Renner et al. 2013). Mit zwei

Jahren lassen sich zudem an den Augen der *INSC<sup>C94Y</sup>* tg Schweine die typischen histologischen Veränderungen einer diabetischen Retinopathie nachweisen (Kleinwort et al. 2017). Bei der vergleichenden Analyse von hepatischem Gewebe aus zweijährigen *INSC<sup>C94Y</sup>* tg Sauen und wildtypischen Kontrollen wurden in einer aktuellen Multiomics-Studie mehrere inflammatorische und Immunsystem aktivierende Signalwege identifiziert, die in den transgenen Tiere eine geringere Abundanz aufwiesen (Backman et al. 2019). Dies kann als ein erster Hinweis gewertet werden, dass mit *INSC<sup>C94Y</sup>* tg Schweinen als translationales Tiermodell auch die immunologischen Veränderungen des humanen DM simuliert werden können.

## 2.3 Equine rezidivierende Uveitis

### 2.3.1 Bedeutung und Klinik

Bei der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) handelt es sich um eine bei Pferden aller Altersklassen unabhängig vom Geschlecht vorkommende spezifische Entzündung der mittleren Augenhaut (Gilger 2011; Sandmeyer et al. 2017). Weltweit sind davon etwa 10-25% der Pferde betroffen (Paschalis-Trela et al. 2017; Sandmeyer et al. 2017). Die Erkrankung zeichnet sich durch spontan auftretende und wiederkehrende Inflammationsschübe aus, was über die Zerstörung intraokulärer Strukturen letztendlich im vollständigen Verlust des Sehvermögens resultieren kann (Gerding and Gilger 2016). Im akuten Stadium zeigen betroffene Pferde meist entweder die für Entzündungen der vorderen Augensegmente klassische Kombination aus Blepharospasmus, Epiphora, Miosis und Photophobie (Fischer et al. 2019) oder aber, beim Vorliegen einer hinteren Uveitis, nur leichte bis keine Symptome, weshalb diese Verlaufsform der ERU oft erst spät erkannt wird (Gilger 2011). Zwar treten zwischen den akuten Entzündungsphasen immer wieder symptomfreie Intervalle auf, jedoch treibt jeder neuer inflammatorischer Schub die progressiven Zerstörung des betroffenen Gewebes weiter voran (Gilger 2011). Weil eine kausale Therapie der ERU bislang fehlt, zielt die Behandlung der Erkrankung in erster Linie auf eine Milderung der akuten Symptome und die Eindämmung möglicher Spätfolgen ab (Fischer et al. 2019; McMullen and Fischer 2017). Neben dieser veterinärmedizinischen Seite kommt der ERU im Bereich der translationalen Forschung eine besondere Bedeutung zu, da sie der autoimmunen Uveitis des Menschen im Hinblick auf Ätiologie, Pathophysiologie und Immunologie sehr ähnlich ist und somit das einzige spontane Tiermodell dieser Erkrankung darstellt (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2002b; Deeg et al. 2006b; Deeg et al. 2007b; Neutzner et al. 2011).

### 2.3.2 Beteiligte Immunzellen

Obwohl die Ätiologie bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt ist (Spiess 2010; Witkowski et al. 2016; Wiedemann et al. 2020), handelt es sich bei der ERU nachweislich um eine immunmedierte Erkrankung, bei der autoreaktive T-Zellen das Auge infiltrieren (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2002b; Kleinwort et al. 2016). Dabei wurden neben dem Interphotorezeptor Retinoid-bindendem Protein (IRBP) das zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein (CRALBP) als potentes okulares Autoantigen identifiziert (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2006b; Deeg et al. 2007b). So löste die Immunisierung gesunder Pferde mit IRBP und auch mit dem neu entdeckten CRALBP eine Symptomatik aus, wie sie in gleicher Weise bei einer spontanen ERU-Erkrankung auftritt (Deeg et al. 2002b). Zugleich konnten in den Tieren IRBP-spezifische Lymphozyten nachgewiesen werden, deren Proteom Ähnlichkeiten mit dem von peripheren Lymphozyten aus spontan erkrankten Pferden aufwies (Deeg et al. 2002b; Hauck et al. 2017). Dass bereits eine kleine Anzahl autoreaktiver T-Zellen ausreicht, um eine Entzündung des inneren Auges auszulösen, wurde durch Zelltransferstudien im experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) Modell bei Nagern gezeigt (Caspi et al. 1986; Rizzo et al. 1996). Trotzdem sind die genauen Mechanismen, durch die den aktivierten T-Zellen die Infiltration des immunprivilegierten okulären Kompartiments gelingt, bislang noch weitgehend unbekannt, obwohl die Überquerung der Blut-Retina-Schranke schon früh als Schlüsselereignis bei der Pathogenese der ERU identifiziert wurde (Deeg et al. 2002a). Durch immunhistochemische Untersuchungen an Präparaten von spontan erkrankten Pferdeaugen fand man heraus, dass die mit der ERU einhergehenden intraokularen Zellinfiltrate vor allem aus CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Th-Zellen) bestanden (Kleinwort et al. 2016). Neueste Erkenntnisse aus Migrationsversuchen belegen, dass die Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden eine erhöhte Motilität aufweisen und sich schneller und gezielter in Richtung eines chemotaktischen Reizes bewegen (Wiedemann et al. 2020). Damit wurden zuvor im Rahmen der ERU beschriebene Veränderungen der Lymphozyten im Hinblick auf ihr Proteom und Transmigrationsverhalten in funktionellen Experimenten bestätigt (Degroote et al. 2014; Degroote et al. 2017; Hauck et al. 2017; Schauer et al. 2018). Ferner konnten im Auge und im Blut von an ERU erkrankten Pferden erhöhte Mengen proinflammatorischer Zytokine wie IFN-γ und IL-2 nachgewiesen werden (Gilger et al. 1999; Saldinger et al. 2020), deren Produktion normalerweise durch Th1-Zellen erfolgt (Wagner et al. 2010; Freer et al. 2017), was erneut die Bedeutung dieses T-Zelltyps bei der equinen Erkrankung ERU hervorhebt. Weitere Untersuchungen des okulären Zytokinprofils der erkrankten Tiere belegen eine zusätzliche Beteiligung von proinflammatorischen Th17-Zellen bei der Pathogenese der ERU (Regan et al. 2012; Simeonova et al. 2016), die schon vorher im murinen EAU-Modell nachgewiesen wurde (Luger et al. 2008). Da unter physiologischen Bedingungen mehrere Mechanismen für die effektiven

Regulierung einer potenziellen, inflammatorische Reaktion im Auge sorgen können, bleibt zu klären, ob die ERU durch eine von Th1- oder Th17-Zellen vermittelte überschießende Entzündungsreaktion induziert wird oder auch ein Mangel an regulatorischen Faktoren bei der Pathogenese der Erkrankung beteiligt ist (Gery and Caspi 2018).

Neben Zellen des adaptiven Immunsystems scheinen aber auch einzelne Komponenten der angeborenen Immunabwehr in die Pathologie der ERU involviert zu sein. So wurde im Auge, aber auch im Blut, bei an ERU erkrankten Pferden eine gesteigerte Aktivität des Komplementsystems nachgewiesen und Makrophagen als mögliche Interaktionspartner benannt (Zippies et al. 2010). Bereits 2001 konnte durch die morphologische Beurteilung vitrealer Zellen von betroffenen Pferden gezeigt werden, dass die in den Glaskörper eingewanderte Leukozytenpopulationen sich teilweise mehrheitlich aus Granulozyten zusammensetzt (Deeg et al. 2001). Später bewiesen vergleichende Proteomanalysen, dass diese über die Blut-Retina-Schranke ins Auge migrierte Immunzellen sich von den im Gefäßsystem befindlichen Granulozyten desselben Tieres unterscheiden (Degroote et al. 2013). Aber auch die im Blut zirkulierenden granulozytären Immunzellen von gesunden und erkrankten Pferden weisen Unterschiede hinsichtlich ihrer Proteinexpression auf (Degroote et al. 2012). Für eine Beteiligung von Granulozyten an der Pathogenese sprechen zudem Ergebnisse einer Hannoveraner Forschergruppe, die bei zirkulierenden Neutrophilen von ERU-Patienten eine stärkere Neigung zur NET-Bildung und in der Folge auch vermehrt NET-Markerproteine im Serum nachwiesen (Fingerhut et al. 2019). Außerdem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Glaskörperflüssigkeit erkrankter Augen Kontrollgranulozyten ebenfalls zu einer vermehrten NET-Freisetzung anregen kann (Fingerhut et al. 2019).

## 2.4 Differentielle Proteomanalyse

Das Proteom beschreibt die Gesamtheit aller Proteine, wie sie zu einem definierten Zeitpunkt in der Zelle oder dem Gewebe vorliegen (Wilkins et al. 1996a; Wilkins et al. 1996b). Es wird dabei durch extrinsische und intrinsische Faktoren, sowohl in seiner qualitativen als auch quantitativen Zusammensetzung beeinflusst (Valdés et al. 2020). Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom also komplexen dynamischen Veränderungen unterworfen und seine Analyse bildet die durch alternatives Spleißen und posttranskriptionale Modifikationen erzeugte, zusätzliche, nicht DNA-kodierte Ebene der zellulären Proteininformation ab (Wilkins et al. 1996b). Das bietet den weiteren Vorteil, dass neben Geweben und Zellen auch weitgehend Nukleinsäure-freie Proben, wie beispielsweise Körperflüssigkeiten, auf ihr Proteinzusammensetzung hin untersucht werden können (Chiaradia and Miller 2020; Plowman et al. 2020). Mögliche Veränderungen lassen sich in der Proteinanalytik mit unterschiedlicher Verfahren darstellen und erlauben durch den anschließenden Vergleich mit

einem physiologischen Proteom die Identifikation Pathogenese-assozierter Abweichungen (Hauck et al. 2017; Lepper et al. 2018; Huth et al. 2019; Backman et al. 2019; Kleinwort et al. 2019; von Rüden et al. 2020). Dadurch können solche vergleichenden Proteomanalysen sowohl relevante Hinweise zur Ätiologie der Erkrankung (Degroote et al. 2017) als auch zu möglichen Therapieansätzen liefern (Piazza et al. 2020). Tatsächlich existieren sogar bereits erste Studien, bei denen aus dem Ergebnis der differentiellen Proteomanalyse die zugrundeliegende genetische Mutation einer Krankheit korrekt vorausgesagt wurde (Grabowski et al. 2019).

Die Massenspektrometer-gestützte Proteomanalyse spielt dabei gerade im Bereich der Immunologie eine wichtige Rolle, wo häufig mit frisch isolierte Primärzellen gearbeitet wird und daher mitunter nur sehr geringe Probenmengen für die Analyse verfügbar sind (Sukumaran et al. 2019). Als sogenannte Bottom-up-Technik eingesetzt, können durch das hohe Auflösungsvermögen der Methode selbst in bereits gut beschriebenen biologischen Systemen noch neue Funktionen und Zusammenhänge aufgedeckt werden (Aebersold and Mann 2016; Sukumaran et al. 2019). Außerdem ermöglicht die Massenspektrometrie die Antikörper-unabhängige Untersuchung von Proteinen, was besonders bei Studien an Tierarten, die nicht zu den klassischen Modellorganismen zählen und für die daher, wenn überhaupt, nur wenige geeignete Antikörper zur Verfügung stehen, einen enormen Vorteil darstellt (Heck and Neely 2020).

Das Grundprinzip der Massenspektrometrie beruht dabei auf der Bestimmung der molekularen Masse von Ionen durch Messung ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) (Aebersold and Mann 2016). Bei der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) sorgt die Hintereinanderschaltung mehrerer Analysatoren für eine gesteigerte Selektivität im Vergleich zur ursprünglichen Methode (Dongre et al. 1997). Durch eine vorgeschaltete Flüssigkeitschromatographie (LC) kann die Qualität der Proteinanalyse einer komplexen Probe zusätzlich gesteigert werden (Beck et al. 2011). Die Online-Kopplung eines Tandem-Massenspektrometers an eine LC (LC-MS/MS), erlaubt schließlich die automatisierte Messung der kontinuierlich eluierten Proben-Faktionen und deren Zuordnung zu den detektierten Massenspektren (Link et al. 1999). Bei der Bottom-up-Proteomik bestehen diese einzelnen Fraktionen aus Peptiden, die durch den enzymatischen Verdau der ursprünglichen Probe mit einer Protease, meist Trypsin, entstanden sind und sich wesentlich leichter ionisieren lassen als komplett Proteine (Dupree et al. 2020). Zuerst wird nun das Massenspektrum (MS1) der einzelner Peptidionen, der sogenannten Vorläuferionen, erfasst, denen durch die anschließende Fragmentierung und massenspektrometrische Erfassung dieser Peptidfragmentionen im zweiten Analysator jeweils ein spezifisches Produktmassenspektrum (MS2) zugeordnet wird (Dupree et al. 2020). Dabei werden die zu fragmentierenden Vorläuferionen in der Regel anhand ihrer Signalstärke im MS1 ausgewählt,

was als datenabhängige Akquisition (*engl.* data dependent acquisition, DDA) bezeichnet wird (Bateman et al. 2014). Am Ende erfolgt über den Vergleich des Produktmassenspektrums mit Proteinsequenzdatenbanken unter Zuhilfenahme entsprechender Programme wie z.B. MASCOT (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com>) die Identifikation der ursprünglich in der Probe vorhandene Proteine (Degroote et al. 2017). Eine weitere Verbesserung der MS/MS-Technik wird mit der datenunabhängige Akquisition (*engl.* data independent acquisition, DIA) erreicht, weil die Fragmentierung der Vorläuferionen hier unabhängig von der ersten Analyse erfolgt (Bruderer et al. 2017). Dadurch können in komplexen Proben wie einem Zelllysat auch noch Proteine mit geringer Abundanz identifiziert werden, die bei der DDA möglicherweise übersehen worden wären (Bruderer et al. 2017; Kraut et al. 2019).

Allerdings lässt sich eine Probe mit Hilfe der Massenspektrometrie nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ proteomisch untersuchen. Kommt hier eine label-freie Messtechnik zum Einsatz, kann auf eine aufwändige, teils teure Probenaufbereitung verzichtet und die Methode darüber hinaus leicht an unterschiedliche experimentelle Designs adaptiert werden (Zhao et al. 2020). Dabei wird anhand der gemessenen Massenspektren der einzelnen Proteinfragmente auf die Abundanz des Proteins in der Einzelprobe geschlossen und zwar relativ im Vergleich zu den weiteren analysierten Proben (Nahnsen et al. 2013). Dadurch ermöglicht die Proteomik, im Gegensatz zur Genom- und Transkriptomanalyse, auch die Aufdeckung pathogener Prozesse, die allein aufgrund einer Verschiebung zellulärer Proteinabundanzen entstehen.



### 3 PUBLIKATION I

#### Title

Proteome profile of neutrophils from a transgenic diabetic pig model shows distinct changes

#### Autoren

**Maria Weigand**, Roxane L. Degroote, Barbara Amann, Simone Renner, Eckhard Wolf,  
Stefanie M. Hauck, Cornelia A. Deeg

#### Journal

Journal of Proteomics

#### Status

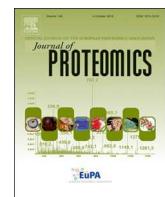
Publiziert.

Journal of Proteomics (**2020**), 224: 103843; doi: 10.1016/j.jprot.2020.103843

Epub 2020 May 27

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874391920302116?via%3Dihub>





## Proteome profile of neutrophils from a transgenic diabetic pig model shows distinct changes

Maria Weigand<sup>a</sup>, Roxane L. Degroote<sup>a</sup>, Barbara Amann<sup>a</sup>, Simone Renner<sup>b,c,d</sup>, Eckhard Wolf<sup>b,c,d,e</sup>, Stefanie M. Hauck<sup>f</sup>, Cornelia A. Deeg<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Veterinary Sciences, LMU, Munich, Germany

<sup>b</sup> Gene Center and Department of Veterinary Sciences, LMU, Munich, Germany

<sup>c</sup> Center for Innovative Medical Models (CiMM), Department of Veterinary Sciences, LMU, Munich, Germany

<sup>d</sup> German Center for Diabetes Research (DZD), Neuherberg, Germany

<sup>e</sup> Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, LMU, Munich, Germany

<sup>f</sup> Research Unit Protein Science, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health GmbH, Germany



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Quantitative label-free LC-MS/MS  
Diabetes mellitus  
Neutrophil  
Granulocyte  
Transgenic pig  
Myosin regulatory light chain 9 (MLC-2C)

### ABSTRACT

*INS*<sup>C94Y</sup> transgenic pigs develop a stable diabetic phenotype early after birth and therefore allow studying the influence of hyperglycemia on primary immune cells in an early stage of diabetes mellitus *in vivo*. Since immune response is altered in diabetes mellitus, with deviant neutrophil function discussed as one of the possible causes in humans and mouse models, we investigated these immune cells in *INS*<sup>C94Y</sup> transgenic pigs and wild type controls at protein level. A total of 2371 proteins were quantified by label-free LC-MS/MS. Subsequent differential proteome analysis of transgenic animals and controls revealed clear differences in protein abundances, indicating a deviant behavior of granulocytes in the diabetic state. Interestingly, abundance of myosin regulatory light chain 9 (MLC-2C) was increased 5-fold in cells of diabetic pigs. MLC-2C directly affects cell contractility by regulating myosin ATPase activity, can act as transcription factor and was also associated with inflammation. It might contribute to impaired neutrophil cell adhesion, migration and phagocytosis.

Our study provides novel insights into proteome changes in neutrophils from a large animal model for permanent neonatal diabetes mellitus and points to dysregulation of neutrophil function even in an early stage of this disease.

Data are available via ProteomeXchange with identifier [PXD017274](#).

**Significance:** Our studies provide novel basic information about the neutrophil proteome of pigs and contribute to a better understanding of molecular mechanisms involved in altered immune cell function in an early stage diabetes. We demonstrate proteins that are dysregulated in neutrophils from a transgenic diabetic pig and have not been described in this context so far. The data presented here are highly relevant for veterinary medicine and have translational quality for diabetes in humans.

### 1. Introduction

With increasing prevalence in both developed and developing countries, diabetes mellitus has become the most important metabolic disease in humans today [1,2]. A link between diabetes and increased susceptibility for infections was proven by numerous studies [3]. In addition to this, severe courses of disease like bacteremia are seen more often in diabetic patients than in people with no disease history [4]. While clinical importance of these findings is beyond questioning, the underlying mechanisms responsible for the impaired immune function in the diabetic condition, poorly understood so far, are unknown to

date.

As first line effector cells of the innate immune system, neutrophils are able to react in multiple ways to potential threats, namely through phagocytosis, degranulation, ROS release and formation of DNA-based extracellular traps (NETs) [5,6]. Besides this essential defensive function of neutrophils, their role as regulatory elements in the healthy organism becomes more and more obvious [7]. Lately neutrophil granulocytes, formerly considered to depend mainly on glycolysis, were proven to adapt their metabolic pathways via transcriptional regulation to a changed environment [8]. During pathological condition of diabetes these adaptions include deficiency in ROS production,

\* Corresponding author.

E-mail address: [Cornelia.Deeg@lmu.de](mailto:Cornelia.Deeg@lmu.de) (C.A. Deeg).

chemotaxis, adhesion and phagocytosis [8]. By which regulatory pathways these effects are transduced inside the cell is not fully understood to date [9]. However, recent studies showed that insulin is not only required for maintaining glucose homeostasis but also acts as an immunomodulatory hormone [9]. It can affect cytokine release and expression of adhesion molecules in leukocytes [9]. Whether these observations of insulin impacting the immune system may be mediated solely by an increased blood glucose level is currently under discussion [10].

Pigs are used as large animal models in a wide field of biomedical research [11]. Their close similarity to humans in terms of size, anatomy, diet and metabolism offers some significant benefits for diabetes research [11]. Developing pathologic alterations like diabetic retinopathy, vasculopathy and nephropathy, diabetes in pigs mimics the human diabetic phenotype much better than the commonly used rodent models do [11]. Genetic engineering made several transgenic breeding lines available for different approaches within the field of diabetes research [12]. The *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pig model used in this study develops a stable diabetic phenotype within the first week of life, similar to permanent neonatal diabetes mellitus (PNDM) or mutant *INS* gene-induced diabetes of youth (MIDY) in humans [13]. Due to a point mutation within the insulin gene and consequential amino acid sequence (C→Y), the secretion of the protein by beta cells is impaired in these pigs [13]. Therefore, fasting and postprandial hyperglycemia is observed, rendering the model suitable to detect hyperglycemia-associated pathophysiolgies [13].

Abnormal behavior of primary polymorphonuclear leukocytes (PMN) in diabetic settings was reported in humans and in experiments in mice [14,15]. While studies in man can display differences between diabetes patients depending on their state of glycemic control, early stages of diabetes are difficult to observe due to the insidious disease process. Hence, we used PMN from young *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs and matched wild type controls with the aim to gain insight into changes in the neutrophil proteome that point to dysfunction occurring in the initial stage of diabetes.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sample preparation

PMN from heparinized venous whole blood of six 12 week old *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic (*INS<sup>C94Y</sup>*) pigs and six age-matched wild type (wt) littermates were used in this study. In detail, neutrophils of four *INS<sup>C94Y</sup>* and three wt animals underwent mass spectrometric analysis. Immunofluorescence staining was conducted at a later time with PMN of the other five individuals (two *INS<sup>C94Y</sup>*, three wt). Relative amount of leukocyte subsets was determined via DiffQuick stained blood smears for all pigs and neutrophil percentages were comparable between both groups (*INS<sup>C94Y</sup>* 30 ± 13%, wt 28 ± 8%; Supplementary Table 1). As novel findings in both murine models and humans suggest differences in the proteomic profile of circulating neutrophils driven by circadian rhythms [16,17], the blood samples used in our experiments were all obtained at the same time of day. Collected data (mean ± SD) of glucose level (one hour post-prandial, *INS<sup>C94Y</sup>* 360 ± 77 mg/dl, wt 80 ± 5 mg/dl; Supplementary Table 1) and body weight (*INS<sup>C94Y</sup>* 27.5 ± 2.0 kg, wt 34.5 ± 5.7 kg; Supplementary Table 1) were in accordance with the values described by Renner et al. for this large animal model [13]. Sedimentation of erythrocytes was forced by a first 20 min centrifugation step (RT, 100 x g, brake off). PMN were then isolated from plasma by density gradient centrifugation (RT, 290 x g, 25 min, brake off) with Pancoll separating solution (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany). Cells were then carefully washed (4 °C, 400 x g, 10 min) in cold PBS and remaining erythrocytes were removed by two times 30 s sodium chloride (0.2% NaCl) lysis. Isotonicity of samples was restored through addition of equal parts of 1.6% NaCl. Cells were then washed (4 °C, 400 x g, 10 min) and resuspended in PBS (pH 7.4).

Blood withdrawal was performed according to the German Animal Welfare Act with permission from the responsible authority (Government of Upper Bavaria), following the ARRIVE guidelines and Directive 2010/63/EU.

### 2.2. Magnetic activated cell sorting (MACS) for neutrophils

1 × 10<sup>7</sup> PMN of 3 wt and 4 *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs were incubated with neutrophil-specific anti-pig granulocyte antibody 6D10 (Bio-Rad AbD Serotec, Puchheim, Germany, isotype mouse IgG2a), diluted 1:50 in staining buffer (0.5% BSA + 2 mM EDTA in PBS pH 7.2) for 20 min at 4 °C. Cells were then washed and resuspended in 80 µl staining buffer before adding 20 µl of anti-mouse IgG2a/b MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). After 15 min of incubation at 4 °C, cells were washed once again and resuspended in staining buffer without BSA. From now on only BSA-free buffers were used in order to avoid contamination with albumin in subsequent mass spectrometry analysis. LS columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were placed in the magnetic field and rinsed with buffer solution. Cell suspension was applied followed by three washing steps to remove unlabeled cells. Then, the column was removed from the magnetic field and the positive fraction was eluted with 5 ml buffer solution. After washing twice (4 °C, 300 x g, 10 min) cells were resuspended in 1 ml buffer. Successful enrichment of neutrophils was monitored by DiffQuick stained cytoslides. From each animal used in the experiment, 6 × 10<sup>5</sup> cells were pelleted (4 °C, 2300 x g, 10 min) and stored at –20 °C for filter-aided sample preparation (FASP).

### 2.3. Mass spectrometric analysis

Each cell pellet was directly lysed in urea buffer (8 M in 0.1 M Tris/HCl pH 8.5) assisted by sonication and vortexing. Samples were proteolyzed with LysC and trypsin by a modified filter-aided sample preparation (FASP) as described [18]. Acidified eluted peptides were analyzed on a Q Exactive HF-X mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in the data-independent mode. Approximately 0.5 µg per sample spiked with one injection unit of the hyper reaction monitoring (HRM) calibration kit (Biognosys, Schlieren, Switzerland, cat. no. Ki-3003) for retention time indexing were automatically loaded to the online coupled ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) system (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific). A nano trap column was used (300-µm ID X 5 mm, packed with Acclaim PepMap100 C18, 5 µm, 100 Å; LC Packings, Sunnyvale, CA) before separation by reversed phase chromatography (Acquity UHPLC M-Class HSS T3 Column 75 µm ID X 250 mm, 1.8 µm; Waters, Eschborn, Germany) at 40 °C. Peptides were eluted from the column at 250 nl/min using increasing ACN concentration (in 0.1% formic acid) from 3% to 41% over a linear 105-min gradient. The DIA method consisted of a survey scan from 300 to 1650 mass-to-charge ratio at 120,000 resolution and an automatic gain control (AGC) target of 3e6 or 120 ms maximum injection time. Fragmentation was performed with higher energy collisional dissociation and a target value of 3e6 ions determined with predictive AGC. Precursor peptides were isolated with 37 variable windows spanning from 300 to 1650 mass-to-charge ratio at 30,000 resolution with an AGC target of 3e6 and automatic injection time. The normalized collision energy was 28, and the spectra were recorded in profile mode. The cycle times were 2.16 s and an average of seven data points for quantification per peak was reached.

For label-free quantification of DIA data, the DIA LC-MS/MS data set was analyzed by comparing the MS2 fragment spectra from the recorded windows (see above) against a spectral library collected from data-dependent acquisition data (30 raw files, derived from high pH fractionated porcine granulocytes and lymphocytes) from the same instrument. The spectral library was generated directly in Spectronaut Pulsar X (Biognosys, Schlieren, Switzerland; version 12.0.20491.17.25792) as described [19]. Spectronaut was equipped

with the Ensembl Pig database (Release 75 (Sscrofa10.2), 25,859 sequences, <https://www.ensembl.org>) containing additional few spiked peptides (e.g., Biognosys HRM peptide sequences). The default settings for database match included: full trypsin cleavage, peptide length of between 7 and 52 amino acids and maximally two missed cleavage sites. Carbamidomethylation of cysteine was set as fixed modification and variable modifications allowed were deamidation and oxidation of methionine. All FDRs were set as 0.01 for the peptide-spectrum match (PSM), peptide and protein. To be included into the final ion library, fragment ions were required to contain a minimum of three amino acids in length, with a mass range between 300 and 1800  $m/z$ , and a minimum relative intensity of 5%. The best 3–6 fragments per peptide were included in the library. The final spectral library generated in Spectronaut contained 4511 protein groups and 62,248 peptide precursors.

Quantification was based on cumulative MS2 area levels. Briefly, raw files were imported into Spectronaut and XIC extraction settings were set to dynamic with a correction factor of one. Normalization was performed by default settings in Spectronaut, based on the Local Regression Normalization [20]. Automatic calibration mode was chosen with nonlinear local retention time recalibration based on the spiked HRM peptides enabled. Interference correction on MS1 and MS2 level was enabled. Peptide identification was filtered to satisfy an FDR of 1% by the mProphet approach [21]. Only proteotypic peptides were considered for protein quantification applying summed precursor quantities based on MS2 area quantity. A match between runs was enabled with the q-value percentile mode 0.3 threshold. This setting filters for peptides that fulfill the 1% FDR threshold in at least 30% of all samples.

#### 2.4. Data availability

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [22] partner repository under the Project Name “The porcine granulocyte proteome: expression changes in a transgenic pig model for diabetes” with the dataset identifier [PXD017274](#).

#### 2.5. Data analysis

Proteins with an  $INS^{C94Y}$ /wt ratio of at least 2 were considered differentially abundant. Statistical analysis was performed on  $\log_2$  transformed normalized abundance values using Student's *t*-test. Changes in protein abundance between conditions were considered significant at  $p < .05$ .

Heatmap was created with open source software Cluster 3.0 with the following settings: hierarchical clustering, euclidean distance for both genes and arrays, complete linkage; and was illustrated via Java TreeView (version 1.1.6r4, <http://jtreeview.sourceforge.net>) [23]. Volcano plot was designed with GraphPad Prism Software (version 5.04). Pathway enrichment analysis was done with open source software Reactome (Pathway Browser version 3.6, <https://reactome.org>) [24].

#### 2.6. Immunofluorescence staining

$8 \times 10^4$  PMN of two  $INS^{C94Y}$  transgenic animals and three control were centrifuged (600  $\times g$ , 8 min) on microscope slides, fixed in icecold acetone and air dried or directly stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for later analysis. After rehydration in TBS-T for 15 min, blocking was performed with 5% goat serum (in TBS-T) for 40 min. Primary antibody (polyclonal rabbit anti-human MYL9 antibody, Dianova, Hamburg Germany) was diluted 1:100 in staining buffer (TBS-T containing 1% BSA) and incubated with cells at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. As specified by the manufacturer, cross reactivity of this antibody was expected and sequence homology of porcine myosin regulatory light chain 9 with human protein was checked

via BLASTP (version 2.10.0+, 99.42% identities, *E*-value 1e-125) [25,26]. In western blot the antibody revealed a strong signal at the level of 15 kDa and two discreet bands at 10 and 18 kDa.

Following three washing steps with staining buffer, secondary antibody (goat anti-rabbit IgG H + L Alexa568, Invitrogen, Karlsruhe, Germany; 1:500) was applied for 30 min. Cell nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, Karlsruhe, Germany; 1:1000) and slides were mounted with coverslips using mounting medium. Binding pattern of polyclonal MYL9-antibody on PMN was assessed using a Leica Dmi8 microscope with associated LAS-X-software (both Leica, Wetzlar, Germany). Grey value of 71 (wt,  $n = 3$ ) and 51 single cells ( $INS^{C94Y}$ ,  $n = 2$ ), respectively, was determined and statistics was calculated on mean factors of intensity with GraphPad Prism Software (version 5.04) using Mann-Whitney *U* test.

### 3. Results

#### 3.1. The porcine neutrophil proteome shows divergent protein abundances in $INS^{C94Y}$ transgenic pigs

We identified a total of 2371 proteins in the whole sample set of primary pig neutrophils (Supplementary Table 2). Of these, 1680 were identified with at least two unique peptides. The cell fraction analyzed here consisted of  $98.4 \pm 1.9\%$  neutrophils with lymphocytes being the most frequent impurity ( $1.2 \pm 1.2\%$ , Supplementary Fig. 1C). Quantitative comparison of the protein repertoire revealed 51 proteins with significant differences in abundance between  $INS^{C94Y}$  transgenic animals and control group (Table 1). Whereas 18 proteins were higher abundant in wild type, 33 showed increased abundances in diabetic pigs compared to controls. To further illustrate the quantifications, we performed hierarchical cluster analysis with the differentially abundant proteins. As visualized in Fig. 1, each individual sample clustered to its correct group (wt or  $INS^{C94Y}$ ).

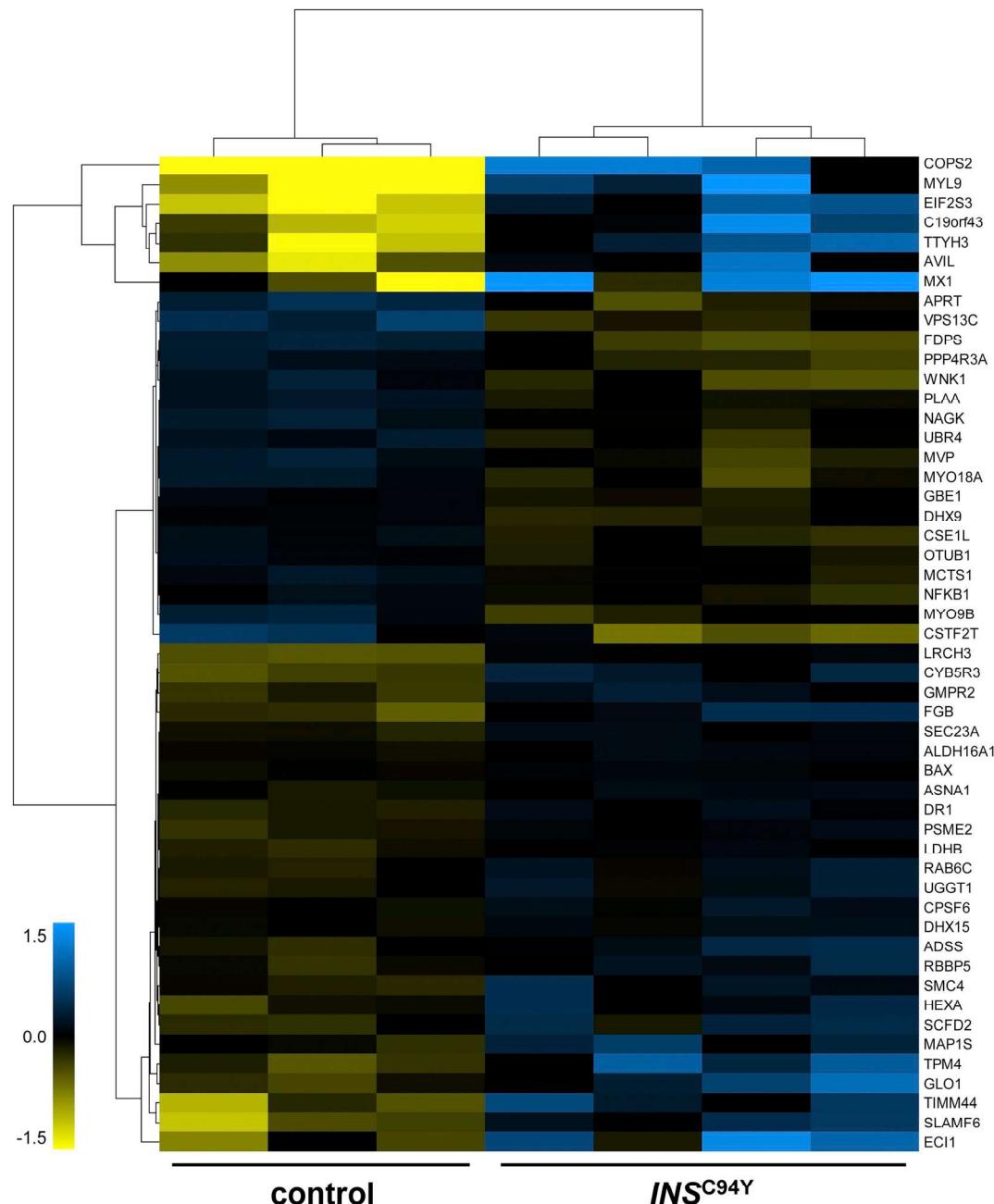
#### 3.2. Five proteins display significantly increased abundances in neutrophils of diabetic pigs

Due to the fact that only 2-fold protein abundance differences were considered biologically relevant, value for  $INS^{C94Y}$ /wt ratio cut-off was set at  $\geq 2$  for further analysis. Among the 51 differentially abundant proteins, eight passed this threshold (Fig. 2). Out of these, five candidates were identified with at least two unique peptides. At the top of this list, COP9 signalosom subunit 2 (SGN2) was 10-fold higher abundant in neutrophils of diabetic pigs, followed by myosin regulatory light chain 9 (MLC-2C, ratio 4.6) and myxovirus resistance protein 1 (ratio 3.8). The protein abundance of the open reading frame 43 on chromosome 19 (C19orf43) showed a 2.8-fold increase in  $INS^{C94Y}$  transgenic pigs compared to controls. Further, advillin was identified with a 2.4-fold higher abundance in neutrophil granulocytes of diabetic pigs.

