

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

Differentielle Immunantwort auf *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis* bei Milchkühen

von Lucia Janina Korbonits
aus Starnberg

München 2023

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: Prof. Dr. Frank Ebel

Tag der Promotion: 11. Februar 2023

Meiner Familie

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	3
2.1	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	3
2.1.1	Taxonomie und Morphologie	3
2.1.2	Zellwand und Tenazität.....	4
2.1.3	Resistenz gegen Pasteurisierung	5
2.1.4	Wirtsspektrum und globale Verbreitung	6
2.2	Paratuberkulose	7
2.2.1	Bekämpfung.....	7
2.2.1.1	Management auf Betriebsebene	8
2.2.1.2	Schlachtung positiv getesteter Rinder	9
2.2.1.3	Vakzination.....	10
2.2.2	Indirekte Nachweismethoden.....	11
2.2.2.1	Nachweis humoraler Antikörper	11
2.2.2.2	Nachweis zellgebundener Immunität.....	14
2.2.3	Direkte Nachweismethoden	15
2.2.3.1	Kulturelle Anzucht	15
2.2.3.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	16
2.2.4	Immunreaktion und Pathogenese	17
2.2.5	Krankheitsverlauf der Paratuberkulose	20
2.2.6	Deviante Immunphänotypen	21
2.3	Differentielle Proteomanalyse	22
2.3.1	LC MS/MS.....	23
3	PUBLIKATION	25
4	DISKUSSION	42
5	ZUSAMMENFASSUNG	56
6	SUMMARY	58
7	LITERATURVERZEICHNIS	60
	DANKSAGUNG	77

Abkürzungsverzeichnis

BNP	Bovine neonatale Panzytopenie
BoLa	<i>engl.</i> bovine leucocyte antigen
BVDV	<i>engl.</i> bovine viral diarrhea virus
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
CNOT1	<i>engl.</i> CCR4-NOT transcription complex subunit 1
DMT1	Diabetes mellitus Typ 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESCC	Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus (<i>engl.</i> esophageal squamous cell carcinoma)
h	Stunde (<i>engl.</i> hour)
ICPL	<i>engl.</i> isotype-coded protein label
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (<i>engl.</i> inducible nitric oxide synthase)
ITGA2B	Integrin alpha 2b
iTRAQ	<i>engl.</i> isobaric tags for relative and absolute quantitation
KCNMA1	<i>engl.</i> calcium-activated potassium channel subunit alpha-1
LC MS/MS	<i>engl.</i> liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry
MAC	<i>engl.</i> <i>Mycobacterium avium</i> complex
MALDI TOF/TOF	<i>engl.</i> matrix-assisted laser desorption and ionisation time of flight/time of flight
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
mg	Milligramm
MHC II	<i>engl.</i> major histocompatibility complex class II
MLSA	lösliches Antigen von <i>Mycobacterium leprae</i> (<i>engl.</i> <i>Mycobacterium leprae</i> soluble antigen)
MOTT	<i>engl.</i> mycobacteria other than tuberculosis
MS	Multiple Sklerose
ncp	<i>engl.</i> non-cytopathic
NO	Stickstoffmonoxid (<i>engl.</i> nitric oxide)
OR	Quotenverhältnis (<i>engl.</i> odds ratio)

Abkürzungsverzeichnis

PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>engl.</i> peripheral blood mononuclear cells)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PMA	Thrombozyten-Monozytenaggregate (<i>engl.</i> platelet-monocyte aggregate)
PPD	gereinigte Proteinderivate (<i>engl.</i> purified protein derivatives)
PPDA	aviäre gereinigte Proteinderivate (<i>engl.</i> avian purified protein derivatives)
PPDB	bovine gereinigte Proteinderivate (<i>engl.</i> bovine purified protein derivatives)
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> quantitative polymerase chain reaction)
ROI	reaktive Sauerstoffzwischenprodukte (<i>engl.</i> reactive oxygen intermediates)
SILAC	<i>engl.</i> stable isotope labeling with amino acids in cell culture
Th	<i>engl.</i> T-helper
TLR	<i>engl.</i> Toll-like-receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
α	alpha
β	beta
γ	gamma
cp	<i>engl.</i> cytopathic
n.a.	nicht angegeben

1 EINLEITUNG

Die Paratuberkulose ist eine infektiöse, chronische, gastrointestinale Erkrankung des Rindes sowie anderer Wild- und Hauswiederkäuer (Hernández-Reyes, Chávez-Gris et al. 2022). Die hohe Tenazität des zugrundeliegenden Erregers *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), dessen schwieriger Nachweis und fehlende wirksame Behandlungsmöglichkeiten, stellen weltweit eine starke Beeinträchtigung für die Tiergesundheit dar (Field, McAloon et al. 2022).

Bereits vor dem Auftreten gastrointestinaler Symptome sind ein Abfall der Milchleistung, verminderte Fruchtbarkeit und ein allgemein schlechter Gesundheitszustand betroffener Rinder zu verzeichnen (Beinhauerova, Beinhauerova et al. 2021). Die Erregerausscheidung über Kot und Milch dieser Tiere, welche ebenfalls vor dem Auftreten klinischer Symptome stattfindet, stellt eine Gefahr für gesunde Tiere der Herde dar (Beinhauerova, Beinhauerova et al. 2021). Nur ein Tier aus 25 infizierten Tieren entwickelt starke klinische Symptome in der letzten Phase der Erkrankung, welche von Abmagerung und unstillbarem Durchfall gekennzeichnet ist und tödlich enden kann (Whitlock and Buergelt 1996, Beinhauerova, Beinhauerova et al. 2021). In der oft jahrelangen Inkubationszeit bis zum Ausbruch der Paratuberkulose werden subklinisch infizierte Tiere mittels üblicher Detektionsverfahren nicht zuverlässig identifiziert, da Erreger weder über Milch und Kot ausgeschieden werden, noch Antikörper gegen MAP im Serum nachzuweisen sind (Field, Mee et al. 2022). Gepaart mit der hohen Resistenz des Erregers gegen gebräuchliche Antibiotika kommt es zur stetigen Verbreitung der Paratuberkulose in Rinderbeständen in Deutschland und auf der ganzen Welt (Kuenstner and Kuenstner 2021). Maßnahmen zur Eindämmung des Erregers, wie Hygienemanagement, Isolierung und Schlachtung infizierter Rinder, isoliertes Kälberzuchtmanagement sowie Vakzination, konnten bisher ebenfalls keine Eliminierung von MAP aus Rinderbeständen bewirken (Gupta, Singh et al. 2019). Das übergreifende Ziel ist daher die Mechanismen zwischen Wirt und Erreger besser zu verstehen und daraus resultierend geeignetere Bekämpfungs- und Zuchtstrategien zu entwickeln. Die Exposition eines Rindes mit dem Erreger ist durch aktuelle Zwischen-Herden Prävalenzen von 3,6 % (Süddeutschland) zu 14,8 % (Norddeutschland) zu 50,1 % (Ostdeutschland), welche durch Beprobung der Stallumgebung festgestellt wurden, sehr wahrscheinlich (Eisenberg, Krieger et al.

2022). Es wird diskutiert, dass die Empfänglichkeit für Kühe sich mit MAP zu infizieren variiert, und das sowohl zwischen verschiedenen Rinderrassen, also auch bei Rindern aus demselben Bestand mit gleicher Rasse (Al-Mamun, Smith et al. 2016, Sallam, Zare et al. 2017, Kleinwort, Hauck et al. 2019). Nach Kontakt mit MAP scheinen manche Kälber den Erreger erfolgreich zu eliminieren, während andere an einer persistierenden Infektion leiden (Baquero and Plattner 2016). Ziel der Studie war es, Unterschiede in der Immunantwort zwischen gesunden und MAP-infizierten Kühen eines Bestandes zu eruieren, die dazu beitragen können den differentiellen Infektionsstatus der Tiere zu erklären. Deshalb analysierten wir das Proteom peripherer mononukleärer Blutzellen dieser Tiere nach erneuter MAP-Infektion *in vitro*.