Since two of these enriched proteins (myosin regulatory light chain 9 and advillin) are related to cytoskeletal dynamics and alterations of this crucial process in granulocytes are known to affect immune defense [27], we focused our further experiments on myosin regulatory light chain 9, which had the higher fold change compared to advillin.

#### 3.3. Immunocytology highlights myosin regulatory light chain 9 abundance differences in PMN of diabetic pigs

To further characterize myosin regulatory light chain 9 in PMN of diabetic pigs, we performed immunofluorescence staining (Fig. 3). As shown by representative immunofluorescence images, myosin regulatory light chain 9 was detected in most of the mapped PMN both in wild type and diabetic pigs (Fig. 3B, D). Regarding the subcellular location, myosin regulatory light chain 9 seems to be associated to a perinuclear region to a similar extent in both groups. However, myosin regulatory light chain 9 level was increased 4-fold (\*\* $p < .0001$ ) in



**Fig. 1.** Hierarchical clustering of proteins with significance level  $p < .05$  for comparison of protein abundances between  $INS^{C94Y}$  transgenic pigs and non-transgenic controls. Yellow colour indicates decreased and blue colour increased abundance of the identified proteins labeled on the right with their human orthologue gene names. Each individual animal was assigned to its respective group by unsupervised clustering. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

cells from  $INS^{C94Y}$  transgenic pigs compared to controls (Fig. 3E).

#### 4. Discussion

Using label-free LC-MS/MS, we obtained a proteomic data set for porcine neutrophils with an unprecedented high resolution of 2371 identified proteins. Hence our data provide a basis for further research regarding the innate immune system of pigs. Moreover, the aim of the present study was to characterize neutrophil granulocytes in  $INS^{C94Y}$  transgenic pigs and gain deeper insight into proteomic changes related to the early stage of diabetes mellitus. 51 of all identified proteins differed significantly in abundances between the diabetic group and controls. Our findings match well with results from recent studies in humans on this matter, describing 30 differences in the PMN proteome

from diabetic patients compared to healthy controls [15]. While 18 of our identified proteins were also among the 30 identifications from the human dataset, none of these 18 proteins reached the set ratio cut-off of 2, which we applied to satisfy stringency. This may originate from the use of different methodology: analysis of human specimen was performed with 2D-gel electrophoresis, as opposed to our non-gel-based approach [15]. Further, the gel-based experiments of the human study were performed on a mixed population of neutrophils, eosinophils and basophils, and only included significantly altered spots in subsequent mass spectrometry analysis [15], whereas we specifically targeted neutrophils for proteome analysis in  $INS^{C94Y}$  transgenic pigs and controls. In order to ensure purity of neutrophils used in our experiments, we performed magnetic activated cell sorting with a porcine specific antibody which binds to an antigen exclusively expressed on neutrophil

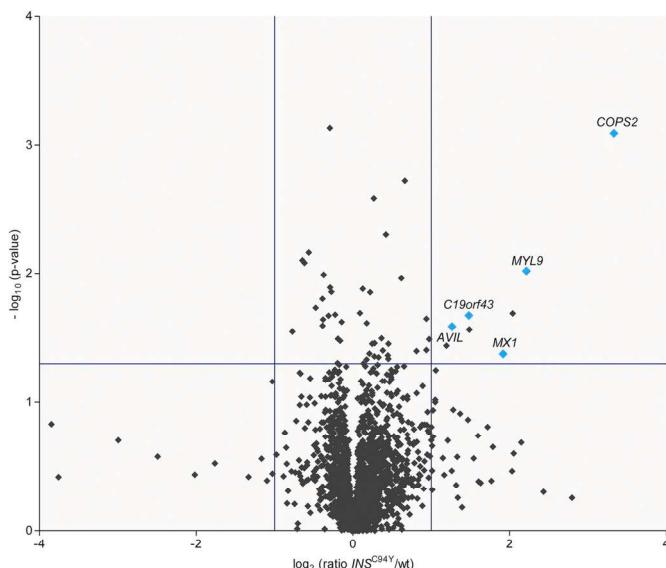
**Table 1**

Proteins showing significant differences in abundance between *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs and non-transgenic controls. Column 1 (protein ID) contains the accession number of the identified protein and column 2 (description) the respective protein name, both as listed in the Ensembl protein database (<http://www.ensembl.org>). Italicized names display proteins originally listed as uncharacterized protein in the Ensembl database output. Searching by accession number in the Universal Protein Resource database (<https://www.uniprot.org>) provided the description for these proteins. Column 3 (gene name) contains the name of the human orthologue gene. Column 4 (ratio) shows ratio of protein abundance in *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs compared to the control group. The *p*-value as calculated by Student's *t*-test is shown in column 5. Column 6 (peptide counts) displays the number of unique peptides used for quantification. Highlighted proteins are assigned to the process of neutrophil degranulation by pathway enrichment analysis in the Reactome Knowledgebase (<https://reactome.org>).

Protein ID	Description	Gene name	Ratio	<i>p</i> -value	Peptide counts
ENSSCP00000005012	COP9 signalosome subunit 2	COPS2	10.1	0.001	7
ENSSCP00000026757	Sus scrofa myosin, light chain 9, regulatory	MYL9	4.6	0.010	2
ENSSCP0000012965	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	EIF2S3	4.1	0.020	1
ENSSCP0000029166	<i>Sus scrofa</i> myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	MX1	3.8	0.042	12
ENSSCP0000008078	<i>tweety</i> family member 3	TTYH3	2.8	0.027	1
ENSSCP0000014597	chromosome 19 open reading frame 43	C19orf43	2.8	0.021	3
ENSSCP0000023779	adillin	AVIL	2.4	0.026	2
ENSSCP0000024948	enoyl-CoA delta isomerase 1	ECI1	2.3	0.036	1
ENSSCP0000014442	translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog (yeast)	TIMM44	2.0	0.032	1
ENSSCP0000006805	SLAM family member 6	SLAMF6	1.9	0.039	1
ENSSCP0000014722	<i>Sus scrofa</i> tropomyosin 4	TPM4	1.9	0.023	6
ENSSCP0000022159	glyoxalase I	GLO1	1.8	0.040	1
ENSSCP0000000040	cytochrome b5 reductase 3	CYB5R3	1.6	0.002	7
ENSSCP0000009601	<i>Sus scrofa</i> fibrinogen beta chain	FGB	1.5	0.011	1
ENSSCP0000012625	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 3	LRCH3	1.4	0.000	1
ENSSCP0000014764	microtubule-associated protein 1S	MAP1S	1.4	0.035	4
ENSSCP0000025078	<i>Sec1</i> family domain containing 2	SCFD2	1.4	0.046	1
ENSSCP0000002105	hexosaminidase A (alpha polypeptide)	HEXA	1.4	0.043	7
ENSSCP0000025669	guanosine monophosphate reductase 2	GMPR2	1.3	0.005	6
ENSSCP0000011592	adenylosuccinate synthetase isozyme 2	ADSS	1.3	0.040	7
ENSSCP0000012502	structural maintenance of chromosomes 4	SMC4	1.3	0.032	5
ENSSCP0000016213	retinoblastoma binding protein 5	RBBP5	1.3	0.045	1
ENSSCP0000015747	RAB6C, member RAS oncogene family	RAB6C	1.2	0.035	8
ENSSCP0000016804	<i>UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1</i>	UGGT1	1.2	0.044	20
ENSSCP0000023332	down-regulator of transcription 1, TBP-binding (negative cofactor 2)	DR1	1.2	0.003	4
ENSSCP0000002190	proteasome activator complex subunit 2	PSME2	1.2	0.035	8
ENSSCP0000002115	<i>Protein transport protein SEC23</i>	SEC23A	1.2	0.014	1
ENSSCP0000024847	<i>Sus scrofa</i> lactate dehydrogenase B	LDHB	1.2	0.042	2
ENSSCP0000014598	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 (bacterial)	ASNA1	1.1	0.024	4
ENSSCP000000520	cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	CPSF6	1.1	0.046	6
ENSSCP0000009333	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box helicase 15	DHX15	1.1	0.050	19
ENSSCP0000003435	aldehyde dehydrogenase 16 family, member A1	ALDH16A1	1.1	0.013	17
ENSSCP0000003404	Uncharacterized protein	BAX	1.1	0.020	5
ENSSCP0000019539	Uncharacterized protein	GBE1	0.9	0.024	2
ENSSCP0000013872	<i>Sus scrofa</i> OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1	OTUB1	0.9	0.033	10
ENSSCP0000023695	<i>ATP-dependent RNA helicase A</i>	DHX9	0.9	0.032	11
ENSSCP0000030177	<i>Sus scrofa</i> nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NFKB1	0.9	0.049	1
ENSSCP0000011895	Uncharacterized protein	MCTS1	0.9	0.021	1
ENSSCP0000007947	<i>CSE1</i> chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1L	0.8	0.014	1
ENSSCP0000008878	N-acetylglucosamine kinase	NAGK	0.8	0.013	7
ENSSCP0000005510	phospholipase A2-activating protein	PLAA	0.8	0.001	5
ENSSCP0000021608	Uncharacterized protein	UBR4	0.8	0.021	1
ENSSCP0000002642	SMEK homolog 1, suppressor of mek1 ( <i>Dictyostelium</i> )	PPP4R3A	0.8	0.010	2
ENSSCP0000025778	Uncharacterized protein	MYO18A	0.8	0.023	2
ENSSCP0000014753	<i>Myosin IXB</i>	MYO9B	0.8	0.026	3
ENSSCP0000026257	major vault protein	MVP	0.8	0.016	16
ENSSCP0000000801	WNK lysine deficient protein kinase 1	WNK1	0.7	0.018	1
ENSSCP0000002862	<i>Pribosyltran</i> domain-containing protein	APRT	0.7	0.007	5
ENSSCP0000006940	<i>Sus scrofa</i> farnesyl diphosphate synthase	FDPS	0.7	0.008	7
ENSSCP0000026644	Uncharacterized protein	VPS13C	0.6	0.008	1
ENSSCP0000011119	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 2, 64kDa, tau variant	CSTF2T	0.6	0.028	1

granulocytes [28]. However, the amount of this antigenic surface molecule decreases in the course of neutrophil maturation [28]. Interestingly, we could observe evidence of this process in our sorting

experiment, as the positive fraction of sorted cells consisted of both immature, banded and mature, segmented neutrophils, while the flow-through contained distinctly mature neutrophils showing nuclei with



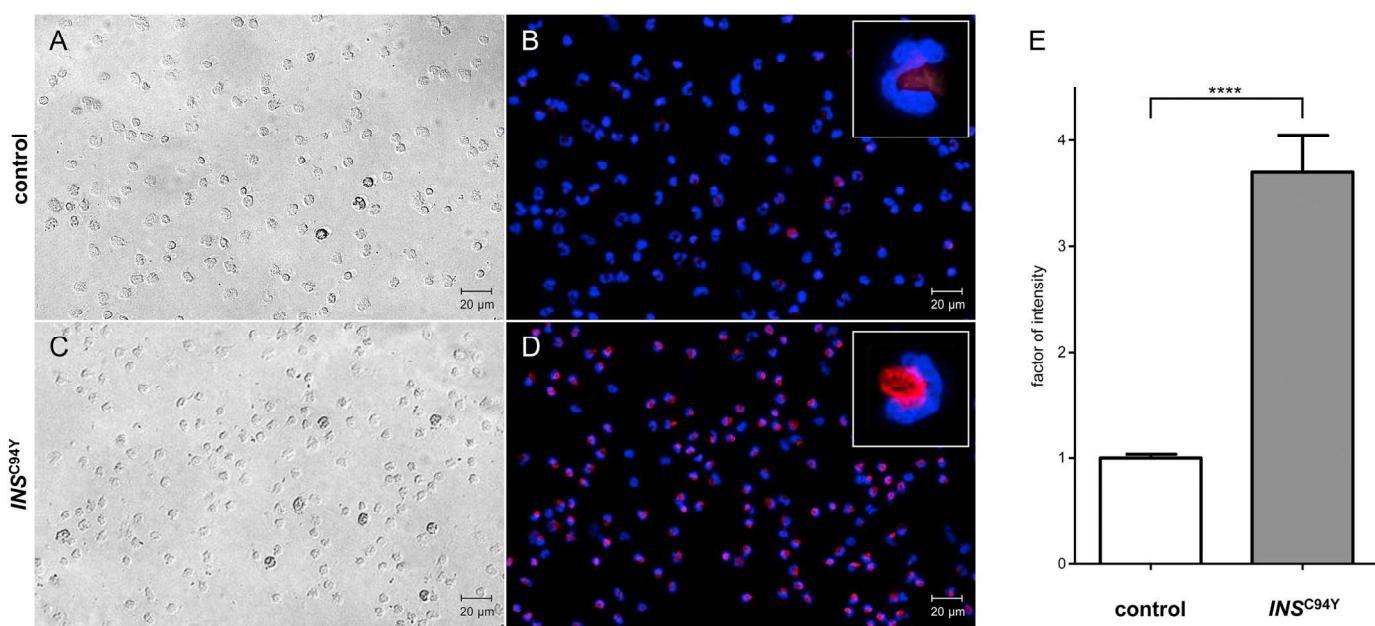
**Fig. 2.** Volcano plot of the 2371 proteins identified by differential proteome analysis. Candidates with significant ( $p < .05$ ) fold change (ratio  $> 2$ ) which were identified by at least two unique peptides are marked blue and labeled with their human orthologue gene name. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

more than four lobes (Supplementary Fig. 1). Therefore, our mass spectrometry data set represents the porcine proteome of 6D10-antigen positive neutrophils in the peripheral blood.

The protein with the highest statistically significant fold change in transgenic animals was subunit 2 of COP9 (SGN2, Fig. 2, Table 1). The ubiquitous, highly conserved eight-subunit protein complex COP9 signalosome (CSN) predominantly controls proteolysis via the ubiquitin-proteasome pathway by influencing the activity of cullin-RING ubiquitin ligases (CRLs) [29]. Recent findings identified SGN2 as binding

partner of the cofactor IP<sub>6</sub>, recruiting CRLs and thereby strengthening the CRL-CSN interaction [30]. CSN's contribution to regulatory processes in innate immune system is mediated by the universal transcription factor NF-κB, more precisely through the destabilization of its inhibitor IκBα [31]. Since bound IκBα masks the nuclear localization sequence of NF-κB, the complex remains in the cytosol of unstimulated cells [32]. Phosphorylation of the inhibitor by an IκB kinase (IKK) complex triggers IκBα ubiquitination by an active CRL and subsequent degradation by 26S-proteasome [29]. Requiring NEDDylated cullin for their active form, CRLs are inhibited by deNEDDylation via CSN leading to impeded induction of NF-κB target genes [29]. Increased NF-κB activity in type 1 diabetic patients was already described in various studies and different cells [33,34]. For instance, positive correlation of NF-κB activation with the quality of glycemic control (indicated by HbA1c) was demonstrated for peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) technique [33] and RT-PCR [35]. Although blood glucose levels of the *INS*<sup>C94Y</sup> transgenic animals were elevated over a period of several weeks [13], NF-κB abundance in neutrophils of the diabetic animals was slightly lower compared to control group in our dataset (ratio 0.9, Table 1), which needs further assessment.

Besides SGN2, a second protein related to NF-κB signaling was higher abundant in *INS*<sup>C94Y</sup> transgenic pigs. Gene product of C19orf43, a protein molecule first described in 2017 as interacting part of the human telomerase RNA and therefore named telomerase RNA interacting RNase (TRIR) [36], showed 3-fold higher abundance compared to neutrophils of control group (Fig. 2, Table 1). Although little is known about its exact function, Park et al. proved that overexpression of TRIR inhibits protein phosphatase 4 (PP4) activity in numerous cell lines [37]. By dephosphorylating its target substrates, PP4 is implicated in various cellular processes, such as stem cell development, glucose metabolism, cell migration and immune response [37]. Thus, PP4 inactivates the IKK complex and subsequently acts as negative regulator for NF-κB [38]. But also the opposite effect of PP4 on NF-κB signaling was proven, suggesting a multifaceted role of this phosphatase in cellular physiology [37]. This hypothesis is supported by the observation



**Fig. 3.** Immunofluorescence staining of PMN for myosin regulatory light chain 9. Representative images of a control (A, B) and an *INS*<sup>C94Y</sup> transgenic (C, D) pig are shown. Differential interference contrast (DIC) image of each slide is displayed on the left and the corresponding section as overlay of myosin regulatory light chain 9 (red) and nucleus (blue, counterstained with DAPI) on the right. Intracellular distribution of myosin regulatory light chain 9 was similar in both groups and restricted to a perinuclear region (enlarged section in B, D). Signal intensity of myosin regulatory light chain 9 was significantly (\*\*\*\* $p < .0001$ ) higher in *INS*<sup>C94Y</sup> transgenic pigs compared to controls (E). Bars represent means of 71 (control) and 51 (*INS*<sup>C94Y</sup>) single cell values of three (control), respectively two (*INS*<sup>C94Y</sup>) individuals. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

of Zhan et al. that PP4 suppressed virus-induced type I IFN production in peritoneal macrophages [39]. In reverse, higher abundance of physiological PP4-inhibitor exoribonuclease TRIR in neutrophils of *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs might be responsible for increasing IFN $\alpha$  levels. This cytokine recently emerged as a major trigger in the early state of type 1 diabetes generating an inflammatory milieu facilitating the diabetogenic adaptive immune response [40]. Although the diabetic condition of the studied animals was initiated by genetic engineering, our proteomic data nevertheless shows correlation to elevated IFNs, namely through identification of myxovirus resistance protein 1, a IFN-induced dynamin-like GTPase related to the interferon stimulated genes (ISGs) [41], which was 4-fold higher abundant in *INS<sup>C94Y</sup>* neutrophils compared to controls (Fig. 2, Table 1). Usually expression of ISGs increases as part of the antiviral immune defense mechanism [42,43]. High levels of myxovirus resistance protein 1 in *INS<sup>C94Y</sup>* neutrophils might therefore point to increased production and activation of type I IFNs through enhanced TLR signaling in early stage diabetes. However, its exact role in this context remains elusive and merits further investigations.

A further protein with increased abundance in *INS<sup>C94Y</sup>* neutrophils, advillin (ratio 2.1, Fig. 2, Table 1), belongs to the villin/gelsolin superfamily and contributes to filopodia formation, ciliogenesis and cell motility [44]. Experimental overexpression of advillin in podocytes and gelsolin in fibroblasts increases their migration rate [45,46], a phenomenon also described for gelsolin family-capping proteins in pancreatic cancer cells [47]. Accordingly, we would expect PMN of transgenic animals to show higher motility than cells of control pigs, which stands contradictory to the hypothesis of impaired immune cell function in diabetes mellitus, suggesting a two-faced role of the innate immune system in this disease. Resolving this contradiction requires functional testing of PMN in vitro by migration assays, which we aim to perform in future experiments.

In the present study, we focused on myosin regulatory light chain 9, subunit of nonmuscle myosin II (NMII), which was significantly increased in diabetic pigs compared to controls (Fig. 2, Table 1). NMII exists in almost all cell types and contributes to cell migration, adhesion, intracellular transport, organelle morphogenesis and actin cytoskeletal dynamics [48]. Phosphorylation of myosin regulatory light chain 9 by multiple kinases results in both enhanced ATPase activity of NMII and intensified association with actin filaments [49]. Higher expression of MYL9 was reported in skeletal muscle of myostatin-knockout pigs suspecting a regulative function in muscle energy metabolism [50]. The Human Proteome Atlas (<https://www.proteinatlas.org/> version 19.1) cites MYL9 with higher expression in neutrophils and eosinophils compared to other blood cell types [51]. Quantitative analysis of immunostaining with MYL9 antibody on unsorted PMN (Fig. 3) correlated with the results of mass spectrometry confirming higher abundance of myosin regulatory light chain 9 in neutrophils of diabetic *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs compared to wild type controls.

Higher expression of MYL9 related to diabetic condition was reported solely in gastric smooth muscle of mice and humans, where the meaning is still uncertain [52]. In the context of immune cell function, interaction of myosin regulatory light chain 9 with early activation marker CD69 promoted migration of T cells into inflamed lung tissue [53]. Thereby the authors obtained so called "MYL9 nets", extracellular structures released by platelets during activation inside of blood vessels [53]. Former proteomic work detected myosin regulatory light chain 3, but not myosin regulatory light chain 9 in secretory vesicles of neutrophil granulocytes [54]. The significantly higher abundance of myosin regulatory light chain 9 in neutrophils of diabetic pigs is a novel and interesting finding and deserves further investigation to clarify its functional relevance in our opinion. First pathway enrichment analyses with all identified proteins, divided into two groups (enriched vs. diminished in *INS<sup>C94Y</sup>*), revealed functional association of enriched *INS<sup>C94Y</sup>* PMN proteins to neutrophil degranulation (Supplementary Table 3). Ten of the 51 significantly differential abundant proteins in this study were linked to this biological process (Table 1), pointing to

an aberrant function of the innate immune system in the initial stage of diabetes in response to sustained hyperglycemia.

## 5. Conclusion

Our study provides novel information on the proteome of porcine neutrophil granulocytes in general and shows that significant changes can be detected in an initial stage of diabetes mellitus in a transgenic diabetic pig model. We gained insights into the differentiated reaction of neutrophil proteome to permanently elevated blood glucose levels. Further experiments are needed to elucidate the exact role of the different abundant candidates and especially myosin regulatory light chain 9 in the context of altered innate immune cell function in diabetes.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103843>.

## Author contributions

C.D. conceived and designed the experiment; M.W., C.D., B.A. and S.M.H. performed the experiments and analyzed the data; S.R. and E.W. contributed reagents, materials and analysis tools; M.W., R.D. and C.D. wrote the manuscript. All authors critically read the manuscript and approved the final version to be published.

## Funding

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft SPP project 2127 DFG DE 719/7-1 (to C.D.) and HA 6014/5-1 (to S.M.H.).

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgement

The authors would like to thank Carmen Wiedemann, Bernhard Hobmaier and Isabella Giese for critical discussions and for assistance in blood sampling.

## References

- [1] I.D.F, IDF Diabetes Atlas, International Diabetes Federation (IDF), Brüssel, 2019.
- [2] P. Saeedi, I. Petersohn, P. Salpea, B. Malanda, S. Karuranga, N. Unwin, S. Colagiuri, L. Guariguata, A.A. Motala, K. Ogurtsova, J.E. Shaw, D. Bright, R. Williams, I.D.F.D.A. Committee, Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 157 (2019) 107843.
- [3] A. Toniolo, G. Cassani, A. Puggioni, A. Rossi, A. Colombo, T. Onodera, E. Ferrannini, The diabetes pandemic and associated infections: suggestions for clinical microbiology, *Rev. Med. Microbiol.* 30 (1) (2019) 1–17.
- [4] J. Smit, M. Sogaard, H.C. Schonheyder, H. Nielsen, T. Froslev, R.W. Thomsen, Diabetes and risk of community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia: a population-based case-control study, *Eur. J. Endocrinol.* 174 (5) (2016) 631–639.
- [5] M. van der Linden, L. Meyارد, Fine-tuning neutrophil activation: strategies and consequences, *Immunol. Lett.* 178 (2016) 3–9.
- [6] N. de Buhr, M.C. Bonilla, M. Jimenez-Soto, M. von Kockritz-Blickwede, G. Dolz, Extracellular trap formation in response to *Trypanosoma cruzi* infection in granulocytes isolated from dogs and common opossums, natural reservoir hosts, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 966.
- [7] M. Casanova-Acebes, J.A. Nicolás-Ávila, J.L. Li, S. García-Silva, A. Balachander, A. Rubio-Ponce, L.A. Weiss, J.M. Adrover, K. Burrows, N. A-González, I. Ballesteros, S. Devi, J.A. Quintana, G. Crainicu, M. Leiva, M. Gunzer, C. Weber, T. Nagasawa, O. Soehnlein, M. Merad, A. Mortha, L.G. Ng, H. Peinado, A. Hidalgo, Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naïve tissues, *J. Exp. Med.* 215 (11) (2018) 2778–2795.
- [8] S. Kumar, M. Dikshit, Metabolic insight of neutrophils in health and disease, *Front. Immunol.* 10 (2019) 2099.
- [9] G. van Niekerk, C. Christowitz, D. Conradie, A.M. Engelbrecht, Insulin as an immunomodulatory hormone, *Cytokine Growth Factor Rev.* 52 (2019) 34–44.

- [10] G. van Niekerk, T. Davis, H.G. Patterson, A.M. Engelbrecht, How does inflammation-induced hyperglycemia cause mitochondrial dysfunction in immune cells? *Bioessays* 41 (5) (2019) e1800260.
- [11] S. Renner, B. Dobenecker, A. Blutke, S. Zols, R. Wanke, M. Ritzmann, E. Wolf, Comparative aspects of rodent and nonrodent animal models for mechanistic and translational diabetes research, *Theriogenology* 86 (1) (2016) 406–421.
- [12] S. Renner, A. Blutke, S. Clauss, C.A. Deeg, E. Kemter, D. Merkus, R. Wanke, E. Wolf, Porcine models for studying complications and organ crosstalk in diabetes mellitus, *Cell Tissue Res.* 380 (2020) 341–378.
- [13] S. Renner, C. Braun-Reichhart, A. Blutke, N. Herbach, D. Emrich, E. Streckel, A. Wunsch, B. Kessler, M. Kurome, A. Bahr, N. Klymiuk, S. Krebs, O. Puk, H. Nagashima, J. Graw, H. Blum, R. Wanke, E. Wolf, Permanent neonatal diabetes in INSC(94Y) transgenic pigs, *Diabetes* 62 (5) (2013) 1505–1511.
- [14] S.L. Wong, M. Demers, K. Martinod, M. Gallant, Y. Wang, A.B. Goldfine, C.R. Kahn, D.D. Wagner, Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing, *Nat. Med.* 21 (7) (2015) 815–819.
- [15] J. Soongsathitanon, W. Umsa-Ard, V. Thongboonkerd, Proteomic analysis of peripheral blood polymorphonuclear cells (PBMCs) reveals alteration of neutrophil extracellular trap (NET) components in uncontrolled diabetes, *Mol. Cell. Biochem.* 461 (1) (2019) 1–14.
- [16] J.M. Adrover, A. Aroca-Crevillen, G. Crainiciuc, F. Ostos, Y. Rojas-Vega, A. Rubio-Ponce, C. Cilloniz, E. Bonzon-Kulichenko, E. Calvo, D. Rico, M.A. Moro, C. Weber, I. Lizasoain, A. Torres, J. Ruiz-Cabello, J. Vazquez, A. Hidalgo, Programmed ‘disarming’ of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation, *Nat. Immunol.* 21 (2) (2020) 135–144.
- [17] J.M. Adrover, C. del Fresno, G. Crainiciuc, M.I. Cuartero, M. Casanova-Acebes, L.A. Weiss, H. Huerga-Encabo, C. Silvestre-Roig, J. Rossant, I. Cossío, A.V. Lechuga-Vieco, J. García-Prieto, M. Gómez-Parrizas, J.A. Quintana, I. Ballesteros, S. Martín-Salamanca, A. Aroca-Crevillen, S.Z. Chong, M. Evrard, K. Balabanian, J. López, K. Bidzhev, F. Bachelerie, F. Abad-Santos, C. Muñoz-Calleja, A. Zarbock, O. Soehnlein, C. Weber, L.G. Ng, C. Lopez-Rodriguez, D. Sancho, M.A. Moro, B. Ibáñez, A. Hidalgo, A neutrophil timer coordinates immune defense and vascular protection, *Immunity* 50 (2) (2019) 390–402 (e10).
- [18] A. Grosche, A. Hauser, M.F. Lepper, R. Mayo, C. von Toerne, J. Merl-Pham, S.M. Hauck, The proteome of young adult Muller glial cells from murine retina, *Mol. Cell. Proteomics* 15 (2) (2016) 462–480.
- [19] J. Singh, E. Kaade, J. Muntel, R. Bruderer, L. Reiter, M. Thelen, D. Winter, Systematic comparison of strategies for the enrichment of lysosomes by data independent acquisition, *J. Proteome Res.* 19 (1) (2020) 371–381.
- [20] S.J. Callister, R.C. Barry, J.N. Adkins, E.T. Johnson, W.J. Qian, B.J. Webb-Robertson, R.D. Smith, M.S. Lipton, Normalization approaches for removing systematic biases associated with mass spectrometry and label-free proteomics, *J. Proteome Res.* 5 (2) (2006) 277–286.
- [21] L. Reiter, O. Rinner, P. Picotti, R. Huppenhain, M. Beck, M.Y. Busniak, M.O. Hengartner, R. Aebersold, mProphet: automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments, *Nat. Methods* 8 (5) (2011) 430–435.
- [22] Y. Perez-Riverol, A. Csordas, J. Bai, M. Bernal-Llinares, S. Hewapathirana, D.J. Kundu, A. Inuganti, J. Griss, G. Mayer, M. Eisenacher, E. Perez, J. Uszkoreit, J. Pfeuffer, T. Sachsenberg, S. Yilmaz, S. Tiwary, J. Cox, E. Audain, M. Walzer, A.F. Jarnuzak, T. Ternent, A. Brazma, J.A. Vizcaino, The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data, *Nucleic Acids Res.* 47 (D1) (2019) D442–D450.
- [23] M.J. de Hoon, S. Imoto, J. Nolan, S. Miyano, Open source clustering software, *Bioinformatics* 20 (9) (2004) 1453–1454.
- [24] A. Fabregat, K. Sidiropoulos, G. Viteri, O. Forner, P. Marin-Garcia, V. Arnau, P. D'Eustachio, L. Stein, H. Hermjakob, Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach, *BMC Bioinform.* 18 (1) (2017) 142.
- [25] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (17) (1997) 3389–3402.
- [26] S.F. Altschul, J.C. Wootton, E.M. Gertz, R. Agarwala, A. Morgulis, A.A. Schaffer, Y.K. Yu, Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices, *FEBS J.* 272 (2005) 5101–5109.
- [27] S.S. Parikh, S.A. Litherland, M.J. Clare-Salzler, W. Li, P.A. Gulig, F.S. Southwick, CapG(−/−) mice have specific host defense defects that render them more susceptible than CapG(+/+) mice to *Listeria monocytogenes* infection but not to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection, *Infect. Immun.* 71 (11) (2003) 6582–6590.
- [28] C. Perez, C. Revilla, B. Alvarez, S. Chamorro, C. Correa, N. Domenech, F. Alonso, A. Ezquerro, J. Dominguez, Phenotypic and functional characterization of porcine granulocytic development stages using two new markers, *Dev. Comp. Immunol.* 31 (3) (2007) 296–306.
- [29] G.A. Cope, R.J. Deshaies, COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases, *Cell* 114 (6) (2003) 663–671.
- [30] H. Lin, X. Zhang, L. Liu, Q. Fu, C. Zang, Y. Ding, Y. Su, Z. Xu, S. He, X. Yang, X. Wei, H. Mao, Y. Cui, Y. Wei, C. Zhou, L. Du, N. Huang, N. Zheng, T. Wang, F. Rao, Basis for metabolite-dependent Cullin-RING ligase deneddylation by the COP9 signalosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117 (8) (2020) 4117–4124.
- [31] K. Schweitzer, M. Naumann, Control of NF-κappaB activation by the COP9 signalosome, *Biochem. Soc. Trans.* 38 (Pt 1) (2010) 156–161.
- [32] T.T. Huang, N. Kudo, M. Yoshida, S. Miyamoto, A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalphab controls cytoplasmic localization of inactive NF-κappaB/IkappaBalphab complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (3) (2000) 1014–1019.
- [33] M.A. Hofmann, S. Schiekofer, B. Isermann, M. Kanitz, M. Henkels, M. Joswig, A. Treusch, M. Morcos, T. Weiss, V. Borcea, A.K. Abdel Khalek, J. Amirali, H. Tritschler, E. Ritz, P. Wahl, R. Ziegler, A. Bierhaus, P.P. Nawroth, Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-κappaB, *Diabetologia* 42 (2) (1999) 222–232.
- [34] J. Trinanes, E. Salido, J. Fernandez, M. Rufino, J.M. Gonzalez-Posada, A. Torres, D. Hernandez, Type 1 diabetes increases the expression of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in the artery wall of candidate patients for kidney transplantation, *Diabetes Care* 35 (2) (2012) 427–433.
- [35] A. Bierhaus, S. Schiekofer, M. Schwaninger, M. Andrassy, P.M. Humpert, J. Chen, M. Hong, T. Luther, T. Henle, I. Klöting, M. Morcos, M. Hofmann, H. Tritschler, B. Weigel, M. Kasper, M. Smith, G. Perry, A.M. Schmidt, D.M. Stern, H.U. Haring, E. Schleicher, P.P. Nawroth, Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-κappaB, *Diabetes* 50 (12) (2001) 2792–2808.
- [36] J. Xie, Z. Chen, X. Zhang, H. Chen, W. Guan, Identification of an RNase that preferentially cleaves A/G nucleotides, *Sci. Rep.* 7 (2017) 45207.
- [37] J. Park, J. Lee, D.H. Lee, Identification of protein phosphatase 4 inhibitory protein that plays an indispensable role in DNA damage response, *Mol. Cells* 42 (7) (2019) 546–556.
- [38] M. Brechmann, T. Mock, D. Nickles, M. Kiessling, N. Weit, R. Breuer, W. Müller, G. Wabnitz, F. Frey, J.P. Nicolay, N. Booken, Y. Samstag, C.D. Klemke, M. Herling, M. Boutros, P.H. Krammer, R. Arnold, A PP4 holoenzyme balances physiological and oncogenic nuclear factor-κappa B signaling in T lymphocytes, *Immunity* 37 (4) (2012) 697–708.
- [39] Z. Zhan, H. Cao, X. Xie, L. Yang, P. Zhang, Y. Chen, H. Fan, Z. Liu, X. Liu, Phosphatase PP4 negatively regulates type I IFN production and antiviral innate immunity by dephosphorylating and deactivating TBK1, *J. Immunol.* 195 (8) (2015) 3849–3857.
- [40] A. Lombardi, E. Tsomos, S.S. Hammerstad, Y. Tomer, Interferon alpha: the key trigger of type 1 diabetes, *J. Autoimmun.* 94 (2018) 7–15.
- [41] G.R. Stark, I.M. Kerr, B.R. Williams, R.H. Silverman, R.D. Schreiber, How cells respond to interferons, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 227–264.
- [42] H.K. Chung, J.H. Lee, S.H. Kim, C. Chae, Expression of interferon-alpha and Mx1 protein in pigs acutely infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), *J. Comp. Pathol.* 130 (4) (2004) 299–305.
- [43] O. Haller, P. Staeheli, M. Schwemmlé, G. Kochs, Mx GTPases: dynamin-like anti-viral machines of innate immunity, *Trends Microbiol.* 23 (3) (2015) 154–163.
- [44] P. Silacci, L. Mazzolai, C. Gauci, N. Stergiopoulos, H.L. Yin, D. Hayoz, Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (19–20) (2004) 2614–2623.
- [45] J. Rao, S. Ashraf, W. Tan, A.T. van der Ven, H.Y. Gee, D.A. Braun, K. Feher, S.P. George, A. Esmaeilniakooshghazi, W.I. Choi, T. Jobst-Schwan, R. Schneider, J.M. Schmidt, E. Widmeier, J.K. Warejko, T. Hermle, D. Schapiro, S. Lovric, S. Shril, A. Daga, A. Nayir, M. Shenoy, Y. Tse, M. Bald, U. Helmchen, S. Mir, A. Berdeli, J.A. Kari, S. El Desoky, N.A. Soliman, A. Bagga, S. Mane, M.A. Jairajpuri, R.P. Lifton, S. Khurana, J.C. Martins, F. Hildebrandt, Advillin acts upstream of phospholipase C 1 in steroid-resistant nephrotic syndrome, *J. Clin. Invest.* 127 (12) (2017) 4257–4269.
- [46] C.C. Cunningham, T.P. Stossel, D.J. Kwiatkowski, Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin, *Science* 251 (4998) (1991) 1233–1236.
- [47] C.C. Thompson, F.J. Ashcroft, S. Patel, G. Saraga, D. Vimalachandran, W. Prime, F. Campbell, A. Dodson, R.E. Jenkins, N.R. Lemoine, T. Crnogorac-Jurcevic, H.L. Yin, E. Costello, Pancreatic cancer cells overexpress gelsolin family-capping proteins, which contribute to their cell motility, *Gut* 56 (1) (2007) 95–106.
- [48] M. Vicente-Manzanares, X. Ma, R.S. Adelstein, A.R. Horwitz, Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (11) (2009) 778–790.
- [49] R.S. Adelstein, M. Anne Conti, Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity, *Nature* 256 (5518) (1975) 597–598.
- [50] X. Li, S. Xie, L. Qian, C. Cai, H. Bi, W. Cui, Identification of genes related to skeletal muscle growth and development by integrated analysis of transcriptome and proteome in myostatin-edited Meishan pigs, *J. Proteome* 213 (2020) 103628.
- [51] P.J. Thul, L. Akesson, M. Wiklund, D. Mahdessian, A. Geladaki, H. Ait Blal, T. Alm, A. Asplund, L. Bjork, L.M. Breckels, A. Backstrom, F. Danielsson, L. Fagerberg, J. Fall, L. Gatto, C. Gnann, S. Hober, M. Hjelmare, F. Johansson, S. Lee, C. Lindskog, J. Mulder, C.M. Mulvey, P. Nilsson, P. Oksvold, J. Rockberg, R. Schutten, J.M. Schwenk, A. Sivertsson, E. Sjostedt, M. Skogs, C. Stadler, D.P. Sullivan, H. Tegel, C. Winsnes, C. Zhang, M. Zwahlen, A. Mardinoglu, F. Ponten, K. von Feilitzen, K.S. Lilley, M. Uhlen, E. Lundberg, A subcellular map of the human proteome, *Science* 356 (6340) (2017).
- [52] W. Li, K.C. Sasse, Y. Bayguinov, S.M. Ward, B.A. Perrino, Contractile protein expression and phosphorylation and contractility of gastric smooth muscles from obese patients and patients with obesity and diabetes, *J. Diabetes Res.* 2018 (2018) 8743874.
- [53] M.Y. Kimura, K. Hayashizaki, K. Tokoyoda, S. Takamura, S. Motohashi, T. Nakayama, Crucial role for CD69 in allergic inflammatory responses: CD69-Myl9 system in the pathogenesis of airway inflammation, *Immunol. Rev.* 278 (1) (2017) 87–100.
- [54] S. Rørvig, O. Østergaard, N.H.H. Heegaard, N. Borregaard, Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors, *J. Leukoc. Biol.* 94 (4) (2013) 711–721.