2 LITERATUR

2.1 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

2.1.1 Taxonomie und Morphologie

MAP, der obligat pathogene Erreger der Paratuberkulose des Rindes, gehört zur Familie der *Mycobacteriaceae* aus der Ordnung der *Aktinomyzeten* und der einzigen Gattung *Mycobacterium* (Marek 1910, Twort and Ingram 1912). Der zunächst als *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* bezeichnete Erreger wurde erst später dem *Mycobacterium avium* Komplex (MAC) zugeordnet und wird seither als *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* bezeichnet (Saxegaard, Baess et al. 1988, Yoshimura and Graham 1988).

Bei MAP handelt es sich um ein aerobes, unbewegliches, nicht-sporenbildendes und säurefestes Stäbchen des MAC, einer Gruppe „nicht-tuberkulöser Mykobakterien“ (*engl.* nontuberculous mycobacteria) oder „mycobacteria other than tuberculosis“ (MOTT), die sich schwach nach Gram anfärben lassen (Ssekitoleko, Ojok et al. 2021). Ubiquitär in der Umwelt nachweisbar, unterteilen sich Mykobakterien in pathogen und nicht pathogen, wobei sich die pathogenen Mykobakterien wiederum in den *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex und den MAC unterteilen lassen (Viale, Zumárraga et al. 2016). Der Gruppe des MAC werden neben MAP und *Mycobacterium avium* subsp. *avium* auch noch die anderen Subspezies *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *intracellulare* und *M. avium* subsp. *silvaticum* zugeordnet, die oft weder phänotypisch noch serologisch voneinander zu unterscheiden sind (Shin, Shin et al. 2020). Diese Mykobakterien sind ubiquitär verbreitet und ähneln sich genetisch sehr stark, unterscheiden sich aber dennoch in ihrer Infektiosität bei Menschen, Säugetieren und Vögeln (Keen, Choi et al. 2021, Kaczmarkowska, Didkowska et al. 2022). Trotz zahlreicher Gemeinsamkeiten unterscheidet sich MAP von den anderen Subspezies des MAC, unter anderem aufgrund seines sehr langsamen Wachstums *in vitro* (Elguezabal, Bastida et al. 2011). MAP benötigt in der sehr zeitintensiven bakteriellen Anzucht, im Gegensatz zu anderen Mykobakterien, supplementiertes Mykobaktin um zu replizieren, einen Eisen-Chelator, welchen andere Mykobakterien selbst synthetisieren, was ihnen ein Wachstum auch außerhalb des Wirtes ermöglicht (Dane, Koidis et al. 2022).

2.1.2 Zellwand und Tenazität

Die Hülle von Mykobakterien ist maßgeblich für deren Eigenschaften verantwortlich und beeinflusst Form, Resistenzmechanismen und die Widerstandsfähigkeit im Wirt (Daffé and Marrakchi 2019). Sie besteht aus einer typischen Zellmembran aus Phospholipiden und Proteinen, welche von einer komplex aufgebauten Zellwand- unterteilt in ein inneres und äußeres Blatt- sowie einer aus Polysacchariden und Proteinen bestehenden Kapsel umschlossen ist (Abrahams and Besra 2021). Das innere und das äußere Blatt ergeben zusammen die äußere Membran - die Mykomembran (Daffé and Marrakchi 2019). Das sogenannte Zellwandskelett besteht aus Peptidoglykanen, welche fest an Arabinogalaktane gebunden sind, deren Enden aus Pentasacchariden mit langkettigen Fettsäuren verestert sind - den Mykolsäuren (Daffé and Marrakchi 2019, Abrahams and Besra 2021). Die Mykolsäuren bilden die Innenseite des äußeren Blatts der Zellwand von Mykobakterien (Daffé and Marrakchi 2019). Das äußere Blatt der Mykomembran besteht aus Glykolipiden und Trehalose-Mykolaten (Daffé and Marrakchi 2019). Der hohe Gehalt an Lipiden, welcher bis zu 40 % der Trockenmasse des Bakteriums ausmachen kann, erklärt die hydrophoben Eigenschaften und die Säurefestigkeit der Mykobakterien (Chiaradia, Lefebvre et al. 2017, Hermann, Karamchand et al. 2021). Das gängige mikroskopische Nachweisverfahren der Ziehl-Neelsen Färbung beruht auf der Säurefestigkeit des inneren Blatts der Mykomembran (Octora, Kawilarang et al. 2022). Dabei ist der von Mykobakterien aufgenommene rote Farbstoff Karbolfuchsin auch nach Zugabe von Salzsäure und Ethanol nicht mehr aus der Zellwand zu lösen (Octora, Kawilarang et al. 2022). Das Bakterium bleibt somit ziegelrot angefärbt (Octora, Kawilarang et al. 2022). Diese einzigartige Zellwandstruktur macht es möglich, Mykobakterien von anderen Bakterien zu unterscheiden. Außerdem dient die lipidreiche Hülle als Permeabilitätsbarriere und führt zur besonderen Widerstandsfähigkeit von Mykobakterien gegenüber Umwelteinflüssen wie Desinfektionsmitteln und Antibiotika (Hermann, Karamchand et al. 2021). Die für die Mykobakterien notwendigen Nährstoffe, wie Kohlenhydrate, Phosphate, Sulfate und Aminosäuren, gelangen mittels Transportproteinen durch die Membran (Hermann, Karamchand et al. 2021). Während eine Infektion des Menschen mit MAC mit Makrolidantibiotika (Azithromycin oder Clarithromycin), Rifamycin (Rifampin oder Rifabutin) und Ethambutol behandelt wird, gilt die durch

MAP ausgelöste Paratuberkulose beim Wiederkäuer als unheilbar (Matern, Parker et al. 2021).

2.1.3 Resistenz gegen Pasteurisierung

Bei der Pasteurisierung von Milch wird diese für 15 Sekunden 72°C oder für 30 Minuten auf 63°C erhitzt und danach sofort wieder abgekühlt (Clawin-Rädecker, De Block et al. 2021). Zur Überprüfung der erfolgreichen Pasteurisierung von Milch sollte der Test auf alkalische Phosphatase negativ ausfallen (Clawin-Rädecker, De Block et al. 2021). Dieser Prozess, dessen Einführung auf Louis Pasteur (1822-1895) zurückzuführen ist, dient seit dem 19. Jahrhundert dazu, Lebensmittel, unter anderem Milch, von Mikroorganismen und Keimen zu befreien und dem Verbraucher ein sicheres Lebensmittel zu garantieren (Clawin-Rädecker, De Block et al. 2021). Die Ausbreitung von *Mycobacterium bovis*, dem Erreger der Rindertuberkulose, sowie *Coxiella burnetii* konnte durch diese Methode unterbrochen werden (Cho, Lee et al. 2020). Seit einigen Jahren wird jedoch vermutet, dass MAP den Pasteurisierungsprozess überleben kann (Chiodini and Hermon-Taylor 1993, Kuenstner and Kuenstner 2021). Neben neuen Erkenntnissen zur Hitzeresistenz bei MAP lassen Forschungsergebnisse einen Zusammenhang bei der Pathogenese zwischen MAP und Morbus Crohn, einer schweren chronischen Entzündung des Magen-Darm-Traktes beim Menschen, vermuten (Honap, Johnston et al. 2021). Dies könnte darin begründet sein, dass MAP in der Milch wie auch in der Flüssigkultur beobachtet, Aggregate bildete (Gerrard, Swift et al. 2018). Bakterien in deren Zentrum könnten nicht genügend stark erhitzt werden oder andererseits in somatischen Zellen der Milch vorliegen und deshalb besser vor Hitze geschützt sein (Gerrard, Swift et al. 2018). Die Pasteurisierung am Hof ist vielerorts bereits üblich, da die orale Aufnahme lebender MAPs bei Kälbern verhindert werden soll, weil sie als empfängliche Altersgruppe gelten (Fechner, Dreyman et al. 2019). Auch hier konnte gezeigt werden, dass eine Pasteurisierung der Rohmilch zwar zu einer Reduktion, aber zu keiner Elimination lebender MAPs und damit zur oralen Übertragung auf Kälber führten (Fechner, Dreyman et al. 2019).