## 4 PUBLIKATION II

### Title

Deviant proteome profile of equine granulocytes associates to latent activation status in organ specific autoimmune disease

### Autoren

**Maria Weigand**, Stefanie M. Hauck, Cornelia A. Deeg, Roxane L. Degroote

### Journal

Journal of Proteomics

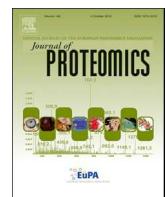
### Status

Publiziert.

Journal of Proteomics (**2020**): 103989; doi: 10.1016/j.jprot.2020.103989  
Epub 2020 September 23

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874391920303572>





## Deviant proteome profile of equine granulocytes associates to latent activation status in organ specific autoimmune disease



Maria Weigand<sup>a</sup>, Stefanie M. Hauck<sup>b</sup>, Cornelia A. Deeg<sup>a</sup>, Roxane L. Degroote<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Chair of Physiology, Department of Veterinary Sciences, LMU, Munich, Germany

<sup>b</sup> Research Unit Protein Science, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health GmbH, Germany

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Equine recurrent uveitis (ERU)  
Autoimmune uveitis  
Innate immune cell  
Calgranulin B  
Neutrophil degranulation

### ABSTRACT

Equine recurrent uveitis (ERU) is a spontaneous, remitting-relapsing autoimmune disease driven by the adaptive immune system. Although T cells are described as the main effector cells in pathogenesis, granulocytes have also emerged as possible disease mediators. To explore the role of these innate immune cells, we investigated the whole cell proteome of granulocytes from equine recurrent uveitis cases and healthy controls. Among the 2362 proteins identified by mass spectrometry, we found 96 proteins with significantly changed abundance between groups ( $p < 0.05$ , fold change  $> 1.2$ ), representing 4.1% of total granulocyte proteome. Within these differential identifications, calgranulin B, a protein associated with pathogenesis in other autoimmune diseases, showed highest abundance in equine recurrent uveitis (18 fold).

For a better interpretation of the results from our hypothesis-generating approach, we added a threshold for biological significance (ratio ERU/controls  $> 2$ : 36 proteins) to the proteins with increased abundance in equine recurrent uveitis and analyzed their allocation to the subsets within the Immune System superpathway. The 36 differentially abundant proteins predominantly associated to RAF/MAP kinase cascade, MHC-I-mediated antigen presentation and neutrophil degranulation, suggesting a latently activated phenotype of these innate immune cells in disease. Raw data are available via ProteomeXchange with identifier [PXD013648](#).

**Significance:** Our study provides new insights into the protein repertoire of primary equine granulocytes and identifies protein abundance changes associated to equine recurrent uveitis (ERU), an organ specific, spontaneously occurring autoimmune disease. We show that granulocyte proteins with increased abundance in ERU strongly associate to RAF/MAP kinase signaling, MHC-I antigen presentation and neutrophil degranulation, pointing to a more activated state of these cells in ERU cases. Since cells were obtained in quiescent stage of disease, latent activation of granulocytes underlines the role of these innate immune cells in ERU.

These findings are highly relevant for veterinary medicine, further establishing the importance of granulocytes in this T cell-driven autoimmune disease. Moreover, they have translational quality for autoimmune uveitis in man, due to strong similarity in disease occurrence, progression and pathogenesis.

### 1. Introduction

Granulocytes are highly effective cells of the innate immune system, with a broad spectrum of functionality and a finely tuned response to various stimuli [1,2]. Alterations in the cell – whether morphologic or functional – are mirrored in the cell's proteome and secretome [3,4]. In disease, these changes may give deeper insight into pathogenesis [4–6]. This helps to understand the molecular mechanisms involved, especially by filtering proteins with possible biological relevance and comparing the occurring changes to the proteome in non-diseased state.

In this context, we investigated the granulocyte proteome in equine recurrent uveitis (ERU), an autoimmune disease that affects horses

worldwide, with spontaneously occurring, painful remitting-relapsing bouts of intraocular inflammation, alternating with periods of quiescence, in which inflammation of the eye temporarily ceases [7–9]. Not only is ERU of great interest for veterinary medicine, it is also the only non-induced model for relapsing autoimmune uveitis in man [9,10]. Both diseases are currently believed to be driven mainly by cells of the adaptive immune system, particularly T cells [11–17]. These cells manage to overcome the blood retina barrier (BRB) and, with each inflammatory attack, progressively cause irreversible intraocular damage. Since this damage primarily affects the retina, ERU eventually leads to blindness [18–21].

T cells show an altered proteome in ERU [22–24] and these protein

\* Corresponding author.

E-mail address: [r.degroote@lmu.de](mailto:r.degroote@lmu.de) (R.L. Degroote).

changes associate to higher deformability and enhanced migration ability [25], promoting translocation from periphery over the BRB into the eye. Despite the key role of the adaptive immune system in autoimmune uveitis, evidence exists for involvement of innate immune cells in pathogenesis of autoimmune uveitis, as granulocytes have also been found in uveitic eyes of experimental rodent models [26–29] and horses with ERU [30]. In contrast to adaptive immunity, the role of innate immune cells in autoimmune uveitis was not investigated as extensively. Considering the evolving knowledge on granulocyte function and their proven presence in uveitic eyes, however, the involvement of these cells in the pathogenesis of autoimmune uveitis merits more in-depth investigations.

Within this framework, previous studies from our group already pointed to involvement of components of the innate immune system in ERU, particularly through a more activated complement system, and suggested a critical role for macrophages [31]. In addition, we could already show that low-density neutrophils (LDN) change their protein repertoire in ERU, with talin 1 and CD90 as key players in disease pathogenesis [32,33]. However, the population investigated in these studies were a mix of LDN and lymphocytes [32,33]. In the present study, we used a pure granulocyte fraction from peripheral equine blood to assess possible differences in the whole-cell proteome between healthy and diseased state. Using this hypothesis-generating proteomics approach, our aim was to better understand the role of granulocytes in autoimmune diseases driven by adaptive immunity and gain deeper insights in molecular processes contributing to relapsing autoimmune uveitis.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sample preparation

Primary granulocytes from heparinized (50 I.U./ml blood, Ratiopharm, Ulm, Germany) venous whole blood of three healthy horses and three ERU cases were used in this study. The healthy horses (Haflinger and two warmbloods, aged 12, 20 and 21) are stalled in the LMU Munich equine clinic and are at the students' disposal for supervised ultrasound- and health assessment training. Horses with ERU (all warmbloods, aged 6, 8 and 11) were patients awaiting therapeutic procedure in the LMU Munich equine clinic. ERU was diagnosed by experienced clinicians from the LMU Munich equine clinic and was based on typical clinical signs of uveitis along with a documented history of multiple episodes of inflammation of the affected eye [34]. At the time of blood withdrawal ERU horses were in quiescent stage of disease. No experimental animals were used in this study. Horses were treated according to the ethical principles and guidelines for scientific experiments on animals according to the ARVO statement for the use of animals in Ophthalmic and Vision research. Collection of blood was permitted by the local authority (Regierung von Oberbayern, Permit number: ROB-55.2Vet-2532.Vet\_03-17-88).

After rough sedimentation of erythrocytes, granulocytes were isolated from plasma by density gradient centrifugation (room temperature, 350 x g, 25 min, brake off) with Ficoll-Paque PLUS separating solution (density 1.077 g/ml; Cytiva, Freiburg, Germany). The resulting interphase, containing PBMC, was discarded, cells at the bottom of the tube were carefully washed (4 °C, 400 x g, 10 min) in cold PBS (DPBS devoid of CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>; Gibco / ThermoFisher Scientific, Germany) and remaining erythrocytes were removed by 30 s sodium chloride (0.2% NaCl) lysis. Isotonicity of samples was restored through addition of equal parts 1.6% NaCl. Granulocytes were then washed (4 °C, 400 x g, 10 min) and resuspended in PBS with 0.2% glucose. From each animal used in the experiment, 6 × 10<sup>5</sup> granulocytes were pelleted (4 °C, 2300 x g, 10 min) and stored at -20 °C. Prior to mass spectrometry analysis, granulocytes were thawed and lysed in urea buffer (8 M urea in 0.1 M Tris/HCl pH 8.5), and protein concentration was determined with Bradford protein assay [35].

### 2.2. Mass spectrometry analysis

From each sample, 10 µg total protein was digested with LysC and trypsin by filter-aided sample preparation (FASP) as previously described [36]. Acidified eluted peptides were analyzed in the data-dependent mode on a Q Exactive HF mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) online coupled to a UltiMate 3000 RSLC nano-HPLC (Dionex). Samples were automatically injected and loaded onto the C18 trap column, eluted after 5 min and separated on the C18 analytical column (75 µm IDx15 cm, Acclaim PepMAP 100 C18, 100 Å/size, LC Packings, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) by a 90 min non-linear acetonitrile gradient at a flow rate of 250 nL/min. MS spectra were recorded at a resolution of 60,000. After each MS1 cycle, the 10 most abundant peptide ions were selected for fragmentation.

### 2.3. Data Processing – Protein Identification

Proteome Discoverer 2.4 software (Thermo Fisher Scientific; version 2.4.1.15) was used for peptide and protein identification via a database search (Sequest HT search engine) against Ensembl horse database (version 3.0, <http://www.ensembl.org>), considering full tryptic specificity, allowing for one missed tryptic cleavage site, with precursor mass tolerance 10 ppm, and fragment mass tolerance 0.02 Da. Carbamidomethylation of Cys was set as a static modification. Dynamic modifications included deamidation of Asn, Gln and Arg, oxidation of Pro and Met; and a combination of Met loss with acetylation on protein N-terminus. Percolator [37] was used for validating peptide spectrum matches and peptides, accepting only the top-scoring hit for each spectrum, and satisfying the cutoff values for FDR < 1%, and posterior error probability < 0.01. The final list of proteins complied with the strict parsimony principle.

### 2.4. Data Processing – Label-free Quantification

The quantification of proteins, after precursor recalibration, was based on abundance values (area under curve) for unique plus razor peptides. Abundance values were normalized to the total peptide amount to account for sample load errors. The protein abundances were calculated summing the abundance values for admissible peptides. The final protein ratio was calculated using median abundance values of three biological replicates per group. The statistical significance of the ratio change was ascertained with ANOVA, *p*-values < 0.05 indicating statistically significant fold changes. In the hypothesis-generating approach, no ratio cutoff for protein abundance differences was set. For biological relevance, threshold was subsequently set at 2.

### 2.5. Data availability

The raw mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [38] partner repository with the dataset identifier [PXD013648](https://doi.org/10.6019/PXD013648).

### 2.6. Data analysis

Pathway analysis was performed on human orthologues of gene names from the 96 differentially expressed equine proteins with open-source Reactome database v72 <http://www.reactome.org> [39,40]. For over-representation and pathway-topology analysis, protein input lists were inserted into the analysis tool and subsequently mapped to pathways. These pathways were then displayed as Thiessen polygons in a Voronoi diagram. Here, pathways with assigned proteins from the input list were highlighted in color, and color intensity displays *p*-value of the statistical test for over-representation. Hence, intensely colored areas represent strong over-representation of pathways associated to protein input list, whereas white areas represent pathways with no assigned proteins.

**Table 1**

All identifications from mass spectrometry dataset with statistically significant ( $p < 0.05$ ) abundance changes. (a) Protein names as listed in Ensembl protein database v3.0 (<http://www.ensembl.org>). (b) Human orthologues of horse gene names. (c) Protein accession numbers as listed in Ensembl horse database v3.0. (d) Fold change of protein abundance differences in ERU compared to controls. (e) Statistical significance of protein abundance differences ascertained with ANOVA. (f) Peptides that do not occur in other proteins. (g) Number of identified peptide spectrum matches identified from all included searches, including those redundantly identified.

Description <sup>a</sup>	Gene Symbol <sup>b</sup>	Protein ID <sup>c</sup>	Ratio (ERU/ healthy) <sup>d</sup>	p-value <sup>e</sup>	Unique Peptides <sup>f</sup>	Peptide-Spectrum Matches <sup>g</sup>
<b>UP in ERU</b>						
Protein S100-A9	S100A9	ENSECAP0000008461	18,8	0,005	1	443
Methylthioribose-1-phosphate isomerase 1	MRI1	ENSECAP0000008708	17,3	0,018	3	4
ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2	AGAP2	ENSECAP0000021561	10,8	0,041	2	4
Immunoglobulin superfamily, member 6	IGSF6	ENSECAP0000015774	9,8	0,029	1	3
Chloride channel, voltage-sensitive 7	CLCN7	ENSECAP0000021068	6,6	0,016	2	3
Anthrax toxin receptor 2	ANTXR2	ENSECAP0000016060	5,4	0,001	4	9
Saccharopine dehydrogenase	SCCPDH	ENSECAP0000018599	5,3	0,034	1	2
Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	ISG20	ENSECAP0000016987	4,7	0,026	3	14
Charged multivesicular body protein 6	CHMP6	ENSECAP0000010785	4,2	0,025	1	3
Transmembrane emp24 protein transport domain containing 9	TMED9	ENSECAP0000013005	3,7	0,001	1	6
Dicarbonyl/L-xylulose reductase	DCXR	ENSECAP0000007861	3,3	0,032	4	12
Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	KRAS	ENSECAP0000015048	3,1	0,042	2	13
RAB21, member RAS oncogene family	RAB21	ENSECAP0000004550	2,8	0,044	5	33
Trafficking protein particle complex 9	TRAPP9	ENSECAP0000023045	2,8	0,037	2	3
Lymphocyte antigen 96	LY96	ENSECAP0000015094	2,7	0,010	1	1
Cyclin G associated kinase	GAK	ENSECAP0000021619	2,7	0,028	5	12
Serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	SHMT2	ENSECAP0000019017	2,7	0,001	1	8
Subunit of the oligosaccharyltransferase complex (catalytic)	STT3B	ENSECAP0000005358	2,7	0,047	2	7
Aminomethyltransferase	AMT	ENSECAP0000010169	2,5	0,023	2	4
RAP1A, member of RAS oncogene family	RAP1A	ENSECAP0000014122	2,5	0,046	2	84
Diacylglycerol lipase, beta	DAGLB	ENSECAP0000011045	2,5	0,020	5	8
Eosinophil peroxidase	EPX	ENSECAP0000015423	2,5	0,002	29	508
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1	NDUFS1	ENSECAP0000013490	2,5	0,049	3	6
Nucleoporin 62kDa	NUP62	ENSECAP0000004267	2,4	0,017	2	5
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	PTPRC	ENSECAP0000006018	2,4	0,015	46	372
Alpha-1B glycoprotein	A1BG	ENSECAP0000013223	2,4	0,010	7	21
Proteasome 26S subunit, ATPase, 2	PSMC2	ENSECAP0000014588	2,3	0,010	10	40
Epidermal growth factor receptor substrate 15	EPS15	ENSECAP0000018799	2,3	0,037	11	25
Plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	ENSECAP0000019648	2,3	0,009	1	7
ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 4	ATP2B4	ENSECAP0000004686	2,2	0,037	1	14
Complement C3	C3	ENSECAP0000016864	2,2	0,024	16	850
Vesicle transport protein GOT1B-like protein	GOLT1B	ENSECAP0000011685	2,1	0,008	1	4
Mago-nashi homolog B	MAGOHB	ENSECAP0000023027	2,1	0,029	2	5
Family with sequence similarity 65, member B	FAM65B	ENSECAP0000009696	2,1	0,027	7	20
Arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	ENSECAP0000010967	2,1	0,011	25	270
COP9 signalosome subunit 6	COPS6	ENSECAP0000007091	2,1	0,049	5	8
V-ral simian leukemia viral oncogene homolog B	RALB	ENSECAP0000012317	2,0	0,033	3	38
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PDH	ENSECAP0000002648	2,0	0,017	2	36
CD177	CD177	ENSECAP0000013488	1,9	0,039	3	118
Matrix metallopeptidase 9	MMP9	ENSECAP0000011232	1,8	0,032	32	1038
Complement C3	C3	ENSECAP0000005652	1,8	0,020	20	832
Sulfide quinone oxidoreductase	SQOR	ENSECAP0000007030	1,8	0,022	12	55
RAS homolog family member G	RHOG	ENSECAP0000020368	1,7	0,029	7	110
Chitinase 3-like 1	CHI3L1	ENSECAP0000009565	1,7	0,010	10	39
Small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide	SNRPD3	ENSECAP0000020731	1,6	0,017	3	20
Proteinase 3	PRTN3	ENSECAP0000007555	1,6	0,012	5	429
Suppressor of G2 allele of SKP1	SUGT1	ENSECAP0000010916	1,6	0,034	4	11
RAS-Related Protein RAB-18	RAB18	ENSECAP0000015187	1,6	0,018	5	16
Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 2	SERPINE2	ENSECAP0000013972	1,6	0,006	7	33
Proteasome subunit, alpha type, 7	PSMA7	ENSECAP0000011982	1,6	0,045	5	37
5'-nucleotidase domain containing 1	NT5DC1	ENSECAP0000017364	1,6	0,046	15	61
Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13	DNAJC13	ENSECAP0000019484	1,5	0,029	37	89
Proteasome subunit, beta type, 2	PSMB2	ENSECAP0000019124	1,5	0,012	5	9
N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, gamma	NAPG	ENSECAP0000011059	1,5	0,043	3	10
Retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive)	RP2	ENSECAP0000008293	1,5	0,040	10	48
Prohibitin	PHB	ENSECAP0000015308	1,5	0,039	3	11
Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)	ITGAM	ENSECAP0000016034	1,5	0,025	35	477
Stromal antigen 2	STAG2	ENSECAP0000019047	1,5	0,019	5	16
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7	GNG7	ENSECAP0000009515	1,5	0,005	3	22
Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1	ENSECAP0000008115	1,5	0,049	17	232
Acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	ACADM	ENSECAP0000018743	1,4	0,045	9	30
Annexin A2	ANXA2	ENSECAP0000011087	1,4	0,005	25	582
Phosphatidylinositol transfer protein, beta	PITPNB	ENSECAP0000008312	1,4	0,049	3	10
Proteasome 26S subunit, non-ATPase, 7	PSMD7	ENSECAP0000017866	1,3	0,016	5	19
Proteasome 26S subunit, non-ATPase, 1	PSMD1	ENSECAP0000006869	1,3	0,018	12	42
Cullin-associated and neddylation-dissociated 1	CAND1	ENSECAP0000011452	1,2	0,008	24	98

**Table 1** (continued)

Peptidyl arginine deiminase, type IV	PADI4	ENSECAP0000009139	1,2	0,021	24	375
Proteasome 26S subunit, non-ATPase, 5	PSMD5	ENSECAP0000011473	1,2	0,003	17	94
Calpain 1, large subunit	CAPN1	ENSECAP0000022988	1,2	0,009	33	217
Glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial	GOT2	ENSECAP0000014550	1,2	0,046	11	56
<b>DOWN in ERU</b>						
Creatine kinase	CKB	ENSECAP0000007023	0,03	0,002	7	21
Fucosidase, alpha-L- 2	FUCA2	ENSECAP0000004738	0,1	0,017	3	9
Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2	PRPSAP2	ENSECAP0000013239	0,1	0,014	2	3
Polysaccharide biosynthesis domain containing 1	PBDC1	ENSECAP0000007889	0,1	0,011	2	3
Acyl-coenzyme A thioesterase 1	ACOT1	ENSECAP0000007897	0,1	0,009	3	12
Multimerin 1	MMRN1	ENSECAP0000009646	0,1	0,040	18	37
Triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1	TREML1	ENSECAP0000010371	0,1	0,043	3	8
Integrin, alpha 2b	ITGA2B	ENSECAP0000018227	0,2	0,039	21	115
Lambda-immunoglobulin, partial	IGLC7	ENSECAP0000003384	0,2	0,004	3	6
Ribonucleic acid export 1	RAE1	ENSECAP0000013857	0,3	0,026	2	2
BRICK1, SCAR/WAVE actin-nucleating complex subunit	BRK1	ENSECAP0000015488	0,4	0,032	3	6
Vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1A	VT11A	ENSECAP0000010665	0,4	0,013	1	1
Actin filament associated protein 1-like 2	AFAP1L2	ENSECAP0000012801	0,4	0,038	1	1
Fermitin family member 3	FERMT3	ENSECAP0000006635	0,4	0,003	27	159
KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 1	KDELR1	ENSECAP0000010599	0,5	0,019	1	1
Zinc finger homeobox 4	ZFHX4	ENSECAP0000020049	0,5	0,023	1	1
Aldolase C, fructose-bisphosphate	ALDOC	ENSECAP0000011062	0,5	0,007	10	166
N-ethylmaleimide-sensitive factor	NSF	ENSECAP0000008826	0,5	0,009	9	19
Cathepsin Z	CTSZ	ENSECAP0000022537	0,6	0,026	6	33
Transportin 1	TNPO1	ENSECAP0000022136	0,6	0,039	9	27
Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	IMPA1	ENSECAP0000020565	0,7	0,005	6	18
Glutaredoxin 3	GLRX3	ENSECAP0000000200	0,7	0,033	5	11
6-phosphogluconolactonase	PGLS	ENSECAP0000008291	0,7	0,049	10	80
Arrestin, beta 2	ARRB2	ENSECAP0000016707	0,7	0,030	12	81
Platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1	PAFAH1B1	ENSECAP0000012312	0,8	0,042	6	20
Archain 1	ARCN1	ENSECAP0000017516	0,8	0,050	15	70

Volcano plot was created using GraphPad Prism Software version 5.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### 3. Results

#### 3.1. The equine granulocyte proteome is represented by 2362 identified proteins and deviates in ERU

From our samples, we identified a total of 2362 proteins characterizing the equine granulocyte proteome (Supplementary Table 1). Differential proteome analysis revealed 96 proteins with significant ( $p < 0.05$ ) abundance differences between healthy animals group and ERU cases (Table 1). In detail, 26 proteins were lower abundant in ERU whereas 70 proteins showed higher abundance compared to controls. These changes represented 4.1% of the total equine granulocyte proteome, providing a first hint on altered condition of these circulating immune cells in ERU.

#### 3.2. Over-represented pathway profile of all high abundant ERU proteins allocates to NF- $\kappa$ B signaling, neutrophil degranulation and antigen presentation

For our hypothesis-generating approach, we used these significantly differing proteins to perform pathway enrichment analysis via Reactome software (Supplementary Fig. 1, Supplementary Table 2). We compared pathways allocated to higher abundant proteins from ERU granulocytes with pathways associated to the lower abundant proteins in ERU. Clear differences in pathway enrichment were evident in the Immune System superpathway (Fig. 1). The 26 lower abundant proteins in ERU were allocated to 15 immune system related pathways in total (Fig. 1A), with two of these identified as over-represented (Fig. 1A, blue polygons; Table 2, "down in ERU"). The 70 proteins with increased abundance in ERU, on the other hand, associated to a total of 42

immune system pathways (Fig. 1B), of which 20 were over-represented (Fig. 1B, green polygons; Table 2, "up in ERU"). The latter covered all three major subsets of the Immune System superpathway (Innate Immune System, Adaptive Immune System, Cytokine Signaling in Immune System) and were predominantly related to NF- $\kappa$ B signaling, neutrophil degranulation and antigen presentation and cross-presentation (Table 2, "up in ERU"). Proteins with significantly decreased abundance in ERU, on the other hand, yielded association to over-represented pathways describing mostly regulatory processes, including pathway "Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell" (Table 2, "down in ERU").

#### 3.3. Proteins with $> 2$ fold increased abundance in ERU predominantly associate to superordinate pathways MHC-I-mediated antigen presentation, RAF/MAP kinase cascade and neutrophil degranulation

To get a deeper insight into detected pathway-allocation differences in the context of autoimmune uveitis, we next focused on the proteins with biologically relevant fold changes (ratio ERU/healthy  $> 2$ , Fig. 2) and the over-represented pathways they were assigned to by reactome analysis (Table 3).

Due to the essential function of protein degradation in numerous cellular processes, subunit ATPase 2 as part of the multiprotein complex 26S proteasome (PSMC2) was related to almost all pathways (Table 3).

Four of the significantly higher abundant proteins were assigned to the immune system pathway "Class I MHC mediated antigen processing & presentation". Two of these proteins, namely chloride channel voltage-sensitive 7 (CLCN7) and epidermal growth factor receptor substrate 15 (EPS15), were exclusively found in respective MHC-I pathway (Table 3, yellow). The same number of proteins was allocated to RAF/MAP kinase cascade, with aminomethyltransferase (AMT) mapped solely to this pathway in immune system (Table 3, light blue).

The majority of the proteins with significantly increased abundance in ERU granulocytes, however, was assigned to the innate immune

system pathway neutrophil degranulation (Table 3, magenta), indicating an outstanding role of this fundamental granulocyte function in ERU. Interestingly, protein S100A9 (calgranulin B), displayed the highest fold change (18.8 fold) and was not associated to other sections of the immune system pathways analyzed here (Table 3, magenta). Moreover, calgranulin B also showed highest ratio among all 96 statistically significant abundance differences observed in our study (Table 1).

#### 4. Discussion

With our study, we provide a proteomic and functional characterization of granulocytes in a T cell-driven, organ-specific autoimmune disease in horses, equine recurrent uveitis (ERU). Although experimental autoimmune uveitis (EAU) studies in rodent models could already show early ocular influx of granulocytes [26–29,41,42], the exact function of these cells in onset and course of disease, however, remains elusive. In contrast to these EAU models, investigations explicitly focusing on granulocytes in the context of ERU are scarce to date. Recent research shows that neutrophil extracellular traps are more readily formed by granulocytes from ERU horses, suggesting a role in disease pathogenesis [43]. To gain deeper insight into the function of granulocytes in ERU pathogenesis on protein level, our study aimed at analyzing the granulocyte proteome from healthy horses and horses in quiescent stage of ERU. We used a hypothesis-generating approach, which allowed a holistic functional interpretation of the changes that occurred between groups in the proteome of circulating granulocytes.

Since granulocytes are easily activated by different isolation steps, resulting in rapid alterations in phenotype and function [44,45], and we wanted to come as close to the *in vivo* granulocyte proteome as possible, we chose a gentle and quick isolation method to keep handling-induced activation to a minimum, evading possible subsequent misinterpretation of our data. We therefore avoided further purification of subsets after granulocyte isolation from blood, and subsequently identified a total of 2362 granulocyte proteins using label-free proteome analysis. Although recent gel-free studies on human neutrophils presented close to double the identifications (4154 proteins) [46], proteomic studies on naïve granulocytes from other animal species, such as pigs, yielded a similar amount of proteins (2371 proteins) [5]. However, to our knowledge, we are the first to describe the equine whole-granulocyte proteome in such high resolution. Moreover, we could show that circulating granulocytes from ERU horses display clear differences in the composition of their proteome compared to healthy horses, with significantly changed abundance of 96 proteins (4.1% of proteome).

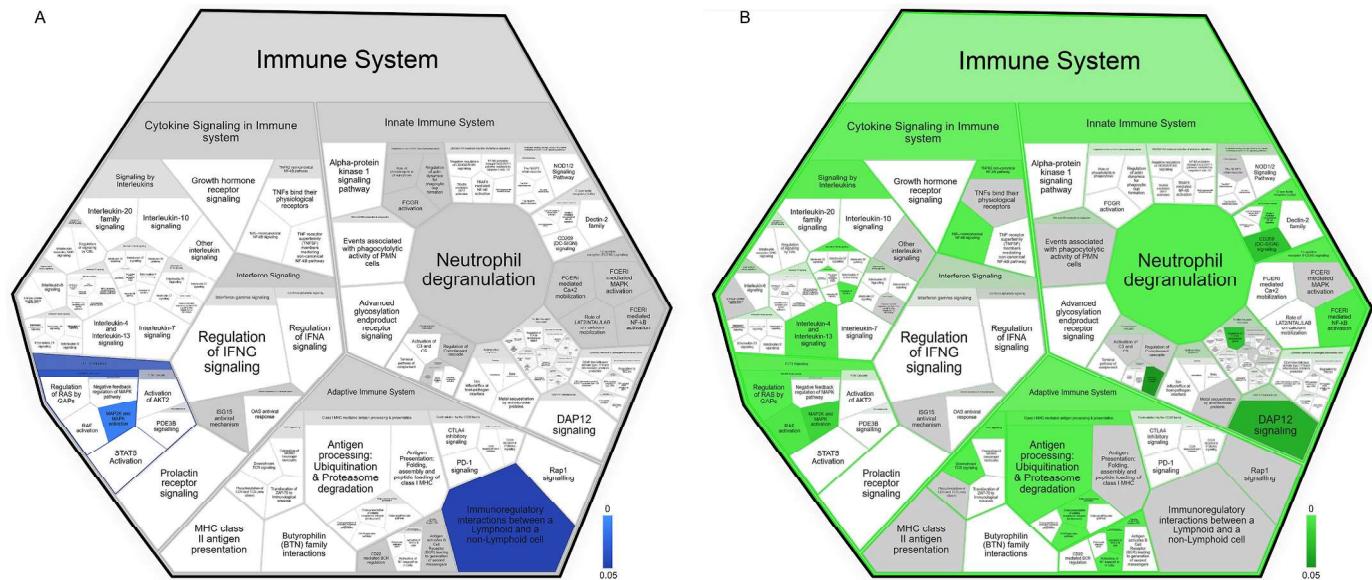
To view these single protein differences in an overall biological context, we used pathway enrichment analysis and found clear differences in several functional areas between control and ERU group (Supplementary Fig. 1). Regarding our research object, the granulocyte, we expected most specific pathway allocation differences in the Immune System superpathway. Indeed, 20 over-represented immune system pathways were associated to the ERU group, whereas only two were over-represented in controls. The number of proteins in the input lists differed between groups (Table 1: controls 26, ERU 70) and this was clearly reflected by the total number of allocated immune system pathways (Table 2: controls 15, ERU 42). Nevertheless, the ratio of all over-represented pathways to all identified pathways was higher in ERU (Table 2: 2/15 in controls vs. 20/42 in ERU) and included several pathways related to inflammatory mediators.

This pattern of over-represented pathways in ERU not only suggests a general activation of innate immune cells but rather a pro-inflammatory state. For lymphocytes in ERU, such an activated phenotype has already been shown [6,22,23,25,47]. However, the existence of a similar activation state of innate immune cells even in quiescent stage of disease, where usually no ocular symptoms are visible [7], is a new and unexpected finding. Especially as the participation of

granulocytes in uveitis pathogenesis was described mainly in the early and active stage of disease and is commonly believed to occur as a secondary phenomenon presumably caused by cytokine release after lymphocyte infiltration [26,27,41,48]. Whether this latent activation of granulocytes in the quiescent stage of ERU is merely a remainder of the previous inflammatory attack or rather describes an actual and substantial feature of these cells in ERU needs to be assessed in future studies. In contrast, the over-represented pathways in the control group rather showed tendency towards a regulatory role of granulocytes, which was previously described in numerous murine and human studies (reviewed in [49]), but is a new finding in the horse.

The only pathway, which was over-represented in both ERU and control group was the RAF/MAP kinase cascade (Fig. 1, Table 2). In the pathogenesis of ERU, this pathway has not been described so far, even though, in humans and mouse models, RAF/MAP kinase cascade is an essential signaling pathway mediating neutrophil activation [50–52]. The fact that granulocytes from healthy horses and ERU animals associated different proteins to the same RAF/MAP kinase cascade (Supplementary Table 2) might indicate a different triggering process of this pathway, pointing to an altered state of activation in ERU granulocytes. A closer look at these diverging proteins shows that the adapter protein beta-arrestin 2, which negatively regulates chemotaxis in mice [52], was significantly lower abundant in ERU (Table 1), indicating increased chemotaxis. Higher abundant proteins in ERU associating to this pathway, on the other hand, were mainly proteasome subunit proteins which were also allocated to several of the other over-represented pathways in ERU (Supplementary Table 2, Table 3). This is plausible, since intracellular proteasome-mediated protein degradation, initiated by ubiquitination within the ubiquitin proteasome system (UPS) [53,54], plays a pivotal role in cellular metabolism, which we hypothesize to be higher in ERU granulocytes due to activated cell phenotype. Interestingly, we also found an analogous process, neddylation, among the over-represented pathways in the ERU group (Supplementary Table 2), supporting this hypothesis. In total, 38 proteasome-related proteins were identified in our mass spectrometry dataset, which is consistent with proteomic data of granulocytes from other species [5,46]. Six of these proteins were significantly higher abundant in ERU (Table 1), and consistently allocated to NF-κB signaling (Supplementary Table 2), explaining the frequent occurrence of this pathway in ERU.

While the state of NF-κB activity is controlled by UPS via degradation of inhibitory proteins [55], the proteasome complex is also needed for MHC-I-mediated antigen processing in all somatic cells [56]. Recent studies show that, besides presenting endogenous proteins, neutrophils additionally have the ability to use MHC-I molecules for presentation of fragments derived from incorporated exogenous proteins, a process known as cross-presentation [57]. Since cross-presentation of antigens is dependent on the antigen internalization mechanism, most effectively performed through receptor-mediated endocytosis, increased abundance of EPS15 in ERU (Table 1), a protein involved in the process of clathrin-mediated endocytosis [58], might indicate an enhanced utilization of this particular mechanism by granulocytes in ERU. Interestingly, reactome pathway "Cross-presentation of soluble exogenous antigens (endosomes)" showed the highest *p*-value within the adaptive immune system section of the over-represented pathways in ERU group (Table 2). Although the exact pathways for breakdown of incorporated exogenous proteins and subsequent cross-presentation on the cell's surface are still topic of intense research, both the so called phagosome-to-cytosol (P2C) and the vacuolar pathway were previously described in granulocytes [59,60]. The significantly higher abundance of CLCN7 in ERU granulocytes (Table 1), a protein which is necessary for acidification of lysosomes in the process of phagosome-lysosome fusion [61,62], and the high amount of proteasome-associated proteins identified in our dataset (Supplementary Table 1, Table 1), may therefore be an indication for increased antigen cross-presentation by granulocytes in ERU. However, more information is needed to assess whether antigen cross-presentation is generally linked to a cell's



**Fig. 1.** Reactome analysis results pictured by Voronoi diagram comparing diminished (A) and enriched (B) pathways in ERU. Enlarged polygon of reactome superpathway Immune System is shown (for overview see Supplementary Fig. 1). Pathway enrichment analysis was calculated with human orthologue gene names of proteins with significant ( $p < 0.05$ ) abundance differences (A: ratio ERU/healthy < 1, blue; B: ratio ERU/healthy > 1, green). Color intensity displays  $p$ -value of the statistical test for over-representation as illustrated by the color bar. Grey polygons show pathways which are not significantly over-represented. White areas represent pathways with no assigned proteins. Detailed results are summarized in Table 2 and Supplementary Table 2. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

capability of performing phagocytosis, as shown in gene transfer studies on non-phagocytizing cells *in vitro* [63], or if it actually is relevant in granulocytes *in vivo* [64]. To clarify the possible contribution of MHC-I-mediated cross-presentation of potential ocular autoantigens by granulocytes to the pathogenesis of ERU, we plan to comparatively analyze the MHC-I-peptidome of equine granulocytes in ERU animals and healthy controls in future studies. Nevertheless, by the pathway enrichment analysis presented here, we are the first group to describe a possible link of granulocyte-mediated antigen cross-presentation involved in autoimmune disease in the horse.