2.1.4 Wirtsspektrum und globale Verbreitung

Die Paratuberkulose, welche vor allem bei domestizierten Wiederkäuern, wie Rind, Schaf und Ziege eine Rolle spielt, ist in Europa und Nordamerika endemisch verbreitet (Nielsen and Toft 2009, Carslake, Grant et al. 2011, Lombard, Gardner et al. 2013). Ebenso konnte MAP in Rinderhaltungen in Südamerika, Indien und China nachgewiesen werden (Cheng, Liu et al. 2020, Echeverr, Escobar et al. 2020, Sharma, Gautam et al. 2020). Neben den domestizierten Wiederkäuerarten konnte MAP auch in wildlebenden Wiederkäuerarten wie Hirschen, Giraffen, Antilopen, Gnus (Hernández-Reyes, Chávez-Gris et al. 2022), Bisons und Kamelen (Salem, El-Deeb et al. 2019) isoliert und nachgewiesen werden. In anderen wildlebenden Spezies wie Dachsen, Kojoten, Krähen, Wildkatzen, Opossums, Kaninchen, Waschbären (Münster, Fechner et al. 2013) und Füchsen (Beard, Daniels et al. 2001) wurde der Erreger ebenfalls mittels PCR nachgewiesen. Obwohl MAP hauptsächlich in domestizierten Wiederkäuern eine Infektion hervorruft, bestehen Bedenken hinsichtlich eines Reservoirs in wildlebenden Nicht-Wiederkäuern, da MAP hier bereits regelmäßig nachgewiesen werden konnte (Arsenault, Maattanen et al. 2014, Čurlík, Lazár et al. 2020).

In der Umwelt konnte MAP in fäkalen Ausscheidungen und der Erde in schattiger Umgebung für 12 Wochen, in Wasser und Schmutzablagerungen aus Wassertanks für 48 Wochen überleben (Whittington, Marsh et al. 2005). Trotzdem ist der Lebenszyklus von MAP in der Umwelt noch ungenügend erforscht (Samba-Louaka, Robino et al. 2018). In einer frei lebenden Amöbenart aus dem Wassertank eines Paratuberkulosebestandes konnte MAP nachgewiesen werden (Samba-Louaka, Robino et al. 2018). Außerdem konnte MAP *in vitro* in frei lebenden Amöben, welche auch im Wasser von Tiertränken zu finden sind und den Phagozytose-Prozess von Immunzellen überleben können, nachgewiesen werden (Samba-Louaka, Robino et al. 2018). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Wasser ein mögliches Reservoir für Mykobakterien in der Umwelt sein könnte (Whittington, Marsh et al. 2005). In einer Studie unter experimentellen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass MAP sich, abhängig vom pH-Wert des Bodens, an verschiedene Bestandteile im Boden anheftet und so möglicherweise besser in der Umwelt überleben kann (Dhand, Toribio et al. 2009).