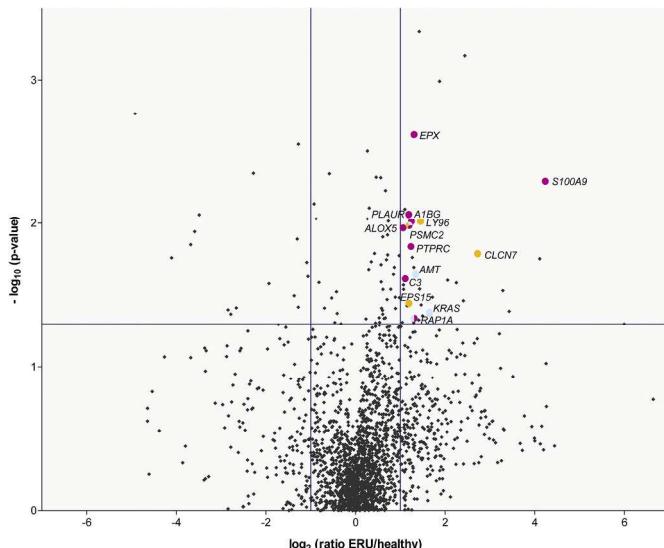
Neutrophil degranulation was the top-enriched pathway which all higher abundant proteins from ERU granulocytes were allocated to.

Altogether, nine of these proteins with possible biological significance ( $p < 0.05$  and ratio  $> 2$ ) in ERU were assigned to this pathway, five of which with unique allocation solely to neutrophil degranulation (S100A9, EPX, A1BG, C3, PLAUR; Table 3). Interestingly, all of these proteins were previously identified in specific granula or secretory vesicles of human neutrophils by mass spectrometry [65]. Recent research results of our group, describing the differentiated reaction of granulocytes to extracellular signaling, also related to the biological process of neutrophil degranulation, especially after activation of cells with the stimulant phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) [4]. Seven of the identified proteins in the study mentioned above (RAP1A, COP9, IGSF6, NUP62, PSMA7, PSMD7, ISG20) also emerged in the current

Table 2

Enrichment within the Immune System superpathway comparing significantly higher abundant proteins in ERU with significantly lower abundant proteins by reactome analysis. Over-represented pathways of the three subsets Innate Immune System, Adaptive Immune System and Cytokine Signaling in Immune System are listed by p-value in ascending order. Superordinate pathways comprising two or more individual pathways were excluded in this summary. See Supplementary Table 2 for specific values and Fig. 1 for visual presentation of these data.

Immune System					
Innate Immune System		Adaptive Immune System		Cytokine Signaling in Immune System	
Over-represented / identified pathways (7 / 18)		Over-represented / identified pathways (6 / 11)		Over-represented / identified pathways (7 / 13)	
Identifier	Name	Identifier	Name	Identifier	Name
R-HSA-6798695	Neutrophil degranulation	R-HSA-1236978	Cross-presentation of soluble exogenous antigens (endosomes)	R-HSA-5658442	Regulation of RAS by GAPs
R-HSA-5607761	Dectin-1 mediated noncanonical NF-κB signaling	R-HSA-1169091	Activation of NF-κB in B cells	R-HSA-5676590	NIK-->noncanonical NF-κB signaling
R-HSA-2871837	FCER1 mediated NF-κB activation	R-HSA-1236974	ER-Phagosome pathway	R-HSA-9020702	Interleukin-1 signaling
R-HSA-5621575	CD209 (DC-SIGN) signaling	R-HSA-202424	Downstream TCR signaling	R-HSA-6785807	Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling
R-HSA-5686938	Regulation of TLR by endogenous ligand	R-HSA-983168	Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	R-HSA-5673000	RAF activation
R-HSA-2424491	DAP12 signaling	R-HSA-1169092	Activation of RAS in B cells	R-HSA-9012546	Interleukin-18 signaling
R-HSA-173736	Alternative complement activation			R-HSA-5674135	MAP2K and MAPK activation



**Fig. 2.** Volcano plot of the 2184 proteins detected in all six samples by mass spectrometry. Candidates of differential proteome analysis with statistically significant ( $p < 0.05$ ) fold change are displayed in the upper left (ratio ERU/healthy  $< 0.5$ ) and the upper right (ratio ERU/healthy  $> 2$ ) quadrant. Proteins allocated to at least one of the three selected superordinate immune system pathways via reactome analysis are highlighted in color (light blue: RAF/MAP kinase cascade; yellow: Class I MHC mediated antigen processing & presentation; magenta: Neutrophil degranulation) and labeled with their human orthologue gene names. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

study as proteins with significantly higher abundance in ERU (Table 1).

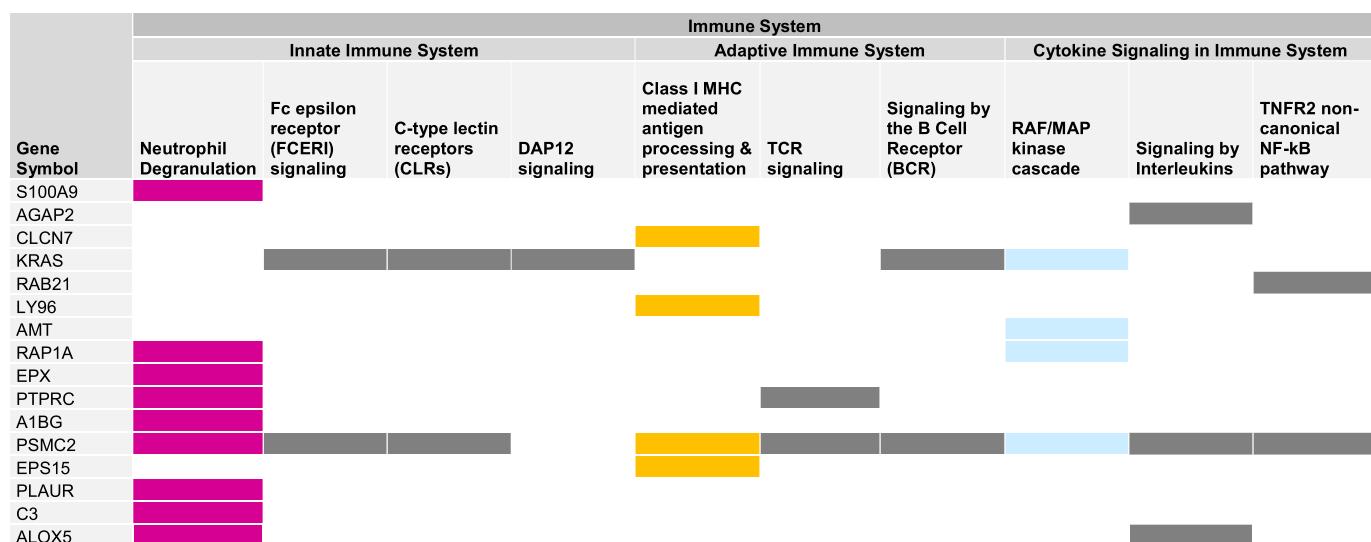
Increased neutrophil degranulation in context of autoimmune disease was already described for immune cells of multiple sclerosis patients [66]. Using three different approaches a generally pre-activated state of neutrophils was postulated, which contributed to multiple sclerosis pathogenesis [66]. Hypothesizing a similar latently activated granulocyte in ERU from the results of our pathway enrichment analysis, we are providing first evidence for a possible contribution of neutrophil degranulation to an equine autoimmune disease.

The candidate with the highest abundance difference among all 96

differing proteins with statistical significance, calgranulin B, was also specifically related to the process of neutrophil degranulation (Table 1, Table 3). Calgranulin B, a small calcium-binding protein and member of the S100 family, usually forms heterodimers with protein S100-A8, building the so called S100A8/A9 complex. In humans, it plays a critical role in modulating inflammatory response through stimulation of leukocyte recruitment and cytokine secretion in inflamed tissues in [67]. To our knowledge, it was not previously described in equine granulocytes in the context of autoimmunity. With the discovery of S100A8/A9 complex as first endogenous Toll-like receptor 4 (TLR4) ligand on murine monocytes in 2007 [68] the subsequent concept of endogenous damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs, also termed alarmins) was recently reviewed in the context of ocular disorders like uveitis, emphasizing the need for more comprehensive studies on this topic [69]. As aforementioned research was exclusively conducted in rodent models or human patients, our study gives an initial hint towards a possible new connection of granulocytes interacting with the adaptive part of the immune system via DAMPs in equine uveitis. The ability of S100A8/A9 complexes to induce autoimmunity was proven both in humans with lupus erythematosus and in an appropriate murine disease model [70]. Here, incubation of calgranulin B with an in vitro co-culture of CD8<sup>+</sup> T cells and antigen-presenting epidermal Langerhans cells (LCs) resulted in an autoreactive CD8<sup>+</sup> T cell type showing higher secretion of pro-inflammatory IL-17 than unstimulated co-cultures [70]. Interestingly, in the absence of LCs, incubation of CD8<sup>+</sup> T cells with calgranulin B did not result in development of autoreactive T cells [70]. This may point to a two-faced role of granulocytes in early ERU pathogenesis, possibly acting as unusual antigen-presenting cells by cross-presentation pathway via MHC-I and also potentially providing co-stimulatory signals for T cell activation through calgranulin B secretion. Furthermore, as crossing the BRB is the crucial point in autoimmune uveitis [18], the fact that soluble S100A8/A9 complexes purified from human granulocytes induce integrity loss in endothelial cell monolayers by decreasing the expression of cell junction proteins [71], elucidates the still unresolved enigma on how disruption of the BRB is mediated in ERU. Similar experiments with human umbilical endothelial cells using recombinant calgranulin B homodimers proved that signaling of calgranulin B on the endothelium is transduced via receptor of advanced glycation end products (RAGE) and not TLR4, contrary to the heterodimer S100A8/A9 complex [72]. Since abundance of calgranulin B in our data set is highly elevated, but

**Table 3**

Gene names of proteins with statistical ( $p < 0.05$ ) and biological (ratio ERU/healthy  $\geq 2$ ) significance, allocated to superpathway Immune System via Reactome pathway browser (<http://reactome.org>). Superpathway Immune System divides into three distinct categories and several sub-pathways. Proteins can be allocated to multiple pathways. Pathways with top 3 most allocated proteins ( $p < 0.05$ , ratio ERU/healthy  $\geq 2$ ) are shown in color, analogous to dots in Fig. 2.



protein S100-A8 showed no relevant alteration between both experimental groups (ratio 1.2, Supplementary Table 1), we assume that potential effects of calgranulin B on retinal endothelium in ERU might occur via RAGE signaling. Evidence for increased BRB permeability mediated by RAGE signaling already exists in the context of diabetic retinopathy, however, instead of calgranulin B, these studies rather describe advance glycation end products (AGEs) as receptor ligands in patient blood [73,74]. Our finding of higher abundant calgranulin B in the granulocyte proteome of ERU animals might therefore give a first glance at how the inner endothelial part of this barrier may be conceivably attacked by the immune system, providing a new exciting indication for a possible participation of these innate immune cells in ERU pathogenesis.

In summary our study provides evidence of deviant functional properties of circulating granulocytes in ERU based on proteome alterations. We described these innate immune cells as latently activated since the term "priming" is commonly used for the reversible high alert state of neutrophils containing the capacity to respond aggressively on stimuli [75]. Additionally, considering the results of the pathway enrichment analysis, we hypothesize that granulocytes in ERU might contribute to disease pathogenesis in different ways. The functional effects of calgranulin B on the BRB, as well as the potential relevance of MHC-I-mediated autoantigen cross-presentation by granulocytes therefore need to be assessed in future studies on this T cell-driven autoimmune disease.

## Author contributions

C.D. and R.D. conceived and designed the experiment; R.D., S.M.H. and M.W. performed the experiments and analyzed the data; M.W. and R.D. wrote the manuscript. All authors critically read the manuscript and approved the final version to be published.

## Credit Author Statement

Cornelia A. Deeg and Roxane L. Degroote conceived and designed the experiments, and supervised the project; Roxane L. Degroote, Stefanie M. Hauck and Maria Weigand performed the experiments and analyzed the data; Maria Weigand and Roxane L. Degroote wrote the manuscript. All authors critically read the manuscript and approved the final version to be published.

## Funding

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG DE 719/4-3 (to C.D.).

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgement

The authors would like to thank the staff from LMU Munich equine clinic, especially Tanja Witte and Kirsten Hahn, as well as Yvette Ballauf for supplying equine blood samples.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103989>.

## References

- [1] J.C. Rieckmann, R. Geiger, D. Hornburg, T. Wolf, K. Kveler, D. Jarrossay, F. Sallusto, S.S. Shen-Orr, A. Lanzavecchia, M. Mann, F. Meissner, Social network architecture of human immune cells unveiled by quantitative proteomics, *Nat. Immunol.* 18 (5) (2017) 583–593.
- [2] L.G. Ng, R. Ostuni, A. Hidalgo, Heterogeneity of neutrophils, *Nat Rev Immunol* 19 (4) (2019) 255–265.
- [3] E. Chiaradia, I. Miller, In slow pace towards the proteome of equine body fluids, *J. Proteome* 225 (2020) 103880.
- [4] R.L. Degroote, M. Weigand, S.M. Hauck, C.A. Deeg, IL8 and PMA trigger the regulation of different biological processes in granulocyte activation, *Front. Immunol.* 10 (2019) 3064.
- [5] M. Weigand, R.L. Degroote, B. Amann, S. Renner, E. Wolf, S.M. Hauck, C.A. Deeg, Proteome profile of neutrophils from a transgenic diabetic pig model shows distinct changes, *J. Proteome* 224 (2020) 103843.
- [6] M. Schauer, K.J.H. Kleinwort, R.L. Degroote, C. Wiedemann, E. Kremmer, S.M. Hauck, C.A. Deeg, Interaction of septin 7 and DOCK8 in equine lymphocytes reveals novel insights into signaling pathways associated with autoimmunity, *Sci. Rep.* 8 (1) (2018) 12323.
- [7] B.C. Gilger, T.M. Michau, Equine recurrent uveitis: new methods of management, *Vet Clin North Am Equine Pract* 20 (2) (2004) 417–427.
- [8] R.A. Allbaugh, Equine recurrent uveitis: A review of clinical assessment and management, *Equine Veterinary Education* 29 (5) (2017 May) 279–288 n/a-n/a.
- [9] F. Malalana, A. Stylianides, C. McGowan, Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives, *Vet. J.* 206 (1) (2015) 22–29.
- [10] C.A. Deeg, S.M. Hauck, B. Amann, D. Pompetski, F. Altmann, A. Raith, T. Schmalz, M. Stangassinger, M. Ueffing, Equine recurrent uveitis—a spontaneous horse model of uveitis, *Ophthalmic Res.* 40 (3–4) (2008) 151–153.
- [11] D. Luger, P.B. Silver, J. Tang, D. Cua, Z. Chen, Y. Iwakura, E.P. Bowman, N.M. Sgambellone, C.C. Chan, R.R. Caspi, Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category, *J. Exp. Med.* 205 (4) (2008) 799–810.
- [12] C.A. Deeg, A.J. Raith, B. Amann, J.W. Crabb, S.R. Thurau, S.M. Hauck, M. Ueffing, G. Wildner, M. Stangassinger, CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis, *Clin Dev Immunol* 2007 (2007) 39245.
- [13] C.A. Deeg, B. Amann, A.J. Raith, B. Kaspers, Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (2) (2006) 652–656.
- [14] C.A. Deeg, S.R. Thurau, H. Gerhards, M. Ehrenhofer, G. Wildner, B. Kaspers, Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease, *Eur. J. Immunol.* 32 (9) (2002) 2598–2606.
- [15] I. Gery, J.W. Strelein, Autoimmunity in the eye and its regulation, *Current Opinion in Immunology* 6 (1994) 938–945.
- [16] R.B. Nussenblatt, I. Gery, Experimental autoimmune uveitis and its relationship to clinical ocular inflammatory disease, *J. Autoimmun.* 9 (5) (1996) 575–585.
- [17] R. Horai, R.R. Caspi, Microbiome and autoimmune uveitis, *Front. Immunol.* 10 (2019) 232.
- [18] C.A. Deeg, S. Reese, H. Gerhards, G. Wildner, B. Kaspers, The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45 (7) (2004) 2286–2292.
- [19] C.A. Deeg, M. Ehrenhofer, S.R. Thurau, S. Reese, G. Wildner, B. Kaspers, Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses, *Exp. Eye Res.* 75 (2) (2002) 127–133.
- [20] B.C. Gilger, E. Malok, K.V. Cutter, T. Stewart, D.W. Horohov, J.B. Allen, Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71 (1) (1999) 17–28.
- [21] J.V. Forrester, Uveitis: pathogenesis, *Lancet* 338 (8781) (1991) 1498–1501.
- [22] R.L. Degroote, S.M. Hauck, B. Amann, S. Hirmer, M. Ueffing, C.A. Deeg, Unraveling the equine lymphocyte proteome: differential septin 7 expression associates with immune cells in equine recurrent uveitis, *PLoS One* 9 (3) (2014) e91684.
- [23] R.L. Degroote, P.B. Uhl, B. Amann, A.M. Krackhardt, M. Ueffing, S.M. Hauck, C.A. Deeg, Formin like 1 expression is increased on CD4+ T lymphocytes in spontaneously autoimmune uveitis, *J. Proteome* 154 (2017) 102–108.
- [24] S.M. Hauck, M.F. Lepper, M. Hertl, W. Sekundo, C.A. Deeg, Proteome dynamics in biobanked horse peripheral blood derived lymphocytes (PBL) with induced autoimmune uveitis, *Proteomics* 17 (19) (2017).
- [25] C. Wiedemann, B. Amann, R.L. Degroote, T. Witte, C.A. Deeg, Aberrant migratory behavior of immune cells in recurrent autoimmune uveitis in horses, *Front Cell Dev Biol* 8 (2020) 101.
- [26] K.L. Pepple, L. Wilson, R.N. Van Gelder, Comparison of aqueous and vitreous lymphocyte populations from two rat models of experimental uveitis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 59 (6) (2018) 2504–2511.
- [27] E.C. Kerr, B.J. Raveney, D.A. Copland, A.D. Dick, L.B. Nicholson, Analysis of retinal cellular infiltrate in experimental autoimmune uveoretinitis reveals multiple regulatory cell populations, *J. Autoimmun.* 31 (4) (2008) 354–361.
- [28] L.S. Jones, L.V. Rizzo, R.K. Agarwal, T.K. Tarrant, C.C. Chan, B. Wiggert, R.R. Caspi, IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response, *J. Immunol.* 158 (12) (1997) 5997–6005.
- [29] S.J. Kim, M. Zhang, B.P. Vistica, C.C. Chan, D.F. Shen, E.F. Wawrousek, I. Gery, Induction of ocular inflammation by T-helper lymphocytes type 2, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43 (3) (2002) 758–765.
- [30] C.A. Deeg, B. Kaspers, H. Gerhards, S.R. Thurau, B. Wollanke, G. Wildner, Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (2) (2001) 393–398.
- [31] J.K. Zippies, M. Kirschfink, B. Amann, S.M. Hauck, M. Stangassinger, C.A. Deeg, Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model, *Immunobiology* 215 (12) (2010) 949–955.
- [32] R.L. Degroote, S.M. Hauck, E. Kremmer, B. Amann, M. Ueffing, C.A. Deeg, Altered expression of Talin 1 in peripheral immune cells points to a significant role of the

- innate immune system in spontaneous autoimmune uveitis, *J. Proteome Res.* 11 (2012) 4536–4544.
- [33] R.L. Degroot, S.M. Hauck, G. Treutlein, B. Amann, K.J. Frohlich, E. Kremmer, J. Merl, M. Stangassinger, M. Ueffing, C.A. Deeg, Expression changes and novel interaction Partners of Talin 1 in effector cells of autoimmune uveitis, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 5812–5819.
- [34] H. Werry, H. Gerhards, The surgical therapy of equine recurrent uveitis, *Tierarztl Prax* 20 (2) (1992) 178–186.
- [35] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [36] A. Grosche, A. Hauser, M.F. Lepper, R. Mayo, C. von Toerne, J. Merl-Pham, S.M. Hauck, The proteome of native adult Muller glial cells from murine retina, *Mol. Cell. Proteomics* 15 (2) (2016) 462–480.
- [37] L. Kall, J.D. Canterbury, J. Weston, W.S. Noble, M.J. MacCoss, Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets, *Nat. Methods* 4 (11) (2007) 923–925.
- [38] Y. Perez-Riverol, A. Csordas, J. Bai, M. Bernal-Llinares, S. Hewapathirana, D.J. Kundu, A. Inuganti, J. Griss, G. Mayer, M. Eisenacher, E. Perez, J. Uszkoreit, J. Pfeuffer, T. Sachsenberg, S. Yilmaz, S. Tiwary, J. Cox, E. Audain, M. Walzer, A.F. Jarnuzak, T. Ternent, A. Brazma, J.A. Vizcaino, The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data, *Nucleic Acids Res.* 47 (D1) (2019) D442–D450.
- [39] B. Jassal, L. Matthews, G. Viteri, C. Gong, P. Lorente, A. Fabregat, K. Sidiropoulos, J. Cook, M. Gillespie, R. Haw, F. Loney, B. May, M. Milacic, K. Rothfels, C. Sevilla, V. Shamovsky, S. Shorser, T. Varusai, J. Weiser, G. Wu, L. Stein, H. Hermjakob, P. D'Eustachio, The reactome pathway knowledgebase, *Nucleic Acids Res.* 48 (D1) (2020) D498–D503.
- [40] G. Wu, R. Haw, Functional interaction network construction and analysis for disease discovery, *Methods Mol. Biol.* 1558 (2017) 235–253.
- [41] S.B. Su, R.S. Grajewski, D. Luger, R.K. Agarwal, P.B. Silver, J. Tang, J. Tuo, C.C. Chan, R.R. Caspi, Altered chemokine profile associated with exacerbated autoimmune pathology under conditions of genetic interferon-gamma deficiency, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 (10) (2007) 4616–4625.
- [42] R.R. Caspi, C.C. Chan, Y. Fujino, F. Nafajian, S. Grover, C.T. Hansen, R.L. Wilder, Recruitment of antigen-nonspecific cells plays a pivotal role in the pathogenesis of a T cell-mediated organ-specific autoimmune disease, experimental autoimmune uveoretinitis, *J. Neuroimmunol.* 47 (2) (1993) 177–188.
- [43] L. Fingerhut, B. Ohnesorge, M. von Borstel, A. Schumski, K. Strutzberg-Minder, M. Morgelin, C.A. Deeg, H.P. Haagsman, A. Beineke, M. von Kockritz-Blickwede, N. de Buhr, Neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of equine recurrent uveitis (ERU), *Cells* 8 (12) (2019).
- [44] A.B. Paoliello-Paschoalato, A.E. Azzolini, M.F. Cruz, L.F. Marchi, L.M. Kabeya, E.A. Donadi, Y.M. Lucisano-Valim, Isolation of healthy individuals' and rheumatoid arthritis patients' peripheral blood neutrophils by the gelatin and Ficoll-Hypaque methods: comparative efficiency and impact on the neutrophil oxidative metabolism and Fc gamma receptor expression, *J. Immunol. Methods* 412 (2014) 70–77.
- [45] S. Fukuda, G.W. Schmid-Schönbein, Centrifugation attenuates the fluid shear response of circulating leukocytes, *J. Leukoc. Biol.* 72 (1) (2002) 133–139.
- [46] P. Grabowski, S. Hesse, S. Hollizeck, M. Rohlfs, U. Behrends, R. Sherkat, H. Tamary, E. Unal, R. Somech, T. Patiroglu, S. Canzar, J. van der Werff Ten Bosch, C. Klein, J. Rappaport, Proteome analysis of human neutrophil granulocytes from patients with monogenic disease using data-independent acquisition, *Mol. Cell. Proteomics* 18 (4) (2019) 760–772.
- [47] L.K. Saldinger, S.G. Nelson, R.R. Bellone, M. Lassaline, M. Mack, N.J. Walker, D.L. Borjesson, Horses with equine recurrent uveitis have an activated CD4+ T-cell phenotype that can be modulated by mesenchymal stem cells in vitro, *Vet. Ophthalmol.* 23 (1) (2020) 160–170.
- [48] E.C. Kerr, D.A. Copland, A.D. Dick, L.B. Nicholson, The dynamics of leukocyte infiltration in experimental autoimmune uveoretinitis, *Prog. Retin. Eye Res.* 27 (5) (2008) 527–535.
- [49] Y. Li, W. Wang, F. Yang, Y. Xu, C. Feng, Y. Zhao, The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity, *Cell Commun Signal* 17 (1) (2019) (Article no. 147).
- [50] J.A. Nick, N.J. Avdi, P. Gerwinski, G.L. Johnson, G.S. Worthen, Activation of a p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide, *J. Immunol.* 156 (12) (1996) 4867–4875.
- [51] K.R. McLeish, C. Knall, R.A. Ward, P. Gerwinski, P.Y. Coxon, J.B. Klein, G.L. Johnson, Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF, *J. Leukoc. Biol.* 64 (4) (1998) 537–545.
- [52] E. Ricci, S. Ronchetti, E. Gabrielli, E. Pericolini, M. Gentili, E. Rossetti, A. Vecchiarelli, C. Riccardi, GILZ restrains neutrophil activation by inhibiting the MAPK pathway, *J. Leukoc. Biol.* 105 (1) (2019) 187–194.
- [53] M. Hochstrasser, Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (2) (1995) 215–223.
- [54] J.S. Bett, Proteostasis regulation by the ubiquitin system, *Essays Biochem.* 60 (2) (2016) 143–151.
- [55] M. Karin, Y. Ben-Neriah, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity, *Annu. Rev. Immunol.* 18 (1) (2000) 621–663.
- [56] P.M. Kloetzel, Antigen processing by the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (3) (2001) 179–187.
- [57] F.M. Cruz, J.D. Colbert, E. Merino, B.A. Kriegsman, K.L. Rock, The biology and underlying mechanisms of cross-presentation of exogenous antigens on MHC-I molecules, *Annu. Rev. Immunol.* 35 (2017) 149–176.
- [58] A.E. Salcini, H. Chen, G. Iannolo, P. De Camilli, P.P. Di Fiore, Epidermal growth factor pathway substrate 15, Eps15, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (8) (1999) 805–809.
- [59] N.S. Potter, C.V. Harding, Neutrophils Process Exogenous Bacteria Via an Alternate Class I MHC Processing Pathway for Presentation of Peptides to T Lymphocytes, 167(5) (2001), pp. 2538–2546.
- [60] C. Beauvillain, Y. Delneste, M. Scotet, A. Peres, H. Gascan, P. Guermonprez, V. Barnaba, P. Jeannin, Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo, *Blood* 110 (8) (2007) 2965–2973.
- [61] J.D. Pfeifer, M.J. Wick, R.L. Roberts, K. Findlay, S.J. Normark, C.V. Harding, Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells, *Nature* 361 (6410) (1993) 359–362.
- [62] L. Wartosch, T. Stauber, A role for chloride transport in lysosomal protein degradation, *Autophagy* 6 (1) (2010) 158–159.
- [63] A. Giudini, C. Rahner, P. Cresswell, Receptor-mediated phagocytosis elicits cross-presentation in nonprofessional antigen-presenting cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (9) (2009) 3324–3329.
- [64] J.D. Colbert, F.M. Cruz, K.L. Rock, Cross-presentation of exogenous antigens on MHC I molecules, *Curr. Opin. Immunol.* 64 (2020) 1–8.
- [65] S. Rørvig, O. Østergaard, N.H.H. Heegaard, N. Borregaard, Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors, 94 (4) (2013), pp. 711–721.
- [66] M. Naegle, K. Tillack, S. Reinhardt, S. Schippling, R. Martin, M. Sospedra, Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype, *J. Neuroimmunol.* 242 (1–2) (2012) 60–71.
- [67] S. Wang, R. Song, Z. Wang, Z. Jing, S. Wang, J. Ma, S100A8/A9 in inflammation, *Front. Immunol.* 9 (2018) (Article no. 1298).
- [68] T. Vogl, K. Tenbroek, S. Ludwig, N. Leukert, C. Ehrhardt, M.A. van Zoelen, W. Nacken, D. Foell, T. van der Poll, C. Sorg, J. Roth, Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock, *Nat. Med.* 13 (9) (2007) 1042–1049.
- [69] Y. Murakami, K. Ishikawa, S. Nakao, K.-H. Sonoda, Innate immune response in retinal homeostasis and inflammatory disorders, *Prog. Retin. Eye Res.* 74 (2020) 100778.
- [70] K. Loser, T. Vogl, M. Voskort, A. Lueken, V. Kupas, W. Nacken, L. Klenner, A. Kuhn, D. Foell, L. Sorokin, T.A. Luger, J. Roth, S. Beissert, The toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells, *Nat. Med.* 16 (6) (2010) 713–717.
- [71] D. Viemann, A. Streng, A. Janning, K. Jurk, K. Klimmek, T. Vogl, K. Hirota, F. Ichida, D. Foell, B. Kehrel, V. Gerke, C. Sorg, J. Roth, Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells, *Blood* 105 (7) (2005) 2955–2962.
- [72] L. Wang, H. Luo, X. Chen, Y. Jiang, Q. Huang, Functional characterization of S100A8 and S100A9 in altering monolayer permeability of human umbilical endothelial cells, *PLoS One* 9 (3) (2014) e90472.
- [73] C.M. Warboys, H.-B. Toh, P.A. Fraser, Role of NADPH oxidase in retinal microvascular permeability increase by RAGE activation, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (3) (2009) 1319–1328.
- [74] J. Xu, L.J. Chen, J. Yu, H.J. Wang, F. Zhang, Q. Liu, J. Wu, Involvement of advanced glycation end products in the pathogenesis of diabetic retinopathy, *Cell. Physiol. Biochem.* 48 (2) (2018) 705–717.
- [75] K.L. Vogt, C. Summers, E.R. Chivers, A.M. Condiffe, Priming and de-priming of neutrophil responses in vitro and in vivo, *Eur J Clin Invest* 48 (Suppl. 2) (2018) e12967.



## 5 DISKUSSION

Obwohl bereits im 19. Jahrhundert entdeckt, wurde erst in den letzten zwei Jahrzehnten offensichtlich, dass Granulozyten wesentlich mehr sind, als die uniform reagierenden Phagozyten der angeborenen Immunabwehr, für die sie ursprünglich gehalten wurden. Zwar gehören sie zu den kurzlebigsten Zellen des Körpers (Lahoz-Benytez et al. 2016), trotzdem ist mittlerweile klar, dass die Vielfalt der von ihnen übernommenen Aufgaben über Änderungen in Transkriptom und Proteom vermittelt werden. Gerade bei neutrophilen Granulozyten scheinen diese beiden Ebenen der Genexpression jedoch kaum zu korrelieren, wie eine vergleichende Transkriptom-Proteom-Analyse dieser Immunzellen bei 22 gesunden Probanden ergab (Grabowski et al. 2019). Nachdem aber das aktuelle Funktionsspektrum einer Zelle direkt vom Vorhandensein der für die einzelnen Reaktionen benötigten Proteine zu diesem Zeitpunkt abhängt, bildete eine differentielle Proteomanalyse die Basis, auf der die Beschreibung der Granulozyten in den zwei hier untersuchten Großtiermodellen erfolgte.

Als translationales Tiermodell für eine monogenetische Form des humanen Diabetes mellitus (DM) entwickelt, zeigen die *INS<sup>C94Y</sup> tg* Schweine unserer ersten Studie innerhalb kurzer Zeit post partum durch die gestörte Insulinsekretion und die anschließende Apoptose der pankreatischen  $\beta$ -Zellen einen stabilen diabetischen Phänotyp mit persistierender Hyperglykämie (Renner et al. 2013). Diese chronische Hyperglykämie führt über Beeinträchtigungen der Mikrovaskularisation nach wenigen Jahren zu irreversiblen Schäden an Auge, Herz und Niere, und zwar sowohl im Modell als auch bei humanen Patienten (Bebu et al. 2020; Renner et al. 2020). Da sich die Stoffwechselstörung durch die mit der Krankheit verbundenen Komorbiditäten und Folgeerkrankungen, nicht nur in Deutschland sondern auch global, zu einer der größten finanziellen Belastungen des öffentlichen Gesundheitswesens entwickelt hat (Jacobs et al. 2017; Williams et al. 2020), gilt es eine DM-Erkrankung möglichst frühzeitig zu diagnostizieren und adäquat zu therapieren (Bebu et al. 2020). Der Einsatz genetisch modifizierter Tiermodelle in der Diabetes-Forschung erlaubt dabei wichtige Schlussfolgerungen zur Pathogenese und den sekundären Veränderungen der Erkrankung, unabhängig von Umweltfaktoren und vor einem einheitlichen genetischen Hintergrund. In einer aktuellen Transkriptomanalyse neutrophiler Granulozyten von Patienten, bei denen vor maximal einem Jahr ein T2DM diagnostiziert wurde, identifizierten die Autoren insgesamt 3.304 im Vergleich zu gesunden Probanden differentiell exprimierte Gene (Lin et al. 2020b). Die nähere Untersuchung der Daten im Hinblick auf die biologische Funktion dieser Gene deutet auf einen veränderten Aktivitätszustand der neutrophilen Granulozyten bei T2DM hin (Lin et al. 2020b). Die Aussagekraft dieser Studie muss allerdings angesichts der mangelnden Korrelation zwischen Transkriptom und Proteom bei Neutrophilen kritisch beurteilt werden (Grabowski et al. 2019). Jedoch wurde anhand mehrere Experimente mit neutrophilen

Granulozyten unter hyperglykämischen Kulturbedingungen *in vitro* bereits nachgewiesen, dass schon eine kurzzeitige Hyperglykämie die Phagozytosefähigkeit und ROS-Produktion von Neutrophilen gesunder Probanden senken kann (zusammengefasst in (Jafar et al. 2016)). Die zum Zeitpunkt der Probennahme zwölf Wochen alten *INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweine zeigten Nüchternblutglukosewerte im hyperglykämischen Bereich von durchschnittlich 360 mg/dl, ihre gesunden Wurfgeschwistern 80 mg/dl (Supplementary Table 1, Publikation I) und weisen damit die bei der Erstbeschreibung des Modells erhobenen Charakteristika auf (Renner et al. 2013). Über den Vergleich der beiden Gruppen – *INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweine und gesunde Wildtypen – erwarteten wir uns daher neue Erkenntnisse zu den frühen Auswirkungen des hyperglykämischen Zustandes auf die neutrophilen Granulozyten *in vivo*.

Mittels label-freier LC-MS/MS wurde ein hochauflösendes Proteinprofil der neutrophilen Granulozyten erstellt, wie es so zuvor bei Schweinen nicht verfügbar war (PubMed-Recherche, September 2020). Bei der anschließenden Datenanalyse wurden unter den 2.371 identifizierten Proteinen insgesamt 51 mit signifikanten Abundanzunterschieden zwischen den diabetischen Tieren und den Wildtypen gefunden. Die Größenordnung dieses Resultats passt zu den Ergebnissen einer humanen Studie, die beim proteomischen Vergleich der Granulozyten von Diabetikern mit einer Kontrollgruppe 30 verschieden abundante Proteine nachwies (Soongsathitanon et al. 2019). Im Gegensatz zu der von uns verwendeten Gel-freien Technik, erfolgte die quantitative Analyse hier anhand fluoreszenzgefärbter 2D-Gele und lediglich die auf diese Weise zwischen den Gruppen als signifikant unterschiedlich beurteilten Spots wurden anschließend ausgeschnitten und im Massenspektrometer identifiziert (Soongsathitanon et al. 2019). Zwar finden sich 18 der 30 identifizierten Proteine in unserem Datensatz wieder, weisen dort aber keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen diabetischen und gesunden Tieren auf. Die nur teilweise Überschneidung der als differentiell exprimierten Proteine zwischen den beiden Studien kommt vermutlich einerseits durch speziesspezifischen Variationen der neutrophilen Granulozyten zustande (Chibber and Castle 1983; Scapinello et al. 2011), womöglich spielt aber auch die unterschiedliche Erkrankungsphase eine Rolle. Hinzu kommt, dass die Patienten zwar, wie die diabetischen Schweine, erhöhte Werte bei der Nüchternblutglukose aufwiesen, aber bereits therapiert wurden (Soongsathitanon et al. 2019), im Gegensatz zu den Tieren in unserem Versuch, die bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht medikamentös behandelt worden waren. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Therapie der humanen Diabetiker mitverantwortlich ist für die Diskrepanz bei den differentiell exprimierten neutrophilen Proteine der beiden Studien. Ein erster Vergleich der porcinen Daten mit dem Proteinprofil humaner neutrophiler Granulozyten, das bei einer methodisch nur minimal von unserer Studie abweichenden Transkriptom-Proteom-Analyse ermittelt wurde und aus insgesamt 4.154 identifizierten Proteine bestand (Grabowski et al. 2019), ergab eine gut 80%ige

Überschneidung der Datensätze. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass etwa 20% der Proteine, die beim Schwein in den Neutrophilen nachgewiesen wurden, beim Menschen in diesen Zellen so nicht vorkommen. Künftige Analysen müssen zeigen, welche funktionellen Unterschiede sich aufgrund dieser proteomischen Divergenzen möglicherweise für die beiden Spezies erwarten und letztlich auch nachweisen lassen.

Der größte signifikante Unterschied ergab sich in unserer Studie für die COP9 Signalosom Untereinheit 2 (SGN2) mit einer zehnfach höheren Proteinabundanz in Neutrophilen der *INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweine im Vergleich zur Kontrollgruppe (Table 1, Publikation I). Weder beim Menschen noch im Tiermodell wurde SGN2 oder das COP9 Signalosom (CSN) bislang im Zusammenhang mit DM als differentiell exprimiert beschrieben. Das CSN ist ein evolutionär hoch konservierter, aus insgesamt acht Untereinheiten zusammengesetzter Multi-enzymkomplex, der zur Gruppe der Deubiquitinierungsenzyme gezählt wird (Dubiel et al. 2020). Allerdings scheinen neddylierte Cullin-haltige RING-Ligasen (CRLs) das einzige Substrat des Komplexes im Säugetier zu sein (Rockel et al. 2014). Die Untereinheit 2 ist zwar nicht selbst an der Bildung des reaktiven Zentrums beteiligt, sorgt aber über die Bindung des Cofaktors Inositol-Hexaphosphat für die Rekrutierung der CRLs und eine Stabilisierung des CRL-CSN-Komplexes (Lin et al. 2020a). Da CRLs nur im neddylierten Zustand die Übertragung eines aktivierte Ubiquitins auf ein Substrat katalysieren können (Boh et al. 2011), kontrolliert das CSN durch deren Deneddylierung indirekt die Ubiquitinierung und damit die proteasomale Degradation zahlloser zellulärer Moleküle. So sorgt beispielsweise die Ubiquitinierung des NF-κB Inhibitors IκBα dafür, dass der universelle Transkriptionsfaktor NF-κB nach dem Abbau des Inhibitors über seine nun frei zugängliche Lokalisationssequenz in den Zellkern transloziert wird und dort die Transkription diverser inflammatorischer Proteine induzieren kann (Huang et al. 2000). Demnach könnte eine höhere Menge des CSN in der Zelle über die vermehrte Inaktivierung der CRLs zu einer länger anhaltenden Inhibition des zytoplasmatischen NF-κB führen. Die Folge davon wäre eine Verminderung der durch NF-κB induzierten Genprodukte. Zu diesen gehören bei neutrophilen Granulozyten des Menschen zahlreiche proinflammatorische Zytokine, wie TNF-α, IL-1β, CXCL8, CCL3 und CCL4, deren Anstieg auf mRNA- und Proteinebene in humanen Neutrophilen bei Stimulation mit LPS oder TNF-α und gleichzeitiger Blockade des NF-κB *in vitro* deutlich geringer ausfiel (Cloutier et al. 2007). Der einfache Vergleich der Proteinabundanzen zwischen *INS<sup>C94Y</sup>* tg Tieren und Wildtypen ergab keinen signifikanten Unterschied für NF-κB bei unserer Analyse. Dieses Ergebnis steht damit im Widerspruch zu zahlreichen Studien, die im Zusammenhang mit DM eine Erhöhung von NF-κB in peripheren Leukozyten beschrieben haben (Hofmann et al. 1999; Bierhaus et al. 2001; De Marañon et al. 2020), darunter auch eine, bei der mittels Expressionsanalysen in humanen Neutrophilen gezeigt wurde, dass die Menge des Transkriptionsfaktors unter Therapie wieder abnimmt im Vergleich zu unbehandelten

Patienten (Inayat et al. 2019). Eine andere Forschergruppe wiederum fand keinen Unterschied der NF-κB-Expression in frisch isolierten, neutrophilen Granulozyten von Typ-2-Diabetikern verglichen mit gesunden Probanden (Margaryan et al. 2018), ist also im Einklang mit dem Ergebnis unserer Proteomanalyse. Dies verdeutlicht, wie komplex die Rolle von NF-κB in neutrophilen Granulozyten im Rahmen des DM vermutlich ist.

SGN2 besitzt aber neben seiner Rolle als Untereinheit des CSN noch eine weitere, initial in *Drosophila* beschriebene Funktion als Co-Repressor über die Interaktion mit verschiedenen nukleären Hormonrezeptoren (Dressel et al. 1999; Polly et al. 2000; Moehren et al. 2007). Die Tatsache, dass die anderen CSN-Untereinheiten bei der massenspektrometrischen Analyse in den neutrophilen Granulozyten beider Versuchsgruppen mit nahezu identischen Proteinmengen identifiziert wurden und lediglich SGN2 diesen starken Anstieg in den *INSC<sup>C94Y</sup>* tg Tieren zeigte (Supplementary Table 2, Publikation I), lässt eine Bedeutung dieser CSN-unabhängige Funktion von SGN2 in den diabetischen Schweinen vermuten. Interessanterweise wurde ein solcher Wirkmechanismus bislang weder in Neutrophilen noch in der Spezies Schwein beschrieben. Nachdem aber mittlerweile ein breiter Konsens über die Fähigkeit der Granulozyten zur de novo Proteinsynthese herrscht und in mehreren Studien die funktionelle Bedeutung nukleärer Hormonrezeptoren in diesen Zellen belegt wurde (Takahashi et al. 2002; Wang et al. 2019; Manjari et al. 2019; Souto et al. 2020), scheint dies durchaus ein vielversprechender Ansatz für weiterführende Untersuchungen zur Reaktion neutrophiler Granulozyten auf hyperglykämische Bedingungen zu sein.

Die kürzlich gemachte Entdeckung, dass mithilfe von SGN2 regulierte Gene möglicherweise das myofibrilläre Aktinskelett beeinflussen (Alves et al. 2020), ist insofern spannend, als dass zwei weitere, in den Neutrophilen der *INSC<sup>C94Y</sup>* tg Schweinen signifikant höher abundanten Proteine ebenfalls an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind. Es handelt sich zum einen um das zur Villin/Gesolin-Superfamilie gehörende Advillin, zum anderen um die regulatorische leichte Myosinkette 9 (engl. myosin regulatory light chain 9, MYL9, MLC-2C), die zudem mit einem Verhältnis von 4,6 nach SGN2 das Protein mit dem zweithöchsten Abundanzunterschied darstellt (Table 1, Publikation I). Wir konzentrierten uns im weiteren Verlauf daher auf MLC-2C und konnten den ersten Befund aus der Massenspektrometrie anhand von immunfluoreszenzgefärbten, zytologischen Präparaten bestätigen. Denn auch hier wiesen die neutrophilen Granulozyten der *INSC<sup>C94Y</sup>* tg Schweine eine signifikant höhere MYL9-Expression auf im Vergleich zu den Kontrollen (Fig. 3, Publikation I). Als regulatorische Kette des nicht-muskulären Typ II Myosins (NMII) verstärkt MLC-2C im phosphorylierten Zustand die NMII-Aktin-Bindung und die ATPase-Aktivität des NMII, wie *in vitro* mit aus humanen Thrombozyten isoliertem NMII demonstriert (Adelstein and Anne Conti 1975). Diese Interaktion mit dem Zytoskelett sorgt dafür, dass NMII maßgeblich an zentralen Mechanismen wie Zellmigration, -adhäsion und intrazellulären Transportprozessen beteiligt ist

(zusammengefasst in (Vicente-Manzanares et al. 2009)). Zwar wird NMII in nahezu allen Geweben exprimiert, der proteomische und zytologische Nachweis von MLC-2C in porcinen neutrophilen Granulozyten stellt allerdings eine neue Entdeckung dar. Bislang wurde eine erhöhte MYL9-Expression beim Schwein lediglich in der Rückenmuskulatur eines Myostatin-Knock-out-Modells nachgewiesen, weshalb die Autoren der Studie eine Regulation des muskulären Energiestoffwechsels über die von MLC-2C kontrollierte ATPase-Aktivität vermuteten (Li et al. 2020). Im Zusammenhang mit DM wurden ebenfalls in einem Muskelgewebe höhere Mengen des Proteins gefunden, allerdings handelte es sich diesmal um die glatte Muskulatur des Magens von Mäusen und humanen Patienten und auch hier bleibt die Bedeutung zunächst unklar (Li et al. 2018). Posttranskriptionale Modifikationen des MLC-2C-Moleküls und eine damit verbundene unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation des Proteins könnte möglichweise die Erklärung für die unterschiedlichen Befunde liefern. Denn wie *in vitro* durch Mutationsstudien mit immortalisierten Zelllinien bewiesen wurde, sorgt eine N-terminale Methylierung des MLC-2C dafür, dass das Protein als Transkriptionsfaktor wirkt (Nevitt et al. 2018) und damit auf Ebene der Genexpression diverse zelluläre Veränderungen induzieren kann. Entscheidend ist hierbei die erhöhte DNA-Bindungsstärke des derart modifizierten MLC-2C (Nevitt et al. 2018). Nachdem bei unserer massenspektrometrischen Analyse der porcinen Granulozyten zwar weitere Myosin-Komponenten identifiziert wurden, keine davon jedoch einen relevanten Abundanzunterschied zwischen der diabetischen Gruppe und den Kontrollschweinen aufwies, wäre auch in unserem hier untersuchten *INS<sup>C94Y</sup>* tg Diabetesmodell eine Wirkung von MLC-2C als Transkriptionsfaktor prinzipiell denkbar. Dies ließe sich in weiteren Experimenten beispielsweise über Antikörper, welche die verschiedenen modifizierten Proteinvarianten spezifisch erkennen, nachweisen.

Obwohl der diabetische Phänotyp der *INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweine seinen Ursprung in der Fehlfaltung des Insulinproteins hat, ausgelöst durch die gentechnisch eingeschleuste Punktmutation, und damit das klassische Tiermodell für einen MIDY darstellt, gibt es Hinweise, dass *INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweine durchaus auch als Modell für T2DM geeignet wären. Denn auch bei dieser Diabetesform scheint letztlich die Anhäufung von fehlgefaltetem Proinsulin im endoplasmatischen Retikulum der  $\beta$ -Zellen für deren Apoptose verantwortlich zu sein (Arunagiri et al. 2019). Die Autoren wiesen *in vitro* sowohl in murinen Zelllinien als auch in humanen Inselzellen nach, dass in gesunden Individuen ebenfalls eine geringe Menge Proinsulin falsch gefaltet im endoplasmatischen Retikulum vorliegt (Arunagiri et al. 2019). Die gesteigerte Insulinproduktion als Reaktion auf die zunehmende Insulinresistenz peripherer Körpierzellen zu Beginn des T2DM, bedeutet gleichzeitig eine steigende Menge fehlgefalteten Proinsulins, genauso wie bei den *INS<sup>C94Y</sup>* tg Tieren von Geburt an (Renner et al. 2013). Möglicherweise kann das hier verwendete porcine MIDY-Modell sogar diese periphere Insulinresistenz des T2DM nachahmen. Denn der "Homeostasis model of assessment of

insulin resistance index" (HOMA-IR), bei dem aus Nüchternblutglukose und -insulin auf das Vorhandensein einer Insulinresistenz geschlossen wird, war bei den viereinhalb Monate alten */INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweinen im Vergleich zur Wildtypkontrolle signifikant erhöht, was auf eine bestehende Insulinresistenz hinweist (Renner et al. 2013).

Zusätzlich wurde in Mäusen mit einer entsprechenden Mutation (*/Ins2<sup>Akita</sup>-Maus*) *in vivo* über die – verglichen mit dem HOMA-IR – aufwändigeren hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp (HEC)-Technik nachgewiesen, dass die Tiere ebenfalls eine Insulinresistenz in Leber und Skelettmuskulatur entwickeln (Hong et al. 2007). Diese Goldstandard-Technik zur Bestimmung einer Insulinresistenz (Rudvik and Måansson 2018) ist im Schwein prinzipiell in gleicher Weise anwendbar. In einem anderen transgenen Diabetesmodell (*/INS<sup>C93S</sup>*) wurde so bereits bei tragenden */INS<sup>C93S</sup>* tg Sauen eine um 50% verminderte Insulinsensitivität nachgewiesen (Renner et al. 2019). Allerdings zeigten die im gleichen Stadium trächtigen Wildtypen ähnliche Werte im HEC-Test, weshalb davon auszugehen ist, dass die hier beobachtete Insulinresistenz auf die Trächtigkeit und nicht die chronische Hyperglykämie der transgenen Tiere zurückzuführen ist (Renner et al. 2019). Nachdem aber */INS<sup>C93S</sup>* tg Schweine eine eher milde Form der Hyperglykämie ausprägen und die Blutglukosewerte der */INS<sup>C94Y</sup>* tg Tiere verglichen mit denen des Wildtypen signifikant höher liegen (Renner et al. 2020), entsprechen die Blutwerte der C94Y-Genvariante viel eher den Verhältnissen der */Ins2<sup>Akita</sup>-Maus*-Studie (Hong et al. 2007). Es erscheint daher tatsächlich wahrscheinlich, dass bei */INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweinen generell eine progrediente Insulinresistenz auftritt, wie sie in der Erstbeschreibung dieses Modells bei den viereinhalb Monate alten Tieren bereits über den HOMA-IR ermittelt wurde (Renner et al. 2013).

Das würde bedeuten, dass die in unserer Studie mittels des */INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweinemodells gewonnenen, immunologischen Erkenntnisse zum abweichenden Verhalten der Granulozyten im frühen Stadium eines MIDY-Diabetes möglicherweise auch auf die Situation eines voll entwickelten T2DM übertragbar wären.

Allerdings zeigt eine aktuelle Multiomics-Studie bei der vergleichenden Analyse von Lebergewebe-Proben zweijähriger */INS<sup>C94Y</sup>* tg Tiere und passender Wildtypen, dass zwar der hepatische Metabolismus mit vermehrter Ketonkörperbildung und Lipolyse dem des Typ-2-Diabetikers stark ähnelt, aber zugleich Entzündungsparameter wie das C-reaktive Protein (CRP) bei den transgenen Tieren mit geringerer Abundanz nachgewiesen wurde als im Wildtypen (Backman et al. 2019). Dies steht im Gegensatz zu den Studien bei humanen Patienten, die selbst noch unter Insulintherapie, erhöhte CRP-Level im Plasma und generell einen systemisch-inflammatorische Zustand aufweisen (Alexandraki et al. 2008; Elimam et al. 2019; De Marañon et al. 2020). Es muss daher in weiteren Untersuchungen analysiert werden, inwieweit die zweijährigen */INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweine, die etwa von ihrem 50. Lebenstag an mit minimalen Insulindosen behandelt wurden und so die Auswirkungen eines schlecht

therapierten DM im Menschen simulieren, sich als Modell für das Immunsystem dieser Patientengruppe eignen.

Gerade weil die *INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweine neben der chronischen Hyperglykämie auch vermehrt Ketonkörper und freie Fettsäuren in ihrem Blut aufweisen (Blutke et al. 2017), sollte dabei der zelleigene Metabolismus der neutrophilen Granulozyten nicht außer Acht gelassen werden. Denn obwohl Neutrophile vorwiegend glykolytisch aktiv sind und die zur Aufrechterhaltung ihrer Funktionsfähigkeit benötigte Glukose über basal exprimierte, insulinunabhängige Glukosetransporter (GLUT1, GLUT3, GLUT4) aufnehmen, können sie auf Veränderungen der Umgebungsbedingungen oder des Aktivierungszustandes mit einer differenzierten Regulation ihres Metabolismus reagieren (zusammengefasst in (Kumar and Dikshit 2019)). So wurde in mehreren Studien bereits die Schwächung unterschiedlicher funktioneller Parameter der Neutrophilen mit den hyperglykämischen Bedingungen im Rahmen des DM in Zusammenhang gebracht (Wong et al. 2015; Perner et al. 2003). Über eine vergleichende Analyse des metabolischen Potentials der Neutrophilen aus den *INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweinen und passenden Kontrollen via Seahorse XFe24 Analyzer könnte man in einem ersten Schritt Aufschluss über mögliche Abweichungen des neutrophilen Stoffwechsels in den diabetischen Tieren gewinnen. Zur Beurteilung der funktionellen Auswirkungen einer hyperglykämischen Umgebung sind zunächst Versuche *in vitro* mit Neutrophilen gesunder Schweine und der Prüfung klassischer Granulozytenfunktionen wie Degranulation, Phagozytose, ROS- und NET-Bildung vorgesehen. Nachdem in diabetischen Mäusen als Reaktion auf eine Staphylokokkeninfektion vermehrt LDNs nachgewiesen wurden (Cohen et al. 2019) und generell nur vereinzelte Berichte zu dieser neutrophilen Subpopulation im Schwein existieren, wollen wir außerdem Untersuchungen zu Auftreten und möglichen funktionellen Eigenheiten der porcinen LDNs, sowohl in diabetischen als auch gesunden Tieren, vornehmen. Da neutrophile Granulozyten von diabetischen Patienten *in vitro* sowohl eine verminderte Expression mehrerer Chemokine (CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8) als Reaktion auf die Stimulation mit LPS (Lin et al. 2020b), als auch eine verstärkte Interaktion mit humanen Endothelzellen zeigten (De Marañon et al. 2020), sind darüber hinaus vergleichende Live-Cell-Imaging-Versuche zur Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten von *INS<sup>C94Y</sup>* tg Schweinen und Kontrolltieren geplant.

Anders als beim transgenen Diabetesmodell des Schweins, wo über den genetischen Hintergrund und die Haltung unter Versuchsbedingungen eine möglichst uniforme Tiergruppe geschaffen wird, spiegelt hingegen das Großtiermodell Pferd unserer zweiten Studie die große Diversität der menschlichen Bevölkerung wider, und damit auch die innerhalb der Gruppe potenzieller Patienten. Dies ist insofern bedeutsam, da die equine rezidivierende Uveitis (ERU) das einzige, bislang bekannte spontane Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen darstellt und den für die Erkrankung charakteristischen Verlauf aus wiederkehrenden

Entzündungsschüben, unterbrochen von symptomfreien Intervallen, aufweist (Deeg 2008; Malalana et al. 2015).

Zwar stellt die ERU nachweislich eine von autoreaktiven T-Zellen geprägte Autoimmunerkrankung dar (Kleinwort et al. 2016; Degroote et al. 2017; Wiedemann et al. 2020), dennoch wurden über den Vergleich von kranken und gesunden Tieren auch Veränderungen der Granulozyten aufgedeckt, die mit dieser Erkrankung in Zusammenhang stehen (Degroote et al. 2012; Degroote et al. 2013; Fingerhut et al. 2019). So ergab die Analyse einer gemischten Leukozytenpopulation mittels zweidimensionaler Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE) und anschließender massenspektrometrischer Identifikation der Spots insgesamt 17 differentiell exprimierte Proteine zwischen ERU-Tieren und den Kontrollen (Degroote et al. 2012). Da in den Vorarbeiten unserer Gruppe zu diesem Thema allerdings nur die spezielle LDN-Subpopulation berücksichtigt wurde, sollten in der aktuellen Studie die Zellen der NDN-Fraktion vergleichend analysiert werden, die sich bei der Blutpräparation mittels Dichtegradientenzentrifugation unterhalb des Trennmediums (Dichte 1,077 mg/dl) anreichern und für gewöhnlich schlicht als „Granulozyten“ bezeichnet werden.

Nachdem wir bei equinen Granulozyten kürzlich ebenfalls via LC-MS/MS nachweisen konnten, dass bereits nach 30-minütiger Stimulation Proteomveränderungen in den Zellen auftraten (Degroote et al. 2019), wurde in der aktuellen Studie auf eine weitere Aufreinigung der equinen Neutrophilen im Anschluss an die Dichtegradientenzentrifugation mittels positiver oder negativer Antikörper-vermittelten Selektion bewusst verzichtet. Dafür gab es zwei Gründe: Zum einen ist eine Aktivierung von Leukozyten durch die Interaktion mit den spezifischen, für die positive Selektion nötigen Antikörper möglich (Bhattacharjee et al. 2017), was artifizielle Proteomveränderungen zur Folge hätte und damit eine Abweichung vom Zustand *in vivo*. Zum anderen verhindert der Mangel passender, Zelltyp-spezifischer Antikörper für Großtiere, dass auf einen negativ selektierenden Assay zurückgegriffen werden konnte, bei dem die unmarkierten Zellen nachweislich kaum aktiviert werden (Bhattacharjee et al. 2017). Um bei der differentiellen Proteomanalyse auszuschließen, dass die gefundenen Unterschiede durch vermehrt in der PMN-Fraktion erkrankter Tiere vorhandene Eosinophile oder Basophile bedingt sind, wurde die Zusammensetzung der massenspektrometrisch analysierten Zellpopulation anhand eines Diff-Quick-gefärbten zytologischen Präparats mikroskopisch überprüft. Da Kontrollgruppe und ERU-Tieren keinen signifikanten Unterschied bei der relativen Menge der einzelnen Zelltypen aufwiesen, kann ein solcher Einfluss in unserer Studie ausgeschlossen werden. Insgesamt wurden in den Granulozyten der erkrankten und gesunden Pferde 2.362 Proteinen identifiziert, von denen 96 signifikante Abundanzunterschiede zwischen den beiden Gruppen aufwiesen (70 in ERU vs. 26 in gesunden Tieren höher abundante Proteine), was 4,1% des gesamten granulozytären Proteoms entspricht (Supplementary Table 1, Publikation II). Es ist zudem die erste

vollständige Beschreibung des Proteinprofils der Granulozyten im Pferd überhaupt (PubMed-Recherche, September 2020). Ziel dieser ersten umfassenden Studie zum equinen Granulozytenproteom im Rahmen der ERU war es, Hypothesen über die Art und Weise der Beteiligung dieser angeborenen Immunzelle an der Pathogenese der Erkrankung aufzustellen. Daher unterzogen wir die heterogen exprimierten Proteine einer sogenannten „Pathway-Enrichment-Analyse“, um einen Überblick der bei einer ERU veränderten granulozytären Reaktionswege zu gewinnen. Diese Form der proteomischen Datenauswertung erlaubt über einen Abgleich mit großen Pathway-Datenbanken die Einordnung einzelner differentiell exprimierter Proteine in übergeordnete biologische Prozesse. Die frei verfügbare Reactome Datenbank (<https://reactome.org>, Version 72) umfasst hierfür insgesamt 11.096 humane Proteine verknüpft zu 2.362 Pathways und bietet für das Resultat einer in ihr durchgeföhrten Pathway-Enrichment-Analyse zusätzlich verschiedene Möglichkeiten der graphischen Darstellung an (Jassal et al. 2020). Durch die Einbindung von 83.698 orthologen Proteinen weiterer Spezies war diese Open-Source-Software auch für die Analyse unserer equinen Proteomdaten geeignet. Wir führten zwei getrennte Pathway-Enrichment-Analysen mit den in der jeweiligen Gruppe signifikant höher abundanten Proteinen durch. Bei der anschließenden Auswertung konzentrierten wir uns auf die dem Immunsystem zugeordneten Reaktionswege, da für die Autoimmunerkrankung ERU hier am ehesten ein vom physiologischen Zustand der Kontrollen abweichendes Reaktionsmuster der Granulozyten zu erwarten war.

Die Analyse der in ERU erhöhten Proteine lieferte „Neutrophile Degranulation“ als Nummer eins unter den insgesamt 20 überrepräsentierten Immunsystem-Pathways (Supplementary Table 2, Publikation II). Passend dazu wurden auch im Bereich des vesikulären Transports einzelne, nicht-immunologische Reaktionswege als bei ERU hochreguliert identifiziert (Supplementary Fig. 1, Publikation II). Der Zusammenhang ergibt sich hier aus dem für die erfolgreiche Degranulation nötigen Transport der einzelnen Granula an die Plasmamembran (Masgrau-Alsina et al. 2020). Interessanterweise war dieser Bereich auch einer der wenigen, bei dem die Analyse der in ERU geringer abundanten Proteine eine Überrepräsentation einzelner Pathways zeigte (Supplementary Fig. 1, Publikation II). Das über die Darstellung der Analyseresultate mittels Voronoi-Diagrammen leicht vergleichbare Muster der überrepräsentierten Pathways zeigt deutlich, dass es im Bereich des vesikulären Transports bei den Granulozyten infolge der ERU-Erkrankung zu einer Verschiebung der vorrangig ablaufenden Reaktionen kommt.

Eine ähnliche Fokussierung auf die neutrophile Degranulation und vesikuläre Transportprozesse wird in Granulozyten gesunder Pferde durch die Stimulation mit PMA ausgelöst, wie wir erst kürzlich nachweisen konnten (Degroote et al. 2019). Zudem waren sieben der Proteine, deren Expression durch die PMA-Stimulation signifikant verstärkt wurde, auch in der aktuellen Studie unter den 51 identifizierten Kandidaten mit signifikanten

Abundanzunterschieden zwischen ERU- und Kontrollgruppe. Die Tatsache, dass alle sieben Proteine in der ERU-Gruppe höher abundant waren, zusammen mit dem ähnlichen Reaktionsmuster der Pathway-Enrichment-Analyse, deutet darauf hin, dass sich die Granulozyten bei ERU selbst im Ruhestadium der Erkrankung noch in einem latent aktivierte Zustand befinden. Unklar ist jedoch, ob dies lediglich eine Folge der T-Zell-getriebenen Entzündungsreaktion darstellt oder der veränderte Aktivierungszustand ein Beleg für die Beteiligung der Granulozyten an der Pathogenese der ERU ist. Mehrere Studien an murinen EAU-Modellen fanden eine okuläre Infiltration der Granulozyten in Abhängigkeit von einer primären T-Zellaktivierung und der damit verbundenen Zytokinsekretion (Pepple et al. 2015; Caspi et al. 1993; Kim et al. 2002). Allerdings machten je nach verwendetem EAU-Modell verschiedene Zellen den Hauptanteil der okulären Zellinfiltrate aus (Caspi 2008) und histologische Untersuchungen der Augen bei spontan an ERU erkrankten Pferden belegten ebenfalls, dass zwischen einzelnen Tieren teilweise erhebliche Unterschiede bei der Zusammensetzung der infiltrierenden Zellarten vorkommen (Deeg et al. 2001). Nachdem die in unserer Studie untersuchten Pferde der ERU-Gruppe sich zum Zeitpunkt der Probennahme jedoch nicht in einem akuten Stadium der Uveitis befanden, könnte der latente Aktivierungszustand ein intrinsisches Merkmal der Granulozyten im Rahmen der ERU darstellen.

Tatsächlich waren zahlreiche immunologische Pathways im proteomischen Datensatz der ERU-Tieren überrepräsentiert (20 von insgesamt 42 identifizierten; Table 2, Publikation II), was belegt, dass Granulozyten bei dieser Autoimmunerkrankung einen klar veränderten Phänotyp aufweisen. Die aktuelle Studie ergänzt damit die Beobachtungen der zuvor ebenfalls proteomisch untersuchten LDN-Subpopulation (Degroote et al. 2012). Obwohl von den 17 dort differentiell exprimierten Proteinen 16 im aktuellen Datensatz enthalten sind, weisen lediglich drei von ihnen auch in der jetzt analysierten NDN-Fraktion einen signifikanten Abundanzunterschied zwischen erkrankten Pferden und Kontrolltieren auf. Interessant dabei aber ist, dass bei acht der 16 Übereinstimmungen – darunter auch zwei der signifikanten Kandidaten – in der aktuellen Proteomanalyse ein umgekehrtes Verhältnis der Proteinabundanzen gefunden wurde. Man könnte daraus schließen, dass eine ERU-Erkrankung bei den beiden granulozytären Subpopulationen zu gegenläufigen Veränderungen ihrer Proteinexpression führt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Proteinquantifizierung der LDNs nicht massenspektrometrisch sondern mittels 2D-DIGE erfolgte und in der analysierten Zellfraktion auch etwa 50% Lymphozyten enthalten waren (Degroote et al. 2012). Beides erschwert die Vergleichbarkeit der zwei Studien, da sich nachweislich auch das lymphozytäre Proteom bei ERU signifikant vom physiologischen Zustand unterscheidet (Hauck et al. 2017). Gleichwohl wurde bereits zuvor ein unterschiedliches Verhalten equiner LDNs und NDNs auf funktioneller Ebene beim Vergleich

von asthmatischen Tiere mit gesunden Kontrollpferden beschrieben (Herteman et al. 2017). Somit könnte die detaillierte Charakterisierung der beiden granulozytären Subpopulationen im Rahmen der ERU durchaus ein vielversprechender Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sein, insbesondere wenn man berücksichtigt, dass equine LDNs verglichen mit autologen NDNs unabhängig von einer Erkrankung vermehrt NETs freisetzen (Herteman et al. 2017) und im Serum von ERU-Tieren NET-Marker signifikant erhöht waren (Fingerhut et al. 2019). Ob diese erhöhten Werte allein auf eine Vergrößerung der LDN-Population in den erkrankten Tieren zurückzuführen sind, muss über die systematische Erhebung der beiden Granulozytenfraktionen in einer möglichst großen Anzahl von Tieren geklärt werden.

Es bleibt die Frage, welche Rolle diese veränderten Granulozyten, unabhängig davon zu welcher Subpopulation sie gerechnet werden müssten, im Rahmen der ERU konkret spielen. Bei elf der 20 in der ERU-Gruppe überrepräsentierten Pathways war mindestens eines der zugehörigen Proteine eine Untereinheit des Proteasoms (Supplementary Table 2, Publikation II). Dies erscheint insofern plausibel, als dass der kontrollierte Proteinabbau über das Proteasom einen zentralen Mechanismus der zellulären Homöostase darstellt (Bett 2016) und damit auch Bestandteil vieler immunologischer Signalwegen ist. So sorgen die insgesamt sechs signifikant höher abundanten Proteasom-Untereinheiten beispielsweise für die Häufung der mit NF-κB in Verbindung stehenden Signalwege in den Granulozyten der ERU-Gruppe. Denn wie zuvor schon bei der Studie im Schwein erläutert, muss für eine Aktivierung des universellen Transkriptionsfaktors NF-κB der Abbau seines Inhibitorproteins IκBα erfolgen (Huang et al. 2000). Dass Ergebnisse der differentiellen Proteomanalyse der porcinen Granulozyten im Diabetes-Modell ebenfalls auf den NF-κB-Signalweg verweisen, unterstreicht seine zentrale, speziesübergreifende Bedeutung und deutet auf einen proinflammatorischen Charakter der Granulozyten als Gemeinsamkeit der beiden Pathologien DM und ERU hin.

Die Auswertung der equinen Proteomdaten in der Reactome Datenbank ergab allerdings einen weiteren, in Granulozyten bislang wenig untersuchten Pathway, der ebenfalls aufgrund der höheren Abundanz der Proteasom-Untereinheiten in den ERU-Tieren überrepräsentiert war: „Cross-presentation of soluble exogenous antigens“ (Supplementary Table 2, Publikation II). Der Mechanismus der Kreuz-Präsentation von Antigenen (engl. antigen cross-presentation, XPT) über MHC-I-Moleküle wurde ursprünglich bei professionellen antigenpräsentierenden Zellen entdeckt (Rock et al. 1990), scheint aber generell in allen Zellen mit der Fähigkeit zur Phagozytose verknüpft zu sein, wie Gentransferstudien bei normalerweise nicht-phagozytierenden Zellen belegen (Giodini et al. 2009). Dennoch wurde im Mausmodell für neutrophile Granulozyten *in vivo* nachgewiesen, dass sie mittels XPT zytotoxische T-Zellen zur Proliferation anregen können und dieser Vorgang Proteasom-abhängig ist (Beauvillain et al. 2007). Im Pferd hingegen wäre der Fund von Kreuz-präsentierenden Granulozyten eine neue, spannende Entdeckung, die dem Ergebnis unserer

Pathway-Enrichment-Analyse nach als durchaus wahrscheinlich angesehen werden kann. Sollte es zudem gelingen, bei an ERU erkrankten Tieren okuläre Autoantigene auf granulozytären MHC-I-Molekülen nachzuweisen, wäre man damit der Lösung des Rätsels, was die Aktivierung der letztlich krankheitsauslösenden T-Zellen in der Peripherie bewirkt, vermutlich ein ganzes Stück nähergekommen. Eine vergleichende Analyse des MHC-I-Peptidoms der equinen Granulozyten erscheint daher als ein vielversprechender Ansatz für weitere Forschungsprojekte zur Entschlüsselung der Pathogenese der ERU. Denn auch das für den rezidivierenden Charakter der ERU verantwortlich gemachte Epitop Spreading (Deeg et al. 2006a) ließe sich über den Mechanismus der XPT entsprechend erklären: So kommt es bei der initialen Entzündungsreaktion im Auge unweigerlich zur Freisetzung weiterer potenzieller Autoantigene aus zerstörten Gewebezellen, die von eingewanderten Granulozyten phagozytiert und anschließend wieder an ihrer Oberfläche präsentiert werden könnten. Nachdem die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten zur retrograden Transmigration als erwiesen angesehen werden kann (Wang et al. 2017), erscheint die XPT der zuvor aufgenommenen Proteine auch außerhalb des Auges prinzipiell möglich. Die in Mäusen über intravitales Imaging gemachte Beobachtung, dass neutrophile Granulozyten auch unter homöostatischen Bedingungen aus dem Gefäßsystem in Lymphknoten auswandern (Lok et al. 2019), deutet an, dass XPT durch Granulozyten bei Pferden auch im nicht akut-inflammatorischen Stadium der ERU denkbar ist. Womöglich ist in diesem Zusammenhang auch das Vorkommen intraokulärer Lymphfollikel bei erkrankten Pferden von Bedeutung, da die Kreuz-präsentierenden Granulozyten so rasch in Kontakt mit dort immunhistologisch nachgewiesenen Memory-T-Zellen kommen könnten (Kleinwort et al. 2016). Der Abbau des okulären Proteins über den in allen Zellen ablaufenden Proteasom-abhängigen Weg sorgt dafür, dass die entstehenden antigenen Peptidsequenzen identisch sind mit den auf den Zielzellen ebenfalls über MHC-I-Molekülen präsentierten autologen Peptiden (Colbert et al. 2020). Das würde bedeuten, dass potenzielle, autoreaktive Lymphozyten, einmal im Auge angekommen, unmittelbar an ihre antigene Zielstruktur binden könnten, auf die sie in der Peripherie via granulozytärem XPT geprägt wurden. Nicht erklärt werden kann damit allerdings, wieso sich die symptomfreien Intervalle der Erkrankung mitunter über Jahre erstrecken. Denn obwohl die Meinungen zur Lebensdauer von Granulozyten durchaus divergieren (Hidalgo et al. 2019), würde nur das Vorhandensein eines bislang unentdeckten „Memory-Granulozyten“, der über längere Zeit in einem inaktiven Zustand verbleibt, ein solches Szenario als tatsächlich möglich erscheinen lassen.