Die Rolle von MAP bei humanen Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ 1 (DMT1), Multipler Sklerose (MS) und Morbus Crohn wird seit langer Zeit diskutiert, es besteht jedoch noch keine Klarheit über den genauen Einfluss von MAP bei diesen Erkrankungen, da die Pathogenese und der Krankheitsverlauf der einzelnen Erkrankungen unvollständig aufgeklärt sind (Waddell, Rajić et al. 2015). In einer Metaanalyse von systematisch erfassten MAP- bezogenen DMT1 und MS Studien konnte mittels der Odds Ratio (OR, eine Messzahl, die den Zusammenhang zwischen MAP und DMT1 beziehungsweise MS beschreibt) eine signifikante Assoziation beider Parameter gezeigt werden (Ekundayo, Falade et al. 2022, Ekundayo, Olasehinde et al. 2022). In Metaanalysestudien zur Untersuchung der OR zwischen MAP und Morbus Crohn konnte ebenfalls ein spezifischer Zusammenhang gezeigt werden (Feller, Huwiler et al. 2007). Es ist jedoch nicht definiert, welche Rolle MAP in der Ätiologie von Morbus Crohn spielt (Feller, Huwiler et al. 2007). Der Einsatz von einer Anti-MAP-Therapie mit RHB-104, einer definierten Zusammensetzung aus 95 mg Clarithromycin, 10 mg Clofazimin und 45 mg Rifabutin, welche synergistisch inhibitorisch auf MAP-Stämme isoliert aus Morbus Crohn-Patienten wirken, wurde nach Abschluss der Phase 3 Studien beim Menschen als ein bedeutender Bestandteil im Morbus Crohn Management eingestuft (Savarino, Bertani et al. 2019, Honap, Johnston et al. 2021). Die Dosen der eingesetzten Antibiotika waren höher als in einer 2007 durchgeführten Studie, in der bereits dieselben Antibiotika in Bezug auf die Behandlung von Morbus Crohn untersucht und keine Wirkung der Medikamente festgestellt wurden (Selby, Pavli et al. 2007). Jedoch kann, trotz Hinweisen auf eine mögliche Korrelation zwischen dem Nachweis von MAP bei Morbus Crohn Patienten und einem klaren ätiologischen Zusammenhang in der Pathogenese von Morbus Crohn, der Einfluss von MAP auf Morbus Crohn abschließend nicht bewiesen werden (Liverani, Scaioli et al. 2014).

2.2 Paratuberkulose

2.2.1 Bekämpfung

Die Krankheit Paratuberkulose ist in Deutschland bei einem Einzeltiernachweis für die Tierarten Rind, Schaf und Ziege meldepflichtig, jedoch gibt es in Deutschland aktuell kein nationales obligates Bekämpfungsprogramm (BMEL 2021). Bis heute ist kein Heilmittel für die Paratuberkulose bekannt, infizierte Tiere werden meist

zeitnah geschlachtet (Tilocca, Soggiu et al. 2020). In Niedersachsen besteht durch ein Landesgesetz eine Untersuchungspflicht für Milchviehbestände (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2005). Die Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen ist in Deutschland aktuell freiwillig (BMEL 2021).

2.2.1.1 Management auf Betriebsebene

Managementstrategien zielen darauf ab, die Transmissionsrate von MAP zwischen Einzeltieren zu mindern, was die strikte Trennung von gesunden und infizierten Tieren voraussetzt (Beaver, Ruegg et al. 2016). Auch wenn die erfolgreiche Eliminierung von MAP aus einem Ziegenbestand mittels Managementstrategien bereits berichtet wurde, konnten solche Erfolge in infizierten Rinderherden bislang nicht verzeichnet werden (Barkema, Orsel et al. 2018, Gavin, Porter et al. 2018).