Einen viel konkreteren Ansatz zur möglichen Rolle der Granulozyten bei der Pathogenese der ERU liefert hingegen die nähere Betrachtung des Einzelproteins, das in unserer differentiellen Proteomanalyse den höchsten Abundanzunterschied bei den in der ERU-Gruppe vermehrten vorhandenen Proteinkandidaten aufwies: S100-A9 oder Calgranulin B. Dieses zur S100-

Proteinfamilie zählende,  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Molekül kommt für gewöhnlich als Heterodimer mit dem Protein S100-A8 (Calgranulin A) vor und bildet den sogenannten S100A8/A9-Komplex, häufig auch als Calprotectin bezeichnet. Erhöhte Calprotectin-Plasmawerte wurden bei Uveitis, unabhängig vom Subtyp, im Menschen mehrfach beschrieben und auf eine mögliche Eignung als Biomarker für die Erkrankungsaktivität hin untersucht (Olson et al. 1996; Walscheid et al. 2015; Song et al. 2019). Der Nachweis der erhöhten Proteinmenge von Calgranulin B in Granulozyten im Rahmen der Uveitis beim Pferd stellt hingegen einen neuen Befund dar. Zwar wurden zuvor bereits unterschiedliche inflammatorische Geschehen im Pferd mit erhöhten Calprotectin-Werten, sowohl lokal im Gewebe bei Hufrehe (Faleiros et al. 2009) als auch im Serum nach Reperfusion eines zuvor ischämischen Darmabschnittes (Grosche et al. 2013), in Zusammenhang gebracht, der Proteinkomplex fungierte hier aber vorrangig als allgemeiner Marker für neutrophile Granulozyten. Demnach scheint der S100A8/A9-Komplex beim Pferd eine ähnlich zentrale Position bei der Leukozytenrekrutierung und Zytokinsekretion im entzündeten Gewebe einzunehmen, wie sie im Menschen beschrieben wurde (zusammengefasst in (Wang et al. 2018)). Dort, sowie in einem entsprechenden Mausmodell, wurde anhand des systemischen Lupus erythematoses außerdem bereits nachgewiesen, dass Calgranulin B eine Autoimmunität induzieren kann (Loser et al. 2010). Denn bei der Inkubation einer Co-Kultur aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen und antigenpräsentierenden epidermalen Langerhans-Zellen mit Calgranulin B *in vitro* zeigte der entstandene, autoreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zelltyp eine höhere Sekretion des proinflammatorischen IL-17, als in der ohne Calgranulin B ausgekommenen Co-Kultur (Loser et al. 2010). Entscheidend war allerdings das Vorhandensein der Langerhans-Zellen, da die alleinige Inkubation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem S100-Protein diese nicht in Richtung Autoreaktivität entwickeln konnte (Loser et al. 2010). Nachdem die Bedeutung von Th17-Zellen bei der ERU noch weitgehend ungeklärt ist, in histologischen Präparaten bei erkrankten Tieren IL-17 aber bereits im Ziliarkörper nachgewiesen wurde (Regan et al. 2012), könnten Granulozyten über die Sekretion von Calgranulin B dort die T-Zellen proinflammatorisch beeinflussen. Der erste Schritt zur Bestätigung dieser Theorie wäre demnach die Bestimmung des S100A8/A9-Komplexes beziehungsweise seiner einzelnen Komponenten im Auge betroffener Pferde. Sowohl in einem induzierten Uveitismodell bei Ratten, als auch bei Kindern mit idiopathischer Uveitisform wurden diese Proteine im Kammerwasser bereits nachgewiesen (Pepple et al. 2015; Walscheid et al. 2015). Bei der vergleichenden Untersuchung der Kinder, die entweder an einer idiopathischen Uveitis anterior oder der juvenilen idiopathischen Arthritis-assoziierten Uveitis litten, waren im Kammerwasser die S100A8/A9-Werte selbst im inaktiven Stadium der Uveitis höher als bei den gesunden Probanden (Walscheid et al. 2015). Somit könnte für eine erste Analyse beim Pferd auch die bei der Vitrektomie routinemäßig gewonnene Glaskörperspülflüssigkeit geeignet sein, da diese Therapiemethode nur im nicht akuten

Stadium der ERU angewendet wird (Spiess 2010). Beim Einsatz einer hoch-sensitiven ELISA-Technik sollte dann trotz des Verdünnungseffekts, der durch die eingeleitete Spülflüssigkeit entsteht, ein Nachweis der S100-Proteine möglich sein.

Der S100A8/A9-Komplex verknüpft außerdem über seine Funktion als Ligand des TLR4 den adaptiven Teil des Immunsystems auf eine höchst bedeutsame Weise mit dem angeborenen Teil (Vogl et al. 2007). Auf die wichtige Rolle dieser als Alarmine bezeichneten endogenen TLR-Liganden im Zusammenhang mit Uveitiden wurde erst kürzlich verwiesen (Murakami et al. 2020).

Der Nachweis, dass der aus humanen Granulozyten aufgereinigte S100A8/A9-Komplex bei einem endothelialen Monolayer *in vitro* einen Verlust der zellulären Integrität verursacht (Viemann et al. 2005), könnte womöglich sogar bedeuten, dass Calgranulin B bei einem der Schlüsselereignisse der ERU-Pathogenese beteiligt ist, der Überwindung der Blut-Retina-Schranke. In einem ähnlichen Versuchsansatz mit humanen, umbilikalen Endothelzellen wurde für den Homodimer Calgranulin B eine Signaltransduktion via RAGE (*engl.* receptor for advanced glycation end products), anstatt des TLR4-Signalwegs beim Heterodimer Calprotectin, gefunden (Wang et al. 2014). Nachdem für Calgranulin A kein relevanter Abundanzunterschied beim Vergleich der ERU-Tiere mit den Kontrollen offensichtlich war, vermuten wir, dass mögliche Auswirkungen von Calgranulin B auf das Retinaendothel in ERU über eben jenen RAGE-Signalweg vermittelt werden. Beweise für eine erhöhte Permeabilität der Blut-Retina-Schranke im Zusammenhang mit diesem Signalweg existieren bereits aus Studien zur diabetischen Retinopathie, auch wenn dort anstelle des Calgranulin B „advanced glycation end products“ (AGEs), die eigentlichen Rezeptorliganden des RAGE, beschrieben wurden (Warboys et al. 2009; Xu et al. 2018). Unser Befund der höheren Expression von Calgranulin B in den Granulozyten der ERU-Tieren könnte daher einen ersten Anhaltspunkt liefern, auf welchem Weg das angeborene Immunsystem den inneren endothelialen Teil der für den immunprivilegierten Status des Auges so wichtigen Blut-Retina-Schranke attackiert. Es bleibt abschließend somit festzuhalten, dass wir durch die differentielle Proteomanalyse der equinen Granulozyten verschiedene Hinweise auf eine mögliche Rolle dieser Zellen bei der Pathogenese der ERU gewinnen konnten. Vor allem die Pathway-Enrichment-Analyse lieferte neue, unerwartete Wege zur potenziellen Beteiligung der Granulozyten, die es nun in zukünftigen Studien zu beweisen gilt. Calgranulin B als hochabundantes granulozytäres Protein, das über unterschiedliche Mechanismen einen systemischen Inflammationszustand auszulösen vermag, könnte hier eine ganz zentrale Bedeutung besitzen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Granulozyten bilden als aktiver Teil des angeborenen Immunsystems in allen Säugetieren die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen eingedrungene Pathogene. Zur Erfüllung dieser lebensnotwendigen Aufgabe verfügen die Zellen über unterschiedliche Abwehrmechanismen. Insbesondere neutrophile Granulozyten zeigen spezifische Reaktionsmuster auf die unterschiedlichen auslösenden Reize und besitzen eine ausgeprägte funktionelle Plastizität. Neben ihrer klassischen Abwehrrolle kommunizieren neutrophile Granulozyten eng mit Zellen des adaptiven Immunsystems und tragen so zur physiologischen Immunregulation bei. Dies erklärt, weshalb neutrophile Granulozyten bei einer Vielzahl von pathologischen Prozessen auf teils komplexe Weise involviert sind.

Ziel dieser Arbeit war es daher die in einem porcinen Tiermodell für Diabetes mellitus (DM) und bei der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) auftretenden Proteomveränderungen der Granulozyten im Großtiermodell Schwein beziehungsweise Pferd zu charakterisieren. Mittels label-freier LC-MS/MS konnte in beiden Fällen ein hochauflösendes Proteinprofil der Granulozyten erstellt werden, das die Auflösung der bis dahin verfügbaren granulozytären Datensätze für Schweine und Pferde deutlich übersteigt. Eine differentielle Proteomanalyse bildete anschließend die Basis, auf der die Beschreibung der zellulären Veränderungen in den beiden Erkrankungsmodellen erfolgte. Daraus wurden Hypothesen zu möglichen Mechanismen abgeleitet werden, über die Granulozyten an der Pathogenese der jeweiligen Erkrankung beteiligt sein könnten.

Als translationales Tiermodell für eine monogenetische Form des humanen DM entwickeln *INSC<sup>94Y</sup>* transgene Schweine bereits innerhalb der ersten Lebenswochen aufgrund einer gestörten Insulinsekretion einen stabilen diabetischen Phänotyp mit persistierender Hyperglykämie. Die Mechanismen, aufgrund derer diese chronische Hyperglykämie zu einer Beeinträchtigung der Immunfunktion führt, sind dabei in großen Teilen noch unverstanden. Daher wurden neutrophile Granulozyten der genetisch modifizierten Tiere und gleichaltriger Wildtypen vergleichend analysiert, um so die Rolle dieser Zellen in einem frühen Stadium der Erkrankung zu bestimmen. Von den 51 Kandidaten mit signifikanten Abundanzunterschieden zwischen den beiden Gruppen wiesen mehrere der in den diabetischen Tieren höher abundanten Proteine auf Veränderungen des neutrophilen Zytoskeletts hin. So wurde eine fünffach höhere Expression der regulatorischen, leichten Myosinkette 9 (MLC-2C) in den Neutrophilen der *INSC<sup>94Y</sup>* tg Schweinen sowohl in der Massenspektrometrie als auch über zytologische Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen. Als Bestandteil des nicht-muskulären Typ II Myosins greift MLC-2C direkt in die Zellkontraktilität ein und dadurch womöglich auch in die für die Funktionalität der Neutrophilen essentiellen Mechanismen der Zelladhäsion, -migration und Phagozytose. Mit der zusätzlichen Wirkung als

## Zusammenfassung

---

Transkriptionsfaktor kann MLC-2C, wie auch die Untereinheit 2 des COP9 Signalosoms (SGN2) – das Protein mit dem höchsten signifikanten Abundanzunterschied innerhalb des porcinen Datensatzes – das Proteom der Neutrophilen zudem über eine Regulation der Genexpression beeinflussen. Es ist denkbar, dass neutrophile Granulozyten über eben diesen Weg zum systemisch-inflammatorischen Milieu im Rahmen des DM beitragen. In weiteren Studien muss nun analysiert werden, inwieweit die aufgedeckten Proteomveränderungen der Neutrophilen sich in Abweichungen ihres funktionellen Phänotyps unter diabetischen Bedingungen äußern.

Die ERU stellt zwar nachweislich eine von autoreaktiven T-Zellen geprägte Autoimmunerkrankung dar, darüber hinaus wurden aber über den Vergleich von kranken und gesunden Pferden in Vorarbeiten bereits Veränderungen der Granulozyten aufgedeckt, die mit dieser Erkrankung in Zusammenhang stehen. In der aktuellen Studie zeigten 96 der insgesamt identifizierten 2.362 Proteine signifikante Abundanzunterschiede zwischen den beiden Gruppen, was 4,1% des gesamten hier beschriebenen, granulozytären Proteoms entspricht. Die anschließende Untersuchung des Datensatzes auf das Vorhandensein einzelner überrepräsentierter Stoffwechselwege lässt funktionelle Abweichungen der equinen Granulozyten selbst im symptomlosen Stadium der ERU vermuten. Der Nachweis einer im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 18-fache erhöhten Menge von Calgranulin B in den Granulozyten der ERU-Tiere, verknüpft mit der gefundenen Überrepräsentation der neutrophilen Degranulation in dieser Gruppe, liefert eine mögliche Erklärung, wie die Zellen die Integrität der Blut-Retina-Schranke beeinträchtigen und so die Migration aktiver Immunzellen in das Auge erleichtern könnten. Diese Theorie gilt es über Experimente an Zellkulturmodellen der Blut-Retina-Schranke *in vitro* zu prüfen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Erkenntnisse zum proteomischen Profil von porcinen und equinen Granulozyten dokumentieren Veränderungen der Immunzellen im Rahmen der beiden untersuchten Erkrankungen. Anhand der neu gewonnenen, hochauflösenden, proteomischen Datensätze lassen sich zudem interessante Forschungsansätze für weitere Studien zu Granulozyten entwickeln.

## 7 SUMMARY

As an active part of the mammalian innate immune system, granulocytes form the body's first line of defense against invading pathogens. To accomplish this essential task, these cells have different defense mechanisms. In particular, neutrophil granulocytes show specific reaction patterns to varying stimuli demonstrating a pronounced functional plasticity. Besides their classical defensive role, neutrophil granulocytes contribute to physiological immune regulation by close communication with cells of the adaptive immune system. This explains why neutrophil granulocytes are involved in a variety of pathological processes in sometimes complex ways.

Therefore, the aim of this work was to characterize proteome changes of granulocytes occurring in a porcine animal model for diabetes mellitus (DM) and in equine recurrent uveitis (ERU). By using label-free LC-MS/MS a high-resolution protein profile of these granulocytes was created in both large animal models, notably increasing the resolution of previously generated porcine and equine granulocyte data sets. Subsequent differential proteome analysis provided information on cellular changes in the two disease models. This allowed the postulation of hypotheses on possible mechanisms by which granulocytes might contribute to pathogenesis of the respective disease.

As translational animal model for a monogenetic form of human DM, *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs develop a stable diabetic phenotype with persistent hyperglycemia within the first weeks of life due to impaired insulin secretion. The mechanisms by which this chronic hyperglycemia leads to an impairment of immune function are largely still unknown. Therefore, neutrophil granulocytes of genetically modified animals and wild types of the same age were analyzed comparatively in order to determine the role of these cells at an early stage of the disease. Among the 51 proteins with significantly differing abundances differences between the two groups, several candidates showing higher abundance in the diabetic animals indicated changes in the neutrophil cytoskeleton. Thus, five-fold higher expression of the myosin regulatory light chain 9 (MLC-2C) in the neutrophils of *INS<sup>C94Y</sup>* transgenic pigs was detected in both mass spectrometry and immunofluorescence cytology. Directly affecting cellular contractility, MLC-2C, subunit of nonmuscular myosin II, also might interfere with cell adhesion, migration and phagocytosis, mechanisms essential for the functionality of neutrophils. Additionally acting as a transcription factor, MLC-2C, similar to COP9 signalosom subunit 2 (SGN2) – the protein with the highest significant abundance difference within the porcine data set – can also influence the proteome of the neutrophils by regulating gene expression. It is conceivable that neutrophil granulocytes contribute to the systemic-inflammatory environment related to DM via this very pathway. Further studies now need to evaluate to which extent the

## Summary

---

detected proteome changes in neutrophils reflect deviations of their functional phenotype under diabetic conditions.

Although ERU is an autoimmune disease evidently characterized by autoreactive T cells, changes in granulocytes related to this disease have already been detected in preliminary work. In the current study, 96 of the 2,362 identified proteins showed significant abundance differences between ERU group and controls, representing 4.1% of the total granulocyte proteome described here. Subsequent pathway enrichment analysis indicates functional deviations of the equine granulocytes even in quiescent stage of disease. The detection of calgranulin B with an 18-fold increase in granulocytes of ERU animals, which was linked to over-representation of neutrophil degranulation pathway in this group, provides a possible explanation of how these cells might affect integrity of the blood retina barrier facilitating the migration of activated immune cells into the eye. This theory needs to be tested *in vitro* by experiments on cell culture models of the blood retina barrier.

The findings on the proteomic profile of porcine and equine granulocytes presented here document changes in immune cells in the context of the two diseases studied. Additionally, the newly obtained, high-resolution proteomic data sets provide basis for further interesting research approaches to study granulocytes.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adelstein, R.S., and M. Anne Conti. 1975. 'Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity', *Nature*, 256: 597-98.
- Adrover, J.M., A. Aroca-Crevillen, G. Crainiciuc, F. Ostos, Y. Rojas-Vega, A. Rubio-Ponce, C. Cilloniz, E. Bonzon-Kulichenko, E. Calvo, D. Rico, M.A. Moro, C. Weber, I. Lizasoain, A. Torres, J. Ruiz-Cabello, J. Vazquez, and A. Hidalgo. 2020. 'Programmed 'disarming' of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation', *Nat Immunol*, 21: 135-44.
- Adrover, J.M., C. del Fresno, G. Crainiciuc, M.I. Cuartero, M. Casanova-Acebes, L.A. Weiss, H. Huerga-Encabo, C. Silvestre-Roig, J. Rossaint, I. Cossío, A.V. Lechuga-Vieco, J. García-Prieto, M. Gómez-Parrizas, J.A. Quintana, I. Ballesteros, S. Martin-Salamanca, A. Aroca-Crevillen, S.Z. Chong, M. Evrard, K. Balabanian, J. López, K. Bidzhekov, F. Bachelerie, F. Abad-Santos, C. Muñoz-Calleja, A. Zarbock, O. Soehnlein, C. Weber, L.G. Ng, C. Lopez-Rodriguez, D. Sancho, M.A. Moro, B. Ibáñez, and A. Hidalgo. 2019. 'A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection', *Immunity*, 50: 390-402.e10.
- Aebersold, R., and M. Mann. 2016. 'Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function', *Nature*, 537: 347-55.
- Agerberth, B., J. Charo, J. Werr, B. Olsson, F. Idali, L. Lindbom, R. Kiessling, H. Jornvall, H. Wigzell, and G.H. Gudmundsson. 2000. 'The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations', *Blood*, 96: 3086-93.
- Aigner, B., S. Renner, B. Kessler, N. Klymiuk, M. Kurome, A. Wunsch, and E. Wolf. 2010. 'Transgenic pigs as models for translational biomedical research', *J Mol Med (Berl)*, 88: 653-64.
- Alexandraki, K.I., C. Piperi, P.D. Ziakas, N.V. Apostolopoulos, K. Makrilakis, V. Syriou, E. Diamanti-Kandarakis, G. Kaltsas, and A. Kalofoutis. 2008. 'Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2: associations with low-grade systemic inflammation', *J Clin Immunol*, 28: 314-21.
- Allen, L.H., and A.K. Criss. 2019. 'Cell intrinsic functions of neutrophils and their manipulation by pathogens', *Curr Opin Immunol*, 60: 124-29.
- Altstaedt, J., H. Kirchner, and L. Rink. 1996. 'Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8', *Immunology*, 89: 563-68.
- Alves, C.R.R., W.d. Neves, N.R. de Almeida, E.J. Eichelberger, P.R. Jannig, V.A. Voltarelli, G.C. Tobias, L.R.G. Bechara, D. de Paula Faria, M.J.N. Alves, L. Hagen, A. Sharma, G. Slupphaug, J.B.N. Moreira, U. Wisloff, M.F. Hirshman, C.E. Negrão, G. de Castro, Jr., R. Chammas, K.J. Swoboda, J.L. Ruas, L.J. Goodyear, and P.C. Brum. 2020. 'Exercise training reverses cancer-induced oxidative stress and decrease in muscle COPS2/TRIP15/ALIEN', *Mol Metab*, 39: 101012.
- Aroca-Crevillen, A., J.M. Adrover, and A. Hidalgo. 2020. 'Circadian Features of Neutrophil Biology', *Front Immunol*, 11: 576.

- Arunagiri, A., L. Haataja, A. Pottekat, F. Pamenan, S. Kim, L.M. Zeltser, A.W. Paton, J.C. Paton, B. Tsai, P. Itkin-Ansari, R.J. Kaufman, M. Liu, and P. Arvan. 2019. 'Proinsulin misfolding is an early event in the progression to type 2 diabetes', *eLife*, 8: e44532.
- Association, A.D. 2020. '2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020', *Diabetes Care*, 43: S14-31.
- Avolio, E., P. Gualtieri, L. Romano, C. Pecorella, S. Ferraro, G. Palma, L. Di Renzo, and A. De Lorenzo. 2020. 'Obesity and Body Composition in Man and Woman: Associated Diseases and the New Role of Gut Microbiota', *Curr Med Chem*, 27: 216-29.
- Backman, M., F. Flenkenthaler, A. Blutke, M. Dahlhoff, E. Landstrom, S. Renner, J. Philippou-Massier, S. Krebs, B. Rathkolb, C. Prehn, M. Grzybek, U. Coskun, M. Rothe, J. Adamski, M.H. de Angelis, R. Wanke, T. Frohlich, G.J. Arnold, H. Blum, and E. Wolf. 2019. 'Multi-omics insights into functional alterations of the liver in insulin-deficient diabetes mellitus', *Mol Metab*, 26: 30-44.
- Bateman, N.W., S.P. Goulding, N.J. Shulman, A.K. Gadok, K.K. Szumlinski, M.J. MacCoss, and C.C. Wu. 2014. 'Maximizing peptide identification events in proteomic workflows using data-dependent acquisition (DDA)', *Mol Cell Proteomics*, 13: 329-38.
- Beauvillain, C., Y. Delneste, M. Scotet, A. Peres, H. Gascan, P. Guermonprez, V. Barnaba, and P. Jeannin. 2007. 'Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo', *Blood*, 110: 2965-73.
- Bebu, I., B.H. Braffett, D. Schade, W. Sivitz, J.I. Malone, R. Pop-Busui, G.M. Lorenzi, P. Lee, V.R. Trapani, A. Wallia, W.H. Herman, and J.M. Lachin. 2020. 'An Observational Study of the Equivalence of Age and Duration of Diabetes to Glycemic Control Relative to the Risk of Complications in the Combined Cohorts of the DCCT/EDIC Study', *Diabetes Care*, 43: 2478-84.
- Beck, M., M. Claassen, and R. Aebersold. 2011. 'Comprehensive proteomics', *Curr Opin Biotechnol*, 22: 3-8.
- Bett, John S. 2016. 'Proteostasis regulation by the ubiquitin system', *Essays Biochem*, 60: 143-51.
- Bhattacharjee, J., B. Das, A. Mishra, P. Sahay, and P. Upadhyay. 2017. 'Monocytes isolated by positive and negative magnetic sorting techniques show different molecular characteristics and immunophenotypic behaviour', *F1000Res*, 6: 2045.
- Bierhaus, A., S. Schiekofer, M. Schwaninger, M. Andrassy, P.M. Humpert, J. Chen, M. Hong, T. Luther, T. Henle, I. Klöting, M. Morcos, M. Hofmann, H. Tritschler, B. Weigle, M. Kasper, M. Smith, G. Perry, A.-M. Schmidt, D.M. Stern, H.-U. Häring, E. Schleicher, and P.P. Nawroth. 2001. 'Diabetes-Associated Sustained Activation of the Transcription Factor Nuclear Factor-κB', *Diabetes*, 50: 2792-808.
- Bishay, R.H., and J.R. Greenfield. 2016. 'A review of maturity onset diabetes of the young (MODY) and challenges in the management of glucokinase-MODY', *Med J Aust*, 205: 480-85.
- Biswas, S.K., and A. Mantovani. 2010. 'Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm', *Nat Immunol*, 11: 889-96.

- Blutke, A., S. Renner, F. Flenkenthaler, M. Backman, S. Haesner, E. Kemter, E. Ländström, C. Braun-Reichhart, B. Albl, E. Streckel, B. Rathkolb, C. Prehn, A. Palladini, M. Grzybek, S. Krebs, S. Bauersachs, A. Bähr, A. Brühschwein, C.A. Deeg, E. De Monte, M. Dmochewitz, C. Eberle, D. Emrich, R. Fux, F. Groth, S. Gumbert, A. Heitmann, A. Hinrichs, B. Keßler, M. Kurome, M. Leipzig-Rudolph, K. Matiasek, H. Öztürk, C. Otdorff, M. Reichenbach, H.D. Reichenbach, A. Rieger, B. Rieseberg, M. Rosati, M.N. Saucedo, A. Schleicher, M.R. Schneider, K. Simmet, J. Steinmetz, N. Übel, P. Zehetmaier, A. Jung, J. Adamski, Ü. Coskun, M. Hrabě de Angelis, C. Simmet, M. Ritzmann, A. Meyer-Lindenberg, H. Blum, G.J. Arnold, T. Fröhlich, R. Wanke, and E. Wolf. 2017. 'The Munich MIDY Pig Biobank – A unique resource for studying organ crosstalk in diabetes', *Mol Metab*, 6: 931-40.
- Boh, B.K., P.G. Smith, and T. Hagen. 2011. 'Neddylation-induced conformational control regulates cullin RING ligase activity in vivo', *J Mol Biol*, 409: 136-45.
- Boles, A., R. Kandimalla, and P.H. Reddy. 2017. 'Dynamics of diabetes and obesity: Epidemiological perspective', *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863: 1026-36.
- Bonifacio, E., A. Beyerlein, M. Hippich, C. Winkler, K. Vehik, M.N. Weedon, M. Laimighofer, A.T. Hattersley, J. Krumsiek, B.I. Frohnert, A.K. Steck, W.A. Hagopian, J.P. Krischer, Å. Lernmark, M.J. Rewers, J.X. She, J. Toppari, B. Akolkar, R.A. Oram, S.S. Rich, and A.G. Ziegler. 2018. 'Genetic scores to stratify risk of developing multiple islet autoantibodies and type 1 diabetes: A prospective study in children', *PLoS Med*, 15: e1002548.
- Borregaard, N. 2010. 'Neutrophils, from marrow to microbes', *Immunity*, 33: 657-70.
- Borregaard, N., and J.B. Cowland. 1997. 'Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte', *Blood*, 89: 3503-21.
- Borregaard, N., L. Kjeldsen, K. Rygaard, L. Bastholm, M.H. Nielsen, H. Sengeløv, O.W. Bjerrum, and A.H. Johnsen. 1992. 'Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils', *J Clin Invest*, 90: 86-96.
- Branzk, N., A. Lubojemska, S.E. Hardison, Q. Wang, M.G. Gutierrez, G.D. Brown, and V. Papayannopoulos. 2014. 'Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens', *Nat Immunol*, 15: 1017-25.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. 'Neutrophil extracellular traps kill bacteria', *Science*, 303: 1532-35.
- Bronte, V., S. Brandau, S.-H. Chen, M.P. Colombo, A.B. Frey, T.F. Greten, S. Mandruzzato, P.J. Murray, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg, P.C. Rodriguez, A. Sica, V. Umansky, R.H. Vonderheide, and D.I. Gabrilovich. 2016. 'Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards', *Nat Commun*, 7: 12150.
- Bruderer, R., O.M. Bernhardt, T. Gandhi, Y. Xuan, J. Sondermann, M. Schmidt, D. Gomez-Varela, and L. Reiter. 2017. 'Optimization of Experimental Parameters in Data-Independent Mass Spectrometry Significantly Increases Depth and Reproducibility of Results', *Mol Cell Proteomics*, 16: 2296-309.

- Buurman, W.A., P.A. Vegt, G. Groenewegen, C.J. van der Linden, and G.M. Jeunhomme. 1982. 'Analysis of buoyant density of canine peripheral blood leukocytes with PVP-Silica (Percoll) density gradients', *Vet Immunol Immunopathol*, 3: 547-56.
- Calderon, B., A. Suri, X.O. Pan, J.C. Mills, and E.R. Unanue. 2008. 'IFN-gamma-dependent regulatory circuits in immune inflammation highlighted in diabetes', *J Immunol*, 181: 6964-74.
- Carlsson, A., M. Shepherd, S. Ellard, M. Weedon, Å. Lernmark, G. Forsander, K. Colclough, Q. Brahimi, C. Valtonen-Andre, S.A. Ivarsson, H. Elding Larsson, U. Samuelsson, E. Örtqvist, L. Groop, J. Ludvigsson, C. Marcus, and A.T. Hattersley. 2020. 'Absence of Islet Autoantibodies and Modestly Raised Glucose Values at Diabetes Diagnosis Should Lead to Testing for MODY: Lessons From a 5-Year Pediatric Swedish National Cohort Study', *J Diabetes Care*, 43: 82-89.
- Carmona-Rivera, C., W. Zhao, S. Yalavarthi, and M.J. Kaplan. 2015. 'Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2', *Ann Rheum Dis*, 74: 1417-24.
- Casanova-Acebes, M., J.A. Nicolás-Ávila, J.L. Li, S. García-Silva, A. Balachander, A. Rubio-Ponce, L.A. Weiss, J.M. Adrover, K. Burrows, N. A-González, I. Ballesteros, S. Devi, J.A. Quintana, G. Crainiciuc, M. Leiva, M. Gunzer, C. Weber, T. Nagasawa, O. Soehnlein, M. Merad, A. Mortha, L.G. Ng, H. Peinado, and A. Hidalgo. 2018. 'Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues', *J Exp Med*, 215: 2778-95.
- Casanova-Acebes, M., C. Pitaval, L.A. Weiss, C. Nombela-Arrieta, R. Chèvre, A.G. N, Y. Kunisaki, D. Zhang, N. van Rooijen, L.E. Silberstein, C. Weber, T. Nagasawa, P.S. Frenette, A. Castrillo, and A. Hidalgo. 2013. 'Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance', *Cell*, 153: 1025-35.
- Caspi, R. 2008. 'Autoimmunity in the immune privileged eye: pathogenic and regulatory T cells', *Immunol Res*, 42: 41-50.
- Caspi, R.R., C.C. Chan, Y. Fujino, F. Najafian, S. Grover, C.T. Hansen, and R.L. Wilder. 1993. 'Recruitment of antigen-nonspecific cells plays a pivotal role in the pathogenesis of a T cell-mediated organ-specific autoimmune disease, experimental autoimmune uveoretinitis', *J Neuroimmunol*, 47: 177-88.
- Caspi, R.R., F.G. Roberge, C.G. McAllister, M. el-Sayed, T. Kuwabara, I. Gery, E. Hanna, and R.B. Nussenblatt. 1986. 'T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat', *J Immunol*, 136: 928-33.
- Cassatella, M.A. 2017. 'Human mature neutrophils as atypical APC', *Blood*, 129: 1895-96.
- Cassatella, M.A., N.K. Ostberg, N. Tamassia, and O. Soehnlein. 2019. 'Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines', *Trends Immunol*, 40: 648-64.
- Castanheira, F.V.S., and P. Kubes. 2019. 'Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation', *Blood*, 133: 2178-85.
- Caster, D.J., E.A. Korte, M. Tan, M.T. Barati, S. Tandon, T.M. Creed, D.J. Salant, J.L. Hata, P.N. Epstein, H. Huang, D.W. Powell, and K.R. McLeish. 2018. 'Neutrophil exocytosis

- induces podocyte cytoskeletal reorganization and proteinuria in experimental glomerulonephritis', *Am J Physiol Renal Physiol*, 315: F595-606.
- Catz, S.D., and K.R. McLeish. 2020. 'Therapeutic targeting of neutrophil exocytosis', *J Leukoc Biol*, 107: 393-408.
- Chen, L., B. Ge, F.P. Casale, L. Vasquez, T. Kwan, D. Garrido-Martin, S. Watt, Y. Yan, K. Kundu, S. Ecker, A. Datta, D. Richardson, F. Burden, D. Mead, A.L. Mann, J.M. Fernandez, S. Rowlston, S.P. Wilder, S. Farrow, X. Shao, J.J. Lambourne, A. Redensek, C.A. Albers, V. Amstislavskiy, S. Ashford, K. Berentsen, L. Bomba, G. Bourque, D. Bujold, S. Busche, M. Caron, S.H. Chen, W. Cheung, O. Delaneau, E.T. Dermitzakis, H. Elding, I. Colgiu, F.O. Bagger, P. Flicek, E. Habibi, V. Iotchkova, E. Janssen-Megens, B. Kim, H. Lehrach, E. Lowy, A. Mandoli, F. Matarese, M.T. Maurano, J.A. Morris, V. Pancaldi, F. Pourfarzad, K. Rehnstrom, A. Rendon, T. Risch, N. Sharifi, M.M. Simon, M. Sultan, A. Valencia, K. Walter, S.Y. Wang, M. Frontini, S.E. Antonarakis, L. Clarke, M.L. Yaspo, S. Beck, R. Guigo, D. Rico, J.H.A. Martens, W.H. Ouwehand, T.W. Kuijpers, D.S. Paul, H.G. Stunnenberg, O. Stegle, K. Downes, T. Pastinen, and N. Soranzo. 2016. 'Genetic Drivers of Epigenetic and Transcriptional Variation in Human Immune Cells', *Cell*, 167: 1398-414 e24.
- Chiaradia, E., and I. Miller. 2020. 'In slow pace towards the proteome of equine body fluids', *J Proteomics*, 225: 103880.
- Chibber, R., and A.G. Castle. 1983. 'Biochemical characterisation of porcine polymorphonuclear leucocytes: Comparison with human polymorphonuclear leucocytes', *Comp Biochem Physiol B*, 75: 335-40.
- Chow, E.Y.K., and J.C.N. Chan. 2020. 'Insulin resistance versus beta-cell dysfunction in type 2 diabetes: where public and personalised health meet', *Lancet Diabetes Endocrinol*, 8: 92-93.
- Christoffersson, G., and M. Phillipson. 2018. 'The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas?', *Cell Tissue Res*, 371: 415-23.
- Christoffersson, G., E. Vågesjö, J. Vandooren, M. Lidén, S. Massena, R.B. Reinert, M. Brissova, A.C. Powers, G. Opdenakker, and M. Phillipson. 2012. 'VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue', *Blood*, 120: 4653-62.
- Clancy, D.M., G.P. Sullivan, H.B.T. Moran, C.M. Henry, E.P. Reeves, N.G. McElvaney, E.C. Lavelle, and S.J. Martin. 2018. 'Extracellular Neutrophil Proteases Are Efficient Regulators of IL-1, IL-33, and IL-36 Cytokine Activity but Poor Effectors of Microbial Killing', *Cell Rep*, 22: 2937-50.
- Cloutier, A., T. Ear, E. Blais-Charron, C.M. Dubois, and P.P. McDonald. 2007. 'Differential involvement of NF-κB and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils', *J Leukoc Biol*, 81: 567-77.
- Cohen, T.S., V. Takahashi, J. Bonnell, A. Tovchigrechko, R. Chaerkady, W. Yu, O. Jones-Nelson, Y. Lee, R. Raja, S. Hess, C.K. Stover, J.J. Worthington, M.A. Travis, and B.R. Sellman. 2019. 'Staphylococcus aureus drives expansion of low-density neutrophils in diabetic mice', *J Clin Invest*, 129: 2133-44.

- Colbert, J.D., F.M. Cruz, and K.L. Rock. 2020. 'Cross-presentation of exogenous antigens on MHC I molecules', *Curr Opin Immunol*, 64: 1-8.
- Czech, M.P. 2017. 'Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes', *Nat Med*, 23: 804-14.
- De Filippo, K., and S.M. Rankin. 2018. 'CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in homeostasis and disease', *Eur J Clin Invest*, 48 Suppl 2: e12949.
- De Franco, E., S.E. Flanagan, J.A. Houghton, H. Lango Allen, D.J. Mackay, I.K. Temple, S. Ellard, and A.T. Hattersley. 2015. 'The effect of early, comprehensive genomic testing on clinical care in neonatal diabetes: an international cohort study', *Lancet*, 386: 957-63.
- De Franco, E., C. Saint-Martin, K. Brusgaard, A.E. Knight Johnson, L. Aguilar-Bryan, P. Bowman, J.-B. Arnoux, A.R. Larsen, M. Sanyoura, S.A.W. Greeley, R. Calzada-León, B. Harman, J.A.L. Houghton, E. Nishimura-Meguro, T.W. Laver, S. Ellard, D. del Gaudio, H.T. Christesen, C. Bellanné-Chantelot, and S.E. Flanagan. 2020. 'Update of variants identified in the pancreatic β-cell KATP channel genes KCNJ11 and ABCC8 in individuals with congenital hyperinsulinism and diabetes', *Hum Mutat*, 41: 884-905.
- De Marañon, A.M., F. Iannantuoni, Z. Abad-Jiménez, F. Canet, P. Díaz-Pozo, S. López-Domènech, A. Jover, C. Morillas, G. Mariño, N. Apostolova, M. Rocha, and V.M. Victor. 2020. 'Relationship between PMN-endothelium interactions, ROS production and Beclin-1 in type 2 diabetes', *Redox Biol*, 34: 101563.
- De, Y., Q. Chen, A.P. Schmidt, G.M. Anderson, J.M. Wang, J. Wooters, J.J. Oppenheim, and O. Chertov. 2000. 'LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells', *J Exp Med*, 192: 1069-74.
- Deeg, C.A. 2008. 'Ocular immunology in equine recurrent uveitis', *Vet Ophthalmol*, 11 Suppl 1: 61-65.
- Deeg, C.A., B. Amann, A.J. Raith, and B. Kaspers. 2006a. 'Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47: 652-56.
- Deeg, C.A., M. Ehrenhofer, S.R. Thurau, S. Reese, G. Wildner, and B. Kaspers. 2002a. 'Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses', *Exp Eye Res*, 75: 127-33.
- Deeg, C.A., S.M. Hauck, B. Amann, E. Kremmer, M. Stangassinger, and M. Ueffing. 2007a. 'Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis', *Mol Immunol*, 44: 3291-96.
- Deeg, C.A., B. Kaspers, H. Gerhards, S.R. Thurau, B. Wollanke, and G. Wildner. 2001. 'Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42: 393-98.
- Deeg, C.A., D. Pompetzki, A.J. Raith, S.M. Hauck, B. Amann, S. Suppmann, T.W. Goebel, U. Olazabal, H. Gerhards, S. Reese, M. Stangassinger, B. Kaspers, and M. Ueffing. 2006b. 'Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis', *Mol Cell Proteomics*, 5: 1462-70.

- Deeg, C.A., A.J. Raith, B. Amann, J.W. Crabb, S.R. Thurau, S.M. Hauck, M. Ueffing, G. Wildner, and M. Stangassinger. 2007b. 'CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis', *Clin Dev Immunol*, 2007: 39245.
- Deeg, C.A., S.R. Thurau, H. Gerhards, M. Ehrenhofer, G. Wildner, and B. Kaspers. 2002b. 'Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease', *Eur J Immunol*, 32: 2598-606.
- Degroote, R.L., S.M. Hauck, B. Amann, S. Hirmer, M. Ueffing, and C.A. Deeg. 2014. 'Unraveling the equine lymphocyte proteome: differential septin 7 expression associates with immune cells in equine recurrent uveitis', *PLoS One*, 9: e91684.
- Degroote, R.L., S.M. Hauck, E. Kremmer, B. Amann, M. Ueffing, and C.A. Deeg. 2012. 'Altered expression of talin 1 in peripheral immune cells points to a significant role of the innate immune system in spontaneous autoimmune uveitis', *J Proteomics*, 75: 4536-44.
- Degroote, R.L., S.M. Hauck, G. Treutlein, B. Amann, K.J.H. Fröhlich, E. Kremmer, J. Merl, M. Stangassinger, M. Ueffing, and C.A. Deeg. 2013. 'Expression Changes and Novel Interaction Partners of Talin 1 in Effector Cells of Autoimmune Uveitis', *J Proteome Res*, 12: 5812-19.
- Degroote, R.L., P.B. Uhl, B. Amann, A.M. Krackhardt, M. Ueffing, S.M. Hauck, and C.A. Deeg. 2017. 'Formin like 1 expression is increased on CD4+ T lymphocytes in spontaneous autoimmune uveitis', *J Proteomics*, 154: 102-08.
- Degroote, R.L., M. Weigand, S.M. Hauck, and C.A. Deeg. 2019. 'IL8 and PMA Trigger the Regulation of Different Biological Processes in Granulocyte Activation', *Front Immunol*, 10: 3064.
- Delclaux, C., C. Delacourt, M.P. D'Ortho, V. Boyer, C. Lafuma, and A. Harf. 1996. 'Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 14: 288-95.
- Denny, M.F., S. Yalavarthi, W. Zhao, S.G. Thacker, M. Anderson, A.R. Sandy, W.J. McCune, and M.J. Kaplan. 2010. 'A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs', *J Immunol*, 184: 3284-97.
- Devi, S., Y. Wang, W.K. Chew, R. Lima, N. A-González, C.N.Z. Mattar, S.Z. Chong, A. Schlitzer, N. Bakoczevic, S. Chew, J.L. Keeble, C.C. Goh, J.L.Y. Li, M. Evrard, B. Malleret, A. Larbi, L. Renia, M. Haniffa, S.M. Tan, J.K.Y. Chan, K. Balabanian, T. Nagasawa, F. Bachelerie, A. Hidalgo, F. Ginhoux, P. Kubes, and L.G. Ng. 2013. 'Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow', *J Exp Med*, 210: 2321-36.
- Di Dedda, C., D. Vignali, L. Piemonti, and P. Monti. 2019. 'Pharmacological Targeting of GLUT1 to Control Autoreactive T Cell Responses', *Int J Mol Sci*, 20: 4962.
- Di Nardo, A., M.H. Braff, K.R. Taylor, C. Na, R.D. Granstein, J.E. McInturff, S. Krutzik, R.L. Modlin, and R.L. Gallo. 2007. 'Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization', *J Immunol*, 178: 1829-34.

- DiMeglio, L.A., C. Evans-Molina, and R.A. Oram. 2018. 'Type 1 diabetes', *Lancet*, 391: 2449-62.
- Dongre, A.R., J.K. Eng, and J.R. Yates, 3rd. 1997. 'Emerging tandem-mass-spectrometry techniques for the rapid identification of proteins', *Trends Biotechnol*, 15: 418-25.
- Dressel, U., D. Thormeyer, B. Altincicek, A. Paululat, M. Eggert, S. Schneider, S.P. Tenbaum, R. Renkawitz, and A. Banahmad. 1999. 'Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily', *Mol Cell Biol*, 19: 3383-94.
- Dubiel, W., S. Chaithongyot, D. Dubiel, and M. Naumann. 2020. 'The COP9 Signalosome: A Multi-DUB Complex', *Biomolecules*, 10: 1082.
- Dupree, E.J., M. Jayathirtha, H. Yorkey, M. Mihasan, B.A. Petre, and C.C. Darie. 2020. 'A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field', *Proteomes*, 8: 14.
- Eash, K.J., A.M. Greenbaum, P.K. Gopalan, and D.C. Link. 2010. 'CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow', *J Clin Invest*, 120: 2423-31.
- Ecker, S., L. Chen, V. Pancaldi, F.O. Bagger, J.M. Fernandez, E. Carrillo de Santa Pau, D. Juan, A.L. Mann, S. Watt, F.P. Casale, N. Sidiropoulos, N. Rapin, A. Merkel, B. Consortium, H.G. Stunnenberg, O. Stegle, M. Frontini, K. Downes, T. Pastinen, T.W. Kuijpers, D. Rico, A. Valencia, S. Beck, N. Soranzo, and D.S. Paul. 2017. 'Genome-wide analysis of differential transcriptional and epigenetic variability across human immune cell types', *Genome Biol*, 18: 18.
- Ehrlich, P. 1879. 'Ueber die specifischen Granulationen des Blutes', *Archiv für Anatomie und Physiologie. Physiologische Abteilung*: 571-79.
- Elimam, H., A.M. Abdulla, and I.M. Taha. 2019. 'Inflammatory markers and control of type 2 diabetes mellitus', *Diabetes Metab Syndr*, 13: 800-04.
- Ella, K., R. Csépányi-Kömi, and K. Káldi. 2016. 'Circadian regulation of human peripheral neutrophils', *Brain Behav Immun*, 57: 209-21.
- Esnault, S., and E.A. Kelly. 2016. 'Essential Mechanisms of Differential Activation of Eosinophils by IL-3 Compared to GM-CSF and IL-5', *Crit Rev Immunol*, 36: 429-44.
- Evrard, M., I.W.H. Kwok, S.Z. Chong, K.W.W. Teng, E. Becht, J. Chen, J.L. Sieow, H.L. Penny, G.C. Ching, S. Devi, J.M. Adrover, J.L.Y. Li, K.H. Liong, L. Tan, Z. Poon, S. Foo, J.W. Chua, I.H. Su, K. Balabanian, F. Bachelerie, S.K. Biswas, A. Larbi, W.Y.K. Hwang, V. Madan, H.P. Koeffler, S.C. Wong, E.W. Newell, A. Hidalgo, F. Ginhoux, and L.G. Ng. 2018. 'Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions', *Immunity*, 48: 364-79.e8.
- Faleiros, R.R., G.J. Nuovo, and J.K. Belknap. 2009. 'Calprotectin in Myeloid and Epithelial Cells of Laminae from Horses with Black Walnut Extract-Induced Laminitis', *J Vet Intern Med*, 23: 174-81.

- Fang, J.Y., C.H. Lin, T.H. Huang, and S.Y. Chuang. 2019. 'In Vivo Rodent Models of Type 2 Diabetes and Their Usefulness for Evaluating Flavonoid Bioactivity', *Nutrients*, 11: 530.
- Federation, I.D. 2019. 'IDF Diabetes Atlas', *International Diabetes Federation (IDF), Brüssel*.
- Fingerhut, L., G. Dolz, and N. de Buhr. 2020. 'What Is the Evolutionary Fingerprint in Neutrophil Granulocytes?', *Int J Mol Sci*, 21: 4523.
- Fingerhut, L., B. Ohnesorge, M. von Borstel, A. Schumski, K. Strutzberg-Minder, M. Morgelin, C.A. Deeg, H.P. Haagsman, A. Beineke, M. von Kockritz-Blickwede, and N. de Buhr. 2019. 'Neutrophil Extracellular Traps in the Pathogenesis of Equine Recurrent Uveitis (ERU)', *Cells*, 8: 1528.
- Fischer, B.M., R.J. McMullen, S. Reese, and W. Brehm. 2019. 'Intravitreal injection of low-dose gentamicin for the treatment of recurrent or persistent uveitis in horses: Preliminary results', *BMC Vet Res*, 15: 29.
- Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J.J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, B. Das Mahapatra, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchereau, and S. Lebecque. 1996. 'T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines', *J Exp Med*, 183: 2593-603.
- Freer, H., J.M. Hillegas, C. Wimer, C. Baldwin, J. LaBresh, and B. Wagner. 2017. 'A monoclonal antibody for detection of intracellular and secreted interleukin-2 in horses', *Vet Immunol Immunopathol*, 191: 30-35.
- Fridlender, Z.G., J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G.S. Worthen, and S.M. Albelda. 2009. 'Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN', *Cancer Cell*, 16: 183-94.
- Fu, Z., S. Akula, M. Thorpe, and L. Hellman. 2020. 'Potent and Broad but not Unselective Cleavage of Cytokines and Chemokines by Human Neutrophil Elastase and Proteinase 3', *Int J Mol Sci*, 21: 651.
- Fuchs, T.A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. 'Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps', *J Cell Biol*, 176: 231-41.
- Furze, R.C., and S.M. Rankin. 2008. 'The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse', *FASEB J*, 22: 3111-19.
- Gaal, Z., and I. Balogh. 2019. 'Monogenic Forms of Diabetes Mellitus', *Exp Suppl*, 111: 385-416.
- Gerding, J.C., and B.C. Gilger. 2016. 'Prognosis and impact of equine recurrent uveitis', *Equine Vet J* 48: 290-98.
- Gery, I., and R.R. Caspi. 2018. 'Tolerance Induction in Relation to the Eye', *Front Immunol*, 9: 2304.
- Gessner, A., K. Mohrs, and M. Mohrs. 2005. 'Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production', *J Immunol*, 174: 1063-72.

- Gilger, B.C., E. Malok, K.V. Cutter, T. Stewart, D.W. Horohov, and J.B. Allen. 1999. 'Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis', *Vet Immunol Immunopathol*, 71: 17-28.
- Gilger, B.C.D., C. 2011. 'Equine Recurrent Uveitis.' in B.C. Gilger, Saint-Louis: W.B. Saunders (ed.), *Equine Ophthalmology (Second Edition)*.
- Gilmartin, L., C.A. Tarleton, M. Schuyler, B.S. Wilson, and J.M. Oliver. 2008. 'A comparison of inflammatory mediators released by basophils of asthmatic and control subjects in response to high-affinity IgE receptor aggregation', *Int Arch Allergy Immunol*, 145: 182-92.
- Giodini, A., C. Rahner, and P. Cresswell. 2009. 'Receptor-mediated phagocytosis elicits cross-presentation in nonprofessional antigen-presenting cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 3324.
- Gole, E., S. Oikonomou, S. Ellard, E. De Franco, and K. Karavanaki. 2018. 'A Novel KCNJ11 Mutation Associated with Transient Neonatal Diabetes', *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 10: 175-78.
- Grabowski, P., S. Hesse, S. Hollizeck, M. Rohlfs, U. Behrends, R. Sherkat, H. Tamary, E. Ünal, R. Somech, T. Patiroğlu, S. Canzar, J. van der Werff Ten Bosch, C. Klein, and J. Rappsilber. 2019. 'Proteome Analysis of Human Neutrophil Granulocytes From Patients With Monogenic Disease Using Data-independent Acquisition', *Mol Cell Proteomics*, 18: 760-72.
- Greeley, S.A.W., L.R. Letourneau, and L.H. Philipson. 2018. 'Precision medicine in KCNJ11 permanent neonatal diabetes', *Lancet Diabetes Endocrinol*, 6: 594-95.
- Greenlee-Wacker, M.C. 2016. 'Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation', *Immunol Rev*, 273: 357-70.
- Grosche, A., A.J. Morton, A.S. Graham, M.M.R. Polyak, and D.E. Freeman. 2013. 'Effect of large colon ischemia and reperfusion on concentrations of calprotectin and other clinicopathologic variables in jugular and colonic venous blood in horses', *Am J Vet Res*, 74: 1281-90.
- Guo, H., J.B. Callaway, and J.P. Ting. 2015. 'Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics', *Nat Med*, 21: 677-87.
- Gupta, S., C.M. Lee, J.F. Wang, J. Parodo, S.H. Jia, J. Hu, and J.C. Marshall. 2018. 'Heat-shock protein-90 prolongs septic neutrophil survival by protecting c-Src kinase and caspase-8 from proteasomal degradation', *J Leukoc Biol*, 103: 933-44.
- Hacbarth, E., and A. Kajdacsy-Balla. 1986. 'Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever', *Arthritis Rheum*, 29: 1334-42.
- Hall, C., H. Yu, and E. Choi. 2020. 'Insulin receptor endocytosis in the pathophysiology of insulin resistance', *Exp Mol Med*, 52: 911-20.
- Hassani, M., P. Hellebrekers, N. Chen, C. van Aalst, S. Bongers, F. Hietbrink, L. Koenderman, and N. Vrisekoop. 2020. 'On the origin of low-density neutrophils', *J Leukoc Biol*, 107: 809-18.

- Hauck, S.M., M.F. Lepper, M. Hertl, W. Sekundo, and C.A. Deeg. 2017. 'Proteome Dynamics in Biobanked Horse Peripheral Blood Derived Lymphocytes (PBL) with Induced Autoimmune Uveitis', *Proteomics*, 17: 1700013.
- Heck, M., and B.A. Neely. 2020. 'Proteomics in Non-model Organisms: A New Analytical Frontier', *J Proteome Res*, 19: 3595-606.
- Herteman, N., A. Vargas, and J.P. Lavoie. 2017. 'Characterization of Circulating Low-Density Neutrophils Intrinsic Properties in Healthy and Asthmatic Horses', *Sci Rep*, 7: 7743.
- Hidalgo, A., E.R. Chilvers, C. Summers, and L. Koenderman. 2019. 'The Neutrophil Life Cycle', *Trends Immunol*, 40: 584-97.
- Hofmann, M.A., S. Schiekofer, B. Isermann, M. Kanitz, M. Henkels, M. Joswig, A. Treusch, M. Morcos, T. Weiss, V. Borcea, A.K. Abdel Khalek, J. Amiral, H. Tritschler, E. Ritz, P. Wahl, R. Ziegler, A. Bierhaus, and P.P. Nawroth. 1999. 'Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB', *Diabetologia*, 42: 222-32.
- Hong, E.-G., D.Y. Jung, H.J. Ko, Z. Zhang, Z. Ma, J.Y. Jun, J.H. Kim, A.D. Sumner, T.C. Vary, T.W. Gardner, S.K. Bronson, and J.K. Kim. 2007. 'Nonobese, insulin-deficient Ins2Akita mice develop type 2 diabetes phenotypes including insulin resistance and cardiac remodeling', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293: E1687-96.
- Hopke, A., A. Scherer, S. Kreuzburg, M.S. Abbers, C.S. Zerbe, M.C. Dinauer, M.K. Mansour, and D. Irimia. 2020. 'Neutrophil swarming delays the growth of clusters of pathogenic fungi', *Nat Commun*, 11: 2031.
- Hoppenbrouwers, T., A.S.A. Autar, A.R. Sultan, T.E. Abraham, W.A. van Cappellen, A.B. Houtsmuller, W.J.B. van Wamel, H.M.M. van Beusekom, J.W. van Neck, and M.P.M. de Maat. 2017. 'In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review', *PLoS One*, 12: e0176472.
- Hotamisligil, G.S., P. Peraldi, A. Budavari, R. Ellis, M.F. White, and B.M. Spiegelman. 1996. 'IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance', *Science*, 271: 665-68.
- Hsu, B.E., S. Tabariès, R.M. Johnson, S. Andrzejewski, J. Senecal, C. Lehuédé, M.G. Annis, E.H. Ma, S. Völs, L. Ramsay, R. Froment, A. Monast, I.R. Watson, Z. Granot, R.G. Jones, J. St-Pierre, and P.M. Siegel. 2019. 'Immature Low-Density Neutrophils Exhibit Metabolic Flexibility that Facilitates Breast Cancer Liver Metastasis', *Cell Rep*, 27: 3902-15.e6.
- Huang, L., and J.A. Appleton. 2016. 'Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dups', *Trends Parasitol*, 32: 798-807.
- Huang, T.T., N. Kudo, M. Yoshida, and S. Miyamoto. 2000. 'A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalphalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalphalpha complexes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 1014-19.
- Hughes, M.J., H.M. McGettrick, and E. Sapey. 2020. 'Shared mechanisms of multimorbidity in COPD, atherosclerosis and type-2 diabetes: the neutrophil as a potential inflammatory target', *Eur Respir Rev*, 29: 190102.

- Huth, C., C. von Toerne, F. Schederecker, T. de las Heras Gala, C. Herder, F. Kronenberg, C. Meisinger, W. Rathmann, W. Koenig, M. Waldenberger, M. Roden, A. Peters, S.M. Hauck, and B. Thorand. 2019. 'Protein markers and risk of type 2 diabetes and prediabetes: a targeted proteomics approach in the KORA F4/FF4 study', *Eur J Epidemiol*, 34: 409-22.
- Ilonen, J., J. Lempainen, and R. Veijola. 2019. 'The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus', *Nat Rev Endocrinol*, 15: 635-50.
- Inayat, H., M.K. Azim, and A.A. Baloch. 2019. 'Analysis of Inflammatory Gene Expression Profile of Peripheral Blood Leukocytes in Type 2 Diabetes', *Immunol Invest*, 48: 618-31.
- Inclan-Rico, J.M., J.J. Ponessa, N. Valero-Pacheco, C.M. Hernandez, C.B. Sy, A.D. Lemenze, A.M. Beaulieu, and M.C. Siracusa. 2020. 'Basophils prime group 2 innate lymphoid cells for neuropeptide-mediated inhibition', *Nat Immunol*, 21: 1181-93.
- Injarabian, L., A. Devin, S. Ransac, and B.S. Marteyn. 2019. 'Neutrophil Metabolic Shift during their Lifecycle: Impact on their Survival and Activation', *Int J Mol Sci*, 21: 287.
- Jacobs, E., A. Hoyer, R. Brinks, A. Icks, O. Kuß, and W. Rathmann. 2017. 'Healthcare costs of Type 2 diabetes in Germany', *Diabet Med*, 34: 855-61.
- Jafar, N., H. Edriss, and K. Nugent. 2016. 'The Effect of Short-Term Hyperglycemia on the Innate Immune System', *Am J Med Sci*, 351: 201-11.
- Jaganathan, R., R. Ravindran, and S. Dhanasekaran. 2018. 'Emerging Role of Adipocytokines in Type 2 Diabetes as Mediators of Insulin Resistance and Cardiovascular Disease', *Can J Diabetes*, 42: 446-56.e1.
- Jassal, B., L. Matthews, G. Viteri, C. Gong, P. Lorente, A. Fabregat, K. Sidiropoulos, J. Cook, M. Gillespie, R. Haw, F. Loney, B. May, M. Milacic, K. Rothfels, C. Sevilla, V. Shamovsky, S. Shorser, T. Varusai, J. Weiser, G. Wu, L. Stein, H. Hermjakob, and P. D'Eustachio. 2020. 'The reactome pathway knowledgebase', *Nucleic Acids Res*, 48: D498-503.
- Kandler, K., R. Shaykhiev, P. Kleemann, F. Klescz, M. Lohoff, C. Vogelmeier, and R. Bals. 2006. 'The anti-microbial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands', *Int Immunol*, 18: 1729-36.
- Kang, L., H. Yu, X. Yang, Y. Zhu, X. Bai, R. Wang, Y. Cao, H. Xu, H. Luo, L. Lu, M.-J. Shi, Y. Tian, W. Fan, and B.-Q. Zhao. 2020. 'Neutrophil extracellular traps released by neutrophils impair revascularization and vascular remodeling after stroke', *Nat Commun*, 11: 2488.
- Keane, K.N., E.K. Calton, R. Carlessi, P.H. Hart, and P. Newsholme. 2017. 'The bioenergetics of inflammation: insights into obesity and type 2 diabetes', *Eur J Clin Nutr*, 71: 904-12.
- Kettritz, R. 2016. 'Neutral serine proteases of neutrophils', *Immunol Rev*, 273: 232-48.
- Kim, S.J., M. Zhang, B.P. Vistica, C.C. Chan, D.F. Shen, E.F. Wawrousek, and I. Gery. 2002. 'Induction of ocular inflammation by T-helper lymphocytes type 2', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 758-65.

- Kish, D.D., S. Min, N. Dvorina, W.M. Baldwin, 3rd, S.A. Stohlman, and R.L. Fairchild. 2019. 'Neutrophil Cathepsin G Regulates Dendritic Cell Production of IL-12 during Development of CD4 T Cell Responses to Antigens in the Skin', *J Immunol*, 202: 1045-56.
- Kjeldsen, L., D.F. Bainton, H. Sengeløv, and N. Borregaard. 1993. 'Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation', *Blood*, 82: 3183-91.
- Kleinert, M., C. Clemmensen, S.M. Hofmann, M.C. Moore, S. Renner, S.C. Woods, P. Huypens, J. Beckers, M.H. de Angelis, A. Schurmann, M. Bakhti, M. Klingenspor, M. Heiman, A.D. Cherrington, M. Ristow, H. Lickert, E. Wolf, P.J. Havel, T.D. Muller, and M.H. Tschop. 2018. 'Animal models of obesity and diabetes mellitus', *Nat Rev Endocrinol*, 14: 140-62.
- Kleinwort, K.J., B. Amann, S.M. Hauck, R. Feederle, W. Sekundo, and C.A. Deeg. 2016. 'Immunological Characterization of Intraocular Lymphoid Follicles in a Spontaneous Recurrent Uveitis Model', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57: 4504-11.
- Kleinwort, K.J.H., B. Amann, S.M. Hauck, S. Hirmer, A. Blutke, S. Renner, P.B. Uhl, K. Lutterberg, W. Sekundo, E. Wolf, and C.A. Deeg. 2017. 'Retinopathy with central oedema in an INS (C94Y) transgenic pig model of long-term diabetes', *Diabetologia*, 60: 1541-49.
- Kleinwort, K.J.H., S.M. Hauck, R.L. Degroote, A.M. Scholz, C. Hözel, E.P. Maertlbauer, and C. Deeg. 2019. 'Peripheral blood bovine lymphocytes and MAP show distinctly different proteome changes and immune pathways in host-pathogen interaction', *PeerJ*, 7: e8130.
- Köhler, A., K. De Filippo, M. Hasenberg, C. van den Brandt, E. Nye, M.P. Hosking, T.E. Lane, L. Männ, R.M. Ransohoff, A.E. Hauser, O. Winter, B. Schraven, H. Geiger, N. Hogg, and M. Gunzer. 2011. 'G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands', *Blood*, 117: 4349-57.
- Kolaczkowska, E., C.N. Jenne, B.G. Surewaard, A. Thanabalasuriar, W.Y. Lee, M.J. Sanz, K. Mowen, G. Opdenakker, and P. Kubes. 2015. 'Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature', *Nat Commun*, 6: 6673.
- Kraut, A., M. Louwagie, C. Bruley, C. Masselon, Y. Couté, V. Brun, and A.M. Hesse. 2019. 'Protein Biomarker Discovery in Non-depleted Serum by Spectral Library-Based Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry', *Methods Mol Biol*, 1959: 129-50.
- Krentz, N.A.J., and A.L. Gloyn. 2020. 'Insights into pancreatic islet cell dysfunction from type 2 diabetes mellitus genetics', *Nat Rev Endocrinol*, 16: 202-12.
- Kubes, P. 2018. 'The enigmatic neutrophil: what we do not know', *Cell Tissue Res*, 371: 399-406.
- Kumar, S., and M. Dikshit. 2019. 'Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease', *Front Immunol*, 10: 2099.

- Kuo, C.-S., J.-S. Chen, L.-Y. Lin, G.W. Schmid-Schönbein, S. Chien, P.-H. Huang, J.-W. Chen, and S.-J. Lin. 2020. 'Inhibition of Serine Protease Activity Protects Against High Fat Diet-Induced Inflammation and Insulin Resistance', *Sci Rep*, 10: 1725.
- La Manna, M.P., V. Orlando, E.M. Paraboschi, B. Tamburini, P. Di Carlo, A. Cascio, R. Asselta, F. Dieli, and N. Caccamo. 2019. 'Mycobacterium tuberculosis Drives Expansion of Low-Density Neutrophils Equipped With Regulatory Activities', *Front Immunol*, 10: 2761.
- Lahoz-Beneytez, J., M. Elemans, Y. Zhang, R. Ahmed, A. Salam, M. Block, C. Niederalt, B. Asquith, and D. Macallan. 2016. 'Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives', *Blood*, 127: 3431-38.
- Lande, R., E. Botti, C. Jandus, D. Dojcinovic, G. Fanelli, C. Conrad, G. Chamilos, L. Feldmeyer, B. Marinari, S. Chon, L. Vence, V. Riccieri, P. Guillaume, A.A. Navarini, P. Romero, A. Costanzo, E. Piccolella, M. Gilliet, and L. Frasca. 2014. 'The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis', *Nat Commun*, 5: 5621.
- Lenzen, S. 2008. 'The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes', *Diabetologia*, 51: 216-26.
- Lepper, M.F., U. Ohmayer, C. von Toerne, N. Maison, A.-G. Ziegler, and S.M. Hauck. 2018. 'Proteomic Landscape of Patient-Derived CD4+ T Cells in Recent-Onset Type 1 Diabetes', *J Proteome Res*, 17: 618-34.
- Ley, K., H.M. Hoffman, P. Kubes, M.A. Cassatella, A. Zychlinsky, C.C. Hedrick, and S.D. Catz. 2018. 'Neutrophils: New insights and open questions', *Sci Immunol*, 3: eaat4579.
- Ley, K., C. Laudanna, M.I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. 'Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated', *Nat Rev Immunol*, 7: 678-89.
- Li, W., K.C. Sasse, Y. Bayguinov, S.M. Ward, and B.A. Perrino. 2018. 'Contractile Protein Expression and Phosphorylation and Contractility of Gastric Smooth Muscles from Obese Patients and Patients with Obesity and Diabetes', *J Diabetes Res*, 2018: 8743874.
- Li, X., S. Xie, L. Qian, C. Cai, H. Bi, and W. Cui. 2020. 'Identification of genes related to skeletal muscle growth and development by integrated analysis of transcriptome and proteome in myostatin-edited Meishan pigs', *J Proteomics*, 213: 103628.
- Lim, C.H., S.S. Adav, S.K. Sze, Y.K. Choong, R. Saravanan, and A. Schmidtchen. 2018. 'Thrombin and Plasmin Alter the Proteome of Neutrophil Extracellular Traps', *Front Immunol*, 9: 1554.
- Lin, H., X. Zhang, L. Liu, Q. Fu, C. Zang, Y. Ding, Y. Su, Z. Xu, S. He, X. Yang, X. Wei, H. Mao, Y. Cui, Y. Wei, C. Zhou, L. Du, N. Huang, N. Zheng, T. Wang, and F. Rao. 2020a. 'Basis for metabolite-dependent Cullin-RING ligase deneddylylation by the COP9 signalosome', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117: 4117-24.
- Lin, Q., W. Zhou, Y. Wang, J. Huang, X. Hui, Z. Zhou, and Y. Xiao. 2020b. 'Abnormal Peripheral Neutrophil Transcriptome in Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Patients', *J Diabetes Res*, 2020: 9519072.

- Link, A.J., J. Eng, D.M. Schieltz, E. Carmack, G.J. Mize, D.R. Morris, B.M. Garvik, and J.R. Yates. 1999. 'Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry', *Nat Biotechnol*, 17: 676-82.
- Liu, M., I. Hodish, L. Haataja, R. Lara-Lemus, G. Rajpal, J. Wright, and P. Arvan. 2010. 'Proinsulin misfolding and diabetes: mutant INS gene-induced diabetes of youth', *Trends Endocrinol Metab*, 21: 652-59.
- Liu, M., M.A. Weiss, A. Arunagiri, J. Yong, N. Rege, J. Sun, L. Haataja, R.J. Kaufman, and P. Arvan. 2018. 'Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein', *Diabetes Obes Metab*, 20 Suppl 2: 28-50.
- Lodge, K.M., A.S. Cowburn, W. Li, and A.M. Condliffe. 2020. 'The Impact of Hypoxia on Neutrophil Degranulation and Consequences for the Host', *Int J Mol Sci*, 21: 1183.
- Lok, L.S.C., T.W. Dennison, K.M. Mahbubani, K. Saeb-Parsy, E.R. Chilvers, and M.R. Clatworthy. 2019. 'Phenotypically distinct neutrophils patrol uninjected human and mouse lymph nodes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 19083-89.
- Long, Y., Z. Lu, S. Xu, M. Li, X. Wang, Z. Zhang, and Q. He. 2020. 'Self-Delivery Micellar Nanoparticles Prevent Premetastatic Niche Formation by Interfering with the Early Recruitment and Vascular Destruction of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells', *Nano Lett*, 20: 2219-29.
- Loser, K., T. Vogl, M. Voskort, A. Lueken, V. Kupas, W. Nacken, L. Klenner, A. Kuhn, D. Foell, L. Sorokin, T.A. Luger, J. Roth, and S. Beissert. 2010. 'The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells', *Nat Med*, 16: 713-17.
- Lu, Y., Y. Li, G. Li, and H. Lu. 2020. 'Identification of potential markers for type 2 diabetes mellitus via bioinformatics analysis', *Mol Med Rep*, 22: 1868-82.
- Luger, D., P.B. Silver, J. Tang, D. Cua, Z. Chen, Y. Iwakura, E.P. Bowman, N.M. Sgambellone, C.-C. Chan, and R.R. Caspi. 2008. 'Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category', *J Exp Med*, 205: 799-810.
- Lund-Blix, N.A., F. Dong, K. Marild, J. Seifert, A.E. Baron, K.C. Waugh, G. Joner, K. Stordal, G. Tapia, L.C. Stene, R.K. Johnson, M.J. Rewers, and J.M. Norris. 2019. 'Gluten Intake and Risk of Islet Autoimmunity and Progression to Type 1 Diabetes in Children at Increased Risk of the Disease: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)', *Diabetes Care*, 42: 789-96.
- Malalana, F., A. Stylianides, and C. McGowan. 2015. 'Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives', *Vet J*, 206: 22-29.
- Mandruzzato, S., S. Brandau, C.M. Britten, V. Bronte, V. Damuzzo, C. Gouttefangeas, D. Maurer, C. Ottensmeier, S.H. van der Burg, M.J. Welters, and S. Walter. 2016. 'Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study', *Cancer Immunol Immunother*, 65: 161-69.
- Manjari, P., I. Hyder, and A.K. Dang. 2019. 'Implantation associated divergence in neutrophil glucocorticoid and cysteine-X-cysteine receptor genes in cattle', *Mol Biol Rep*, 46: 5493-99.

- Margaryan, S., A. Witkowicz, A. Arakelyan, A. Partyka, L. Karabon, and G. Manukyan. 2018. 'sFasL-mediated induction of neutrophil activation in patients with type 2 diabetes mellitus', *PLoS One*, 13: e0201087.
- Martin, C., P.C. Burdon, G. Bridger, J.C. Gutierrez-Ramos, T.J. Williams, and S.M. Rankin. 2003. 'Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence', *Immunity*, 19: 583-93.
- Masgrau-Alsina, S., M. Sperandio, and I. Rohwedder. 2020. 'Neutrophil recruitment and intracellular vesicle transport: A short overview', *Eur J Clin Invest*, 50: e13237.
- Massena, S., G. Christoffersson, E. Vagesjo, C. Seignez, K. Gustafsson, F. Binet, C. Herrera Hidalgo, A. Giraud, J. Lomei, S. Westrom, M. Shibuya, L. Claesson-Welsh, P. Gerwins, M. Welsh, J. Kreuger, and M. Phillipson. 2015. 'Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans', *Blood*, 126: 2016-26.
- Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell. 2014. 'The multifaceted functions of neutrophils', *Annu Rev Pathol*, 9: 181-218.
- McLaughlin, T., S.E. Ackerman, L. Shen, and E. Engleman. 2017. 'Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease', *J Clin Invest*, 127: 5-13.
- McMullen, R.J., and B.M. Fischer. 2017. 'Medical and Surgical Management of Equine Recurrent Uveitis', *Vet Clin North Am Equine Pract*, 33: 465-81.
- Méndez-Ferrer, S., D. Lucas, M. Battista, and P.S. Frenette. 2008. 'Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations', *Nature*, 452: 442-47.
- Millar, D.A., and N.A. Ratcliffe. 1989. 'The evolution of blood cells: facts and enigmas', *Endeavour*, 13: 72-77.
- Minns, D., K.J. Smith, and E.G. Findlay. 2019. 'Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents', *Mediators Inflamm*, 2019: 8968943.
- Mitchell, T., A. Lo, M.R. Logan, P. Lacy, and G. Eitzen. 2008. 'Primary granule exocytosis in human neutrophils is regulated by Rac-dependent actin remodeling', *Am J Physiol Cell Physiol*, 295: C1354-65.
- Moehren, U., M. Papaioannou, C.A. Reeb, W. Hong, and A. Baniahmad. 2007. 'Alien Interacts with the Human Androgen Receptor and Inhibits Prostate Cancer Cell Growth', *Mol Endocrinol*, 21: 1039-48.
- Mora-Jensen, H., J. Jendholm, A. Fossum, B. Porse, N. Borregaard, and K. Theilgaard-Monch. 2011. 'Technical advance: immunophenotypical characterization of human neutrophil differentiation', *J Leukoc Biol*, 90: 629-34.
- Murakami, Y., K. Ishikawa, S. Nakao, and K.-H. Sonoda. 2020. 'Innate immune response in retinal homeostasis and inflammatory disorders', *Prog Retin Eye Res*, 74: 100778.
- Murphy, K.M., C. Weaver, C. Janeway, and L. Seidler. 2018. *Janeway Immunologie*.

- Nagase, H., M. Miyamasu, M. Yamaguchi, M. Imanishi, N.H. Tsuno, K. Matsushima, K. Yamamoto, Y. Morita, and K. Hirai. 2002. 'Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils', *J Leukoc Biol*, 71: 711-17.
- Nahnsen, S., C. Bielow, K. Reinert, and O. Kohlbacher. 2013. 'Tools for Label-free Peptide Quantification', *Mol Cell Proteomics*, 12: 549-56.
- Nakashima, C., A. Otsuka, and K. Kabashima. 2018. 'Recent advancement in the mechanism of basophil activation', *J Dermatol Sci*, 91: 3-8.
- Narasaraju, T., E. Yang, R.P. Samy, H.H. Ng, W.P. Poh, A.A. Liew, M.C. Phoon, N. van Rooijen, and V.T. Chow. 2011. 'Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis', *Am J Pathol*, 179: 199-210.
- Neutzner, R.V., M. Jager, C. Friedburg, C.A. Deeg, and B. Lorenz. 2011. '[Blind spot enlargement syndrome in acute zonal occult outer retinopathy with detection of autoantibodies against the retinal antigens CRALBP and S-Ag]', *Ophthalmologe*, 108: 1045-49.
- Nevitt, C., J.G. Tooley, and C.E. Schaner Tooley. 2018. 'N-terminal acetylation and methylation differentially affect the function of MYL9', *Biochem J*, 475: 3201-19.
- Ng, L.G., R. Ostuni, and A. Hidalgo. 2019. 'Heterogeneity of neutrophils', *Nat Rev Immunol*, 19: 255-65.
- Nijnik, A., J. Pistolic, A. Wyatt, S. Tam, and R.E. Hancock. 2009. 'Human cathelicidin peptide LL-37 modulates the effects of IFN-gamma on APCs', *J Immunol*, 183: 5788-98.
- Norris, J.M., R.K. Johnson, and L.C. Stene. 2020. 'Type 1 diabetes-early life origins and changing epidemiology', *Lancet Diabetes Endocrinol*, 8: 226-38.
- Nozawa, H., C. Chiu, and D. Hanahan. 2006. 'Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 12493-98.
- Oh, K., T. Shen, G. Le Gros, and B. Min. 2007. 'Induction of Th2 type immunity in a mouse system reveals a novel immunoregulatory role of basophils', *Blood*, 109: 2921-27.
- Olson, J.A., M. Forrester, P.A. Clohessy, B.E. Golden, R. Herriot, and J.V. Forrester. 1996. 'Calprotectin is raised in endogenous posterior uveitis', *Ocul Immunol Inflamm*, 4: 91-98.
- Osbak, K.K., K. Colclough, C. Saint-Martin, N.L. Beer, C. Bellanne-Chantelot, S. Ellard, and A.L. Gloyn. 2009. 'Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia', *Hum Mutat*, 30: 1512-26.
- Paschalis-Trela, K., A. Cywińska, J. Trela, M. Czopowicz, J. Kita, and L. Witkowski. 2017. 'The prevalence of ocular diseases in polish Arabian horses', *BMC Vet Res*, 13: 319.
- Peixoto-Barbosa, R., A.F. Reis, and F.M.A. Giuffrida. 2020. 'Update on clinical screening of maturity-onset diabetes of the young (MODY)', *Diabetol Metab Syndr*, 12: 50.

- Pember, S.O., K.C. Barnes, S.J. Brandt, and J.M. Kinkade, Jr. 1983. 'Density heterogeneity of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: gradient fractionation and relationship to chemotactic stimulation', *Blood*, 61: 1105-15.
- Pepple, K.L., L. Rotkis, L. Wilson, A. Sandt, and R.N. Van Gelder. 2015. 'Comparative Proteomic Analysis of Two Uveitis Models in Lewis Rats', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56: 8449-56.
- Perez, C., C. Botta, A. Zabaleta, N. Puig, M.T. Cedena, I. Goicoechea, D. Alameda, E. San José-Eneriz, J. Merino, P. Rodríguez-Otero, C. Maia, D. Alignani, P. Maiso, I. Manrique, D. Lara-Astiaso, A. Vilas-Zornoza, S. Sarvide, C. Riillo, M. Rossi, L. Rosiñol, A. Oriol, M.J. Blanchard, R. Rios, A. Sureda, J. Martin, R. Martinez, J. Bargay, J. de la Rubia, M.T. Hernandez, J. Martinez-Lopez, A. Orfao, X. Agirre, F. Prosper, M.V. Mateos, J.J. Lahuerta, J. Blade, J.F. San-Miguel, and B. Paiva. 2020. 'Immunogenomic identification and characterization of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in multiple myeloma', *Blood*, 136: 199-209.
- Perner, A., S.E. Nielsen, and J. Rask-Madsen. 2003. 'High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils', *Intensive Care Med*, 29: 642-45.
- Petersmann, A., D. Muller-Wieland, U.A. Muller, R. Landgraf, M. Nauck, G. Freckmann, L. Heinemann, and E. Schleicher. 2019. 'Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus', *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 127: S1-7.
- Petretto, A., M. Bruschi, F. Pratesi, C. Croia, G. Candiano, G. Ghiggeri, and P. Migliorini. 2019. 'Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis', *PLoS One*, 14: e0218946.
- Piazza, I., N. Beaton, R. Bruderer, T. Knobloch, C. Barbisan, L. Chandat, A. Sudau, I. Siepe, O. Rinner, N. de Souza, P. Picotti, and L. Reiter. 2020. 'A machine learning-based chemoproteomic approach to identify drug targets and binding sites in complex proteomes', *Nat Commun*, 11: 4200.
- Pickar-Oliver, A., and C.A. Gersbach. 2019. 'The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20: 490-507.
- Piliponsky, A.M., N.J. Shubin, A.K. Lahiri, P. Truong, M. Clauson, K. Niino, A.L. Tsuha, S.A. Nedospasov, H. Karasuyama, L.L. Reber, M. Tsai, K. Mukai, and S.J. Galli. 2019. 'Basophil-derived tumor necrosis factor can enhance survival in a sepsis model in mice', *Nat Immunol*, 20: 129-40.
- Pillay, J., I. den Braber, N. Vrisekoop, L.M. Kwast, R.J. de Boer, J.A. Borghans, K. Tesselaar, and L. Koenderman. 2010. 'In vivo labeling with  $^{2}\text{H}_2\text{O}$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days', *Blood*, 116: 625-27.
- Pillay, J., N. Tregay, G. Juzenaité, L.M. Carlin, C. Pirillo, D.C.A. Gaboriau, N. Farahi, C. Summers, C. Lo Celso, E.R. Chilvers, S. Rankin, and K. De Filippo. 2020. 'Effect of the CXCR4 antagonist plerixafor on endogenous neutrophil dynamics in the bone marrow, lung and spleen', *J Leukoc Biol*, 107: 1175-85.
- Pipatpolkai, T., S. Usher, P.J. Stansfeld, and F.M. Ashcroft. 2020. 'New insights into KATP channel gene mutations and neonatal diabetes mellitus', *Nat Rev Endocrinol*, 16: 378-93.

- Plowman, J.E., D.P. Harland, A.M.O. Campos, S. Rocha e Silva, A. Thomas, J.A. Vernon, C. van Koten, C. Hefer, S. Clerens, and A.M. de Almeida. 2020. 'The wool proteome and fibre characteristics of three distinct genetic ovine breeds from Portugal', *J Proteomics*, 225: 103853.
- Polly, P., M. Herdick, U. Moehren, A. Baniahmad, T. Heinzel, and C. Carlberg. 2000. 'VDR-Alien: a novel, DNA-selective vitamin D(3) receptor-corepressor partnership', *FASEB J*, 14: 1455-63.
- Prattichizzo, F., V. De Nigris, R. Spiga, E. Mancuso, L. La Sala, R. Antonicelli, R. Testa, A.D. Procopio, F. Olivieri, and A. Ceriello. 2018. 'Inflammageing and metaflammation: The yin and yang of type 2 diabetes', *Ageing Res Rev*, 41: 1-17.
- Puga, I., M. Cols, C.M. Barra, B. He, L. Cassis, M. Gentile, L. Comerma, A. Chorny, M. Shan, W. Xu, G. Magri, D.M. Knowles, W. Tam, A. Chiu, J.B. Bussel, S. Serrano, J.A. Lorente, B. Bellosillo, J. Lloreta, N. Juanpere, F. Alameda, T. Baro, C.D. de Heredia, N. Toran, A. Catala, M. Torrebadell, C. Fortuny, V. Cusi, C. Carreras, G.A. Diaz, J.M. Blander, C.M. Farber, G. Silvestri, C. Cunningham-Rundles, M. Calvillo, C. Dufour, L.D. Notarangelo, V. Lougaris, A. Plebani, J.L. Casanova, S.C. Ganal, A. Diefenbach, J.I. Arostegui, M. Juan, J. Yague, N. Mahlaoui, J. Donadieu, K. Chen, and A. Cerutti. 2011. 'B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen', *Nat Immunol*, 13: 170-80.
- Punthakee, Z., R. Goldenberg, and P. Katz. 2018. 'Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome', *Can J Diabetes*, 42 Suppl 1: S10-15.
- Ramadass, M., and S.D. Catz. 2016. 'Molecular mechanisms regulating secretory organelles and endosomes in neutrophils and their implications for inflammation', *Immunol Rev*, 273: 249-65.
- Rausch, P.G., and T.G. Moore. 1975. 'Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: A phylogenetic comparison', *Blood*, 46: 913-19.
- Regan, D.P., M.C. Aarnio, W.S. Davis, K.P. Carmichael, M.L. Vandenplas, J.D. Lauderdale, and P.A. Moore. 2012. 'Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis', *Vet Ophthalmol*, 15: 145-52.
- Renner, S., A. Blutke, S. Clauss, C.A. Deeg, E. Kemter, D. Merkus, R. Wanke, and E. Wolf. 2020. 'Porcine models for studying complications and organ crosstalk in diabetes mellitus', *Cell Tissue Res*, 380: 341-78.
- Renner, S., C. Braun-Reichhart, A. Blutke, N. Herbach, D. Emrich, E. Streckel, A. Wunsch, B. Kessler, M. Kurome, A. Bahr, N. Klymiuk, S. Krebs, O. Puk, H. Nagashima, J. Graw, H. Blum, R. Wanke, and E. Wolf. 2013. 'Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs', *Diabetes*, 62: 1505-11.
- Renner, S., B. Dobenecker, A. Blutke, S. Zols, R. Wanke, M. Ritzmann, and E. Wolf. 2016. 'Comparative aspects of rodent and nonrodent animal models for mechanistic and translational diabetes research', *Theriogenology*, 86: 406-21.
- Renner, S., C. Fehlings, N. Herbach, A. Hofmann, D.C. von Waldhausen, B. Kessler, K. Ulrichs, I. Chodnevskaja, V. Moskalenko, W. Amselgruber, B. Goke, A. Pfeifer, R. Wanke, and E. Wolf. 2010. 'Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic

beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function', *Diabetes*, 59: 1228-38.

Renner, S., A.S. Martins, E. Streckel, C. Braun-Reichhart, M. Backman, C. Prehn, N. Klymiuk, A. Bahr, A. Blutke, C. Landbrecht-Schessl, A. Wunsch, B. Kessler, M. Kurome, A. Hinrichs, S.J. Koopmans, S. Krebs, E. Kemter, B. Rathkolb, H. Nagashima, H. Blum, M. Ritzmann, R. Wanke, B. Aigner, J. Adamski, M. Hrabe de Angelis, and E. Wolf. 2019. 'Mild maternal hyperglycemia in INS (C93S) transgenic pigs causes impaired glucose tolerance and metabolic alterations in neonatal offspring', *Dis Model Mech*, 12: dmm039156.

Rizzo, L.V., P. Silver, B. Wiggert, F. Hakim, R.T. Gazzinelli, C.C. Chan, and R.R. Caspi. 1996. 'Establishment and characterization of a murine CD4+ T cell line and clone that induce experimental autoimmune uveoretinitis in B10.A mice', *J Immunol*, 156: 1654-60.

Robertson, C.C., and S.S. Rich. 2018. 'Genetics of type 1 diabetes', *Curr Opin Genet Dev*, 50: 7-16.

Rock, K.L., S. Gamble, and L. Rothstein. 1990. 'Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules', *Science*, 249: 918-21.

Rockel, B., T. Schmaler, X. Huang, and W. Dubiel. 2014. 'Electron microscopy and in vitro deneddylation reveal similar architectures and biochemistry of isolated human and Flag-mouse COP9 signalosome complexes', *Biochem Biophys Res Commun*, 450: 991-97.

Rørvig, S., C. Honore, L.I. Larsson, S. Ohlsson, C.C. Pedersen, L.C. Jacobsen, J.B. Cowland, P. Garred, and N. Borregaard. 2009. 'Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP', *J Leukoc Biol*, 86: 1439-49.

Rørvig, S., O. Østergaard, N.H.H. Heegaard, and N. Borregaard. 2013. 'Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors', *J Leukoc Biol*, 94: 711-21.

Rosales, C. 2020. 'Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity', *J Leukoc Biol*, 108: 377-96.

Rosik, J., B. Szostak, F. Machaj, and A. Pawlik. 2020. 'The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of gestational diabetes mellitus', *Ann Hum Genet*, 84: 114-24.

Rudvik, A., and M. Måansson. 2018. 'Evaluation of surrogate measures of insulin sensitivity - correlation with gold standard is not enough', *BMC Med Res Methodol*, 18: 64.

Saldinger, L.K., S.G. Nelson, R.R. Bellone, M. Lassaline, M. Mack, N.J. Walker, and D.L. Borjesson. 2020. 'Horses with equine recurrent uveitis have an activated CD4+ T-cell phenotype that can be modulated by mesenchymal stem cells in vitro', *Vet Ophthalmol*, 23: 160-70.

Sandmeyer, L.S., B.S. Bauer, C.X. Feng, and B.H. Grahn. 2017. 'Equine recurrent uveitis in western Canadian prairie provinces: A retrospective study (2002-2015)', *Can Vet J*, 58: 717-22.

- Scapinello, S., A.S. Brooks, J.I. MacInnes, J. Hammermueller, M.E. Clark, and J.L. Caswell. 2011. 'Bactericidal activity of porcine neutrophil secretions', *Vet Immunol Immunopathol*, 139: 113-18.
- Scapini, P., O. Marini, C. Tecchio, and M.A. Cassatella. 2016. 'Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions', *Immunol Rev*, 273: 48-60.
- Schauer, M., K.J.H. Kleinwort, R.L. Degroote, C. Wiedemann, E. Kremmer, S.M. Hauck, and C.A. Deeg. 2018. 'Interaction of septin 7 and DOCK8 in equine lymphocytes reveals novel insights into signaling pathways associated with autoimmunity', *Sci Rep*, 8: 12332.
- Schürmann, N., P. Forrer, O. Casse, J. Li, B. Felmy, A.V. Burgener, N. Ehrenfeuchter, W.D. Hardt, M. Recher, C. Hess, A. Tschan-Plessl, N. Khanna, and D. Bumann. 2017. 'Myeloperoxidase targets oxidative host attacks to *Salmonella* and prevents collateral tissue damage', *Nat Microbiol*, 2: 16268.
- Sengeløv, H., P. Follin, L. Kjeldsen, K. Lollike, C. Dahlgren, and N. Borregaard. 1995. 'Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils', *J Immunol*, 154: 4157-65.
- Shields, B., and K. Colclough. 2017. 'Towards a systematic nationwide screening strategy for MODY', *Diabetologia*, 60: 609-12.
- Shields, B.M., S. Hicks, M.H. Shepherd, K. Colclough, A.T. Hattersley, and S. Ellard. 2010. 'Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing?', *Diabetologia*, 53: 2504-08.
- Silvestre-Roig, C., Z.G. Fridlender, M. Glogauer, and P. Scapini. 2019. 'Neutrophil Diversity in Health and Disease', *Trends Immunol*, 40: 565-83.
- Silvestre-Roig, C., A. Hidalgo, and O. Soehnlein. 2016. 'Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis', *Blood*, 127: 2173-81.
- Simeonova, G.P., S.Z. Krastev, and R.S. Simeonov. 2016. 'Immunological and pathological investigations in equine experimental uveitis', *Vet Res Commun*, 40: 107-15.
- Song, G., J. Huang, Y. Deng, Z. Liang, and Y. Lin. 2019. 'The Expression of Calprotectin and Factors in TLR4/NF-κB/MyD88 Pathway in Patients with Idiopathic Acute Anterior Uveitis', *Ocul Immunol Inflamm*, 27: 1144-48.
- Soongsathitanon, J., W. Umsa-Ard, and V. Thongboonkerd. 2019. 'Proteomic analysis of peripheral blood polymorphonuclear cells (PBMCs) reveals alteration of neutrophil extracellular trap (NET) components in uncontrolled diabetes', *Mol Cell Biochem*, 461: 1-14.
- Sousa, M., and J. Bruges-Armas. 2019. 'Monogenic Diabetes: Genetics and Relevance on Diabetes Mellitus Personalized Medicine', *Curr Diabetes Rev*, 16: 807-19.
- Souto, F.O., F.V.S. Castanheira, S.C. Trevelin, B.H.F. Lima, G.C.M. Cebinelli, W.M. Turato, M. Auxiliadora-Martins, A. Basile-Filho, J.C. Alves-Filho, and F.Q. Cunha. 2020. 'Liver X Receptor Activation Impairs Neutrophil Functions and Aggravates Sepsis', *J Infect Dis*, 221: 1542-53.

- Souwer, Y., T. Groot Kormelink, E.W. Taanman-Kueter, F.J. Muller, T.M.M. van Capel, D.V. Varga, Y.E. Bar-Ephraim, M.B.M. Teunissen, S.M. van Ham, T.W. Kuijpers, D. Wouters, L. Meyaard, and E.C. de Jong. 2018. 'Human T(H)17 cell development requires processing of dendritic cell-derived CXCL8 by neutrophil elastase', *J Allergy Clin Immunol*, 141: 2286-89.e5.
- Spiess, B.M. 2010. 'Equine recurrent uveitis: the European viewpoint', *Equine Vet J*, 42 Suppl 37: 50-56.
- Stark, M.A., Y. Huo, T.L. Burcin, M.A. Morris, T.S. Olson, and K. Ley. 2005. 'Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17', *Immunity*, 22: 285-94.
- Sukumaran, A., J.M. Coish, J. Yeung, B. Muselius, M. Gadjeva, A.J. MacNeil, and J. Geddes-McAlister. 2019. 'Decoding communication patterns of the innate immune system by quantitative proteomics', *J Leukoc Biol*, 106: 1221-32.
- Summerfield, A., M.A. Hofmann, and K.C. McCullough. 1998. 'Low density blood granulocytic cells induced during classical swine fever are targets for virus infection', *Vet Immunol Immunopathol*, 63: 289-301.
- Tak, T., K. Tesselaar, J. Pillay, J.A. Borghans, and L. Koenderman. 2013. 'What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited', *J Leukoc Biol*, 94: 595-601.
- Takahashi, K., Y. Nakayama, H. Horiuchi, T. Ohta, K. Komoriya, H. Ohmori, and T. Kamimura. 2002. 'Human neutrophils express messenger RNA of vitamin D receptor and respond to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3', *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 24: 335-47.
- Tamassia, N., F. Arruda-Silva, H.L. Wright, R.J. Moots, E. Gardiman, F. Bianchetto-Aguilera, S. Gasperini, M. Capone, L. Maggi, F. Annunziato, S.W. Edwards, and M.A. Cassatella. 2019. 'Human neutrophils activated via TLR8 promote Th17 polarization through IL-23', *J Leukoc Biol*, 105: 1155-65.
- Tamassia, N., F. Bianchetto-Aguilera, F. Arruda-Silva, E. Gardiman, S. Gasperini, F. Calzetti, and M.A. Cassatella. 2018. 'Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the "dark side of the moon"', *Eur J Clin Invest*, 48 Suppl 2: e12952.
- Tang, S.C.W., and W.H. Yiu. 2020. 'Innate immunity in diabetic kidney disease', *Nat Rev Nephrol*, 16: 206-22.
- Tohme, S., H.O. Yazdani, A.B. Al-Khafaji, A.P. Chidi, P. Loughran, K. Mowen, Y. Wang, R.L. Simmons, H. Huang, and A. Tsung. 2016. 'Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress', *Cancer Res*, 76: 1367-80.
- Toniolo, A., G. Cassani, A. Puggioni, A. Rossi, A. Colombo, T. Onodera, and E. Ferrannini. 2019. 'The diabetes pandemic and associated infections: suggestions for clinical microbiology', *Rev Med Microbiol*, 30: 1-17.
- Trivedi, P., K.L. Graham, B. Krishnamurthy, S. Fynch, R.M. Slattery, T.W. Kay, and H.E. Thomas. 2016. 'Perforin facilitates beta cell killing and regulates autoreactive CD8+ T-cell responses to antigen in mouse models of type 1 diabetes', *Immunol Cell Biol*, 94: 334-41.

- Ueki, S., R.C. Melo, I. Ghiran, L.A. Spencer, A.M. Dvorak, and P.F. Weller. 2013. 'Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans', *Blood*, 121: 2074-83.
- Uriarte, S.M., D.W. Powell, G.C. Luerman, M.L. Merchant, T.D. Cummins, N.R. Jog, R.A. Ward, and K.R. McLeish. 2008. 'Comparison of Proteins Expressed on Secretory Vesicle Membranes and Plasma Membranes of Human Neutrophils', *J Immunol*, 180: 5575-81.
- Valdés, A., M. Castro-Puyana, C. García-Pastor, F.J. Lucio-Cazaña, and M.L. Marina. 2020. 'Time-series proteomic study of the response of HK-2 cells to hyperglycemic, hypoxic diabetic-like milieu', *PLoS One*, 15: e0235118.
- van Grinsven, E., J. Textor, L.S.P. Hustin, K. Wolf, L. Koenderman, and N. Vrisekoop. 2019. 'Immature Neutrophils Released in Acute Inflammation Exhibit Efficient Migration despite Incomplete Segmentation of the Nucleus', *J Immunol*, 202: 207-17.
- van Niekerk, G., C. Christowitz, D. Conradie, and A.M. Engelbrecht. 2019. 'Insulin as an immunomodulatory hormone', *Cytokine Growth Factor Rev*, 52: 34-44.
- Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R.S. Adelstein, and A.R. Horwitz. 2009. 'Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 778-90.
- Viemann, D., A. Strey, A. Janning, K. Jurk, K. Klimmek, T. Vogl, K. Hirono, F. Ichida, D. Foell, B. Kehrel, V. Gerke, C. Sorg, and J. Roth. 2005. 'Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells', *Blood*, 105: 2955-62.
- Viigimaa, M., A. Sachinidis, M. Toumpourleka, K. Koutsampasopoulos, S. Alliksoo, and T. Titma. 2020. 'Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus', *Curr Vasc Pharmacol*, 18: 110-16.
- Vogl, T., K. Tenbrock, S. Ludwig, N. Leukert, C. Ehrhardt, M.A.D. van Zoelen, W. Nacken, D. Foell, T. van der Poll, C. Sorg, and J. Roth. 2007. 'Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock', *Nat Med*, 13: 1042-49.
- Von Ah Morano, A.E., G.P. Dorneles, A. Peres, and F.S. Lira. 2020. 'The role of glucose homeostasis on immune function in response to exercise: The impact of low or higher energetic conditions', *J Cell Physiol*, 235: 3169-88.
- von Rüden, E.-L., C. Zellinger, J. Gedon, A. Walker, V. Bierling, C.A. Deeg, S.M. Hauck, and H. Potschka. 2020. 'Regulation of Alzheimer's disease-associated proteins during epileptogenesis', *Neuroscience*, 424: 102-20.
- Vono, M., A. Lin, A. Norrby-Teglund, R.A. Koup, F. Liang, and K. Loré. 2017. 'Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4(+) T cells in vitro and ex vivo', *Blood*, 129: 1991-2001.
- Wagner, B., A. Burton, and D. Ainsworth. 2010. 'Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals', *Vet Res*, 41: 47.

- Walscheid, K., A. Heiligenhaus, D. Holzinger, J. Roth, C. Heinz, C. Tappeiner, M. Kasper, and D. Foell. 2015. 'Elevated S100A8/A9 and S100A12 Serum Levels Reflect Intraocular Inflammation in Juvenile Idiopathic Arthritis-Associated Uveitis: Results From a Pilot Study', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56: 7653-60.
- Walters, E.M., E. Wolf, J.J. Whyte, J. Mao, S. Renner, H. Nagashima, E. Kobayashi, J. Zhao, K.D. Wells, J.K. Critser, L.K. Riley, and R.S. Prather. 2012. 'Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model', *BMC Med Genomics*, 5: 55.
- Wang, J., M. Hossain, A. Thanabalaesuriar, M. Gunzer, C. Meininger, and P. Kubes. 2017. 'Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair', *Science*, 358: 111-16.
- Wang, J.J., Z.K. Wei, Z. Han, Z.Y. Liu, X.Y. Zhu, X.W. Li, K. Wang, and Z.T. Yang. 2019. 'Zearalenone Induces Estrogen-Receptor-Independent Neutrophil Extracellular Trap Release in Vitro', *J Agric Food Chem*, 67: 4588-94.
- Wang, L., H. Luo, X. Chen, Y. Jiang, and Q. Huang. 2014. 'Functional Characterization of S100A8 and S100A9 in Altering Monolayer Permeability of Human Umbilical Endothelial Cells', *PLoS One*, 9: e90472.
- Wang, S., R. Song, Z. Wang, Z. Jing, S. Wang, and J. Ma. 2018. 'S100A8/A9 in Inflammation', *Front Immunol*, 9: 1298.
- Warboys, C.M., H.-B. Toh, and P.A. Fraser. 2009. 'Role of NADPH Oxidase in Retinal Microvascular Permeability Increase by RAGE Activation', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50: 1319-28.
- Weiss, D.J., and K.J. Wardrop. 2011. *Schalm's Veterinary Hematology* (Wiley).
- Wen, X., X. Xu, W. Sun, K. Chen, M. Pan, J.M. Wang, S.M. Bolland, and T. Jin. 2019. 'G-protein-coupled formyl peptide receptors play a dual role in neutrophil chemotaxis and bacterial phagocytosis', *Mol Biol Cell*, 30: 346-56.
- Wiedemann, C., B. Amann, R.L. Degroote, T. Witte, and C.A. Deeg. 2020. 'Aberrant Migratory Behavior of Immune Cells in Recurrent Autoimmune Uveitis in Horses', *Front Cell Dev Biol*, 8: 101.
- Wilkins, M.R., C. Pasquali, R.D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J.C. Sanchez, J.X. Yan, A.A. Gooley, G. Hughes, I. Humphrey-Smith, K.L. Williams, and D.F. Hochstrasser. 1996a. 'From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis', *Biotechnology (N Y)*, 14: 61-65.
- Wilkins, M.R., J.C. Sanchez, A.A. Gooley, R.D. Appel, I. Humphrey-Smith, D.F. Hochstrasser, and K.L. Williams. 1996b. 'Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it', *Biotechnol Genet Eng Rev*, 13: 19-50.
- Williams, R., S. Karuranga, B. Malanda, P. Saeedi, A. Basit, S. Besançon, C. Bommer, A. Esteghamati, K. Ogurtsova, P. Zhang, and S. Colagiuri. 2020. 'Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition', *Diabetes Res Clin Pract*, 162: 108072.

- Witkowski, L., A. Cywinska, K. Paschalis-Trela, M. Crisman, and J. Kita. 2016. 'Multiple etiologies of equine recurrent uveitis--A natural model for human autoimmune uveitis: A brief review', *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 44: 14-20.
- Wolf, E., C. Braun-Reichhart, E. Streckel, and S. Renner. 2014. 'Genetically engineered pig models for diabetes research', *Transgenic Res*, 23: 27-38.
- Wong, S.L., M. Demers, K. Martinod, M. Gallant, Y. Wang, A.B. Goldfine, C.R. Kahn, and D.D. Wagner. 2015. 'Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing', *Nat Med*, 21: 815-19.
- Woodfin, A., M.-B. Voisin, M. Beyrau, B. Colom, D. Caille, F.-M. Diapouli, G.B. Nash, T. Chavakis, S.M. Albelda, G.E. Rainger, P. Meda, B.A. Imhof, and S. Nourshargh. 2011. 'The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo', *Nat Immunol*, 12: 761-69.
- Xenakis, J.J., E.D. Howard, K.M. Smith, C.L. Olbrich, Y. Huang, D. Anketell, S. Maldonado, E.W. Cornwell, and L.A. Spencer. 2018. 'Resident intestinal eosinophils constitutively express antigen presentation markers and include two phenotypically distinct subsets of eosinophils', *Immunology*, 154: 298-308.
- Xia, Y., Z. Xie, G. Huang, and Z. Zhou. 2019. 'Incidence and trend of type 1 diabetes and the underlying environmental determinants', *Diabetes Metab Res Rev*, 35: e3075.
- Xu, J., L.J. Chen, J. Yu, H.J. Wang, F. Zhang, Q. Liu, and J. Wu. 2018. 'Involvement of Advanced Glycation End Products in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy', *Cell Physiol Biochem*, 48: 705-17.
- Yamanishi, Y., K. Mogi, K. Takahashi, K. Miyake, S. Yoshikawa, and H. Karasuyama. 2020. 'Skin-infiltrating basophils promote atopic dermatitis-like inflammation via IL-4 production in mice', *Allergy*, 75: 2613-22.
- Yang, L., Q. Liu, X. Zhang, X. Liu, B. Zhou, J. Chen, D. Huang, J. Li, H. Li, F. Chen, J. Liu, Y. Xing, X. Chen, S. Su, and E. Song. 2020. 'DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25', *Nature*, 583: 133-38.
- Yang, W., Y. Tao, Y. Wu, X. Zhao, W. Ye, D. Zhao, L. Fu, C. Tian, J. Yang, F. He, and L. Tang. 2019. 'Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair', *Nat Commun*, 10: 1076.
- Yin, C., and B. Heit. 2018. 'Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules', *Cell Tissue Res*, 371: 455-71.
- Yipp, B.G., B. Petri, D. Salina, C.N. Jenne, B.N.V. Scott, L.D. Zbytnuik, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H.C. Meijndert, S.E. Malawista, A. de Boisfleury Chevance, K. Zhang, J. Conly, and P. Kubes. 2012. 'Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo', *Nat Med*, 18: 1386-93.
- Yoon, J., H.-N. Um, J. Jang, Y.-A. Bae, W.-J. Park, H.J. Kim, M.-S. Yoon, I.Y. Chung, and Y. Jung. 2019. 'Eosinophil Activation by Toll-Like Receptor 4 Ligands Regulates Macrophage Polarization', *Front Cell Dev Biol*, 7: 329.

- Yousefi, S., C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, and H.U. Simon. 2009. 'Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps', *Cell Death Differ*, 16: 1438-44.
- Yousefi, S., D. Simon, D. Stojkov, A. Karsonova, A. Karaulov, and H.-U. Simon. 2020. 'In vivo evidence for extracellular DNA trap formation', *Cell Death Dis*, 11: 300.
- Yousefi, S., and H.-U. Simon. 2016. 'NETosis - Does It Really Represent Nature's "Suicide Bomber"?', *Front Immunol*, 7: 328.
- Yuk, C.M., H.J. Park, B.I. Kwon, S.J. Lah, J. Chang, J.Y. Kim, K.M. Lee, S.H. Park, S. Hong, and S.H. Lee. 2017. 'Basophil-derived IL-6 regulates T(H)17 cell differentiation and CD4 T cell immunity', *Sci Rep*, 7: 41744.
- Zatterale, F., M. Longo, J. Naderi, G.A. Raciti, A. Desiderio, C. Miele, and F. Beguinot. 2020. 'Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes', *Front Physiol*, 10: 1607.
- Zhang, Y., X.F. Pan, J. Chen, L. Xia, A. Cao, Y. Zhang, J. Wang, H. Li, K. Yang, K. Guo, M. He, and A. Pan. 2020. 'Combined lifestyle factors and risk of incident type 2 diabetes and prognosis among individuals with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies', *Diabetologia*, 63: 21-33.
- Zhao, L., X. Cong, L. Zhai, H. Hu, J.Y. Xu, W. Zhao, M. Zhu, M. Tan, and B.C. Ye. 2020. 'Comparative evaluation of label-free quantification strategies', *J Proteomics*, 215: 103669.
- Zippelies, J.K., M. Kirschfink, B. Amann, S.M. Hauck, M. Stangassinger, and C.A. Deeg. 2010. 'Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model', *Immunobiology*, 215: 949-55.

## DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg bedanken, die mir ermöglicht hat, unter ihrer Leitung in diesem spannenden Forschungsfeld zu promovieren. Mit ihrem außerordentlichen Engagement und den anregenden Diskussionen brachte sie mich dazu, auch 'mal abseits eingetretener Pfade zu denken und manche Dinge nicht einfach als gegeben hinzunehmen. Dafür und für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung der beiden Publikationen, die ständig zuverlässige Betreuung und das schnelle Korrekturlesen – auch außerhalb gesetzter Deadlines - möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Es ist wirklich nicht selbstverständlich, für seine Doktoranden zu praktisch jeder Tages- und Nachtzeit erreichbar zu sein.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. Stefanie Hauck bedanken, unter deren Leitung die Proteomanalysen am Helmholtz Zentrum München durchgeführt wurden. Ihre kompetente Unterstützung bei allen proteomischen und massenspektrometrischen Fragestellungen und die schnellen Korrekturen trugen maßgeblich dazu bei, dass im Rahmen dieser Doktorarbeit gleich zwei Veröffentlichungen entstanden.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf und Frau Dr. Simone Renner, für die fachliche Unterstützung beim Verfassen der ersten Publikation und die Möglichkeit mit Immunzellen eines transgenen Schweinemodells arbeiten zu können.

Herrn Prof. Dr. Göhring und Herrn Prof. Dr. Gerhards sowie Frau PD Dr. Wollanke danke ich herzlich für die Überlassung der in dieser Arbeit verwendeten equinen Blutproben.

Ein großes Dankeschön auch an Barbara Amann, Claudia Guggenmos, Florian Gosselin und Sieglinde Hirmer für die Unterstützung bei all den kleinen und großen Problemen des Laboralltags. Egal ob beim dritten Blotversuch, bei ausufernden Pudding-Inkubationsansätzen, beim Durcharbeiten ellenlanger Chemikalienverzeichnisse oder der stundenlangen Suchen nach dem einen besonders hübschen Granulozyten unter'm Mikroskop, immer konnte ich auf eure Hilfe zählen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meinen Kollegen Anne Hoffmann, Bernhard Hobmaier, Carmen Wiedemann, Claudia Barfüßer, Franziska Stetter, Isabella Giese, Kristina Kleinwort, Lea Lorenz, Lucia Korbonits, Marie Schilloks und Roxanne Degroote. Ihr habt die Arbeit hier zu einer wirklich großartigen Zeit gemacht, mit all den gemeinsamen Momenten beim Ausharren vor sich sträubenden FACS-Geräten, bei unseren Mittagspausen auf der Dachterrasse, beim Feierabendbier auf der Picknickwiese und natürlich bei den ganzen

## Danksagung

---

Ausflügen. Danke, dass Ihr beim Blutpräparieren immer an mich gedacht habt und ich von Euren „Resten“ profitieren durfte. Ein extra Dankeschön auch nochmal an dich, Roxy, für die aufbauenden Telefonate während der Erstellung der zweiten Publikation, und die hilfreichen Kommentare und Korrekturvorschläge zu dieser Arbeit.

Bei meiner Familie möchte ich mich bedanken, für die uneingeschränkte Unterstützung, nicht nur während der Promotionszeit sondern auch darüber hinaus: meiner Mutter für die liebevollen Ermahnungen, dass es auch für Doktoranden sowas wie Wochenende geben muss, und meinem Vater für die Korrektur-Nachtschicht am Ende. Danke, dass Ihr immer für mich da seid und Euren beiden Tiermedizinerinnen auch die mitunter etwas ausschweifenden „Fachgespräche“ nachseht. Für all diese Gespräche, die geteilte Leidens-/Lernzeit und die unzähligen lustigen Momente danke ich meiner Schwester Anna von ganzem Herzen. Gemeinsam mit dir ist einfach alles besser!

Und schließlich gilt ein ganz besonderer Dank meinem Freund Tom, der all meine Launen gelassen erträgt, mir den Rücken frei gehalten hat und mit dem der Schreib-Alltag trotz Corona-Lockdown und Homeoffice herrlich unkompliziert war. Danke, dass du mir immer Mut zugesprochen und auch verstanden hast, wenn ich mal wieder nächtelang nicht vom Schreibtisch weggekommen bin.