Bezüglich der Managementstrategien zur Paratuberkulosekontrolle gibt es unterschiedliche Ansätze, die von Betrieb zu Betrieb stark differieren können (McAloon, Roche et al. 2019). Eine große Schwierigkeit bei der Umsetzung begründet sich darin, dass sich Milchkuhhaltungen stark in Größe, Management und Umsatz unterscheiden, denn was für einen großen, modern geleiteten Betrieb umsetzbar ist, kann für einen Mastbetrieb oder kleineren Familienbetrieb schwierig, bis nicht umsetzbar sein (McAloon, Roche et al. 2019). Mögliche Managementstrategien wurden bisher basierend auf der Grundlage bekannter Ausscheidungswege des Erregers und des altersabhängigen Infektionsrisikos entwickelt, jedoch fehlen hier oft Feldversuche zur Wirksamkeit dieser Managementstrategien (McAloon, Roche et al. 2019). Abgeleitete Managementmaßnahmen, welche bereits in neun US-amerikanischen Milchviehherden eine verringerte Prävalenz von MAP in der Herde erreichen konnten, umfassten von der Herde abgetrennte Kalbebereiche, Isolierung der Kälber innerhalb von zwei Stunden nach Kalbung von der Mutter, hygienische Kolostrumaufbereitung, Fütterung der Kälber ausschließlich mit pasteurisierter Milch oder Milchaustauschern, Trennung von Kälbern und Kühen adulten Alters, Aussortieren von stark positiven Tieren im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) aus der Herde und Auswahl von ELISA-negativen Ersatzfärsen (Collins, Eggleston et al. 2010). Auch mittels des „Thüringer Kontrollprogramms“ konnte durch Aussortieren seropositiver Tiere, verbesserte Hygiene, Kontrolle des

Infektionsstatus neuer Tiere und regelmäßige Kontrolle des Infektionsstatus der Herde eine sinkende kumulative Inzidenz, d.h. ein Rückgang von neu auftretenden Fällen verzeichnet werden (Donat 2017). In anderen Studien konnte jedoch wiederum auch von keiner Senkung der Herdenprävalenz berichtet werden, was einerseits sicherlich der schlechten Standardisierung aufgrund der sich stark unterscheidenden innerbetrieblichen Vorgänge geschuldet ist, andererseits aber auch durch die noch nicht vollständig aufgeklärten Reservoirs und Pathogenese-Mechanismen (Nielsen and Toft 2011, Klopstein, Leyer et al. 2021).

2.2.1.2 Schlachtung positiv getesteter Rinder

Die Entfernung positiv getesteter Tiere, im Englischen bekannt unter „test-and-cull“, stellt eine mögliche Bekämpfungsstrategie dar, denn diese Tiere scheiden den Erreger über den Kot aus, kontaminieren damit die Umwelt und dienen damit als potentielle Infektionsquelle für gesunde Tiere (Fichtelová, Králová et al. 2022). Diagnostische Tests lassen sich in direkte und indirekte Nachweismethoden unterteilen: zu den direkten Methoden zählen kulturelle Anzucht und PCR aus Kotproben (Field, Mee et al. 2022). Eine indirekte Nachweismethode stellt der ELISA dar, mit dem anti-MAP-Antikörper detektiert werden können (Aly, Anderson et al. 2012, More, Cameron et al. 2015, Beaver, Sweeney et al. 2017). Es konnte festgestellt werden, dass „test-and-cull“ eine sinnvolle Strategie darstellte, wenn sie zum richtigen Zeitpunkt und zwar bei Herden mit synchronisierter Kalbung, vor der Kalbbeperiode eingesetzt wurde (Biemans, Ben Romdhane et al. 2021). Demnach kann diese Strategie in manchen Szenarien erfolgversprechend sein, in der Regel resultiert jedoch bei alleiniger Anwendung dieser Strategie ohne Kombination mit anderen Bekämpfungsstrategien keine Erregerfreiheit im Betrieb, sondern allenfalls eine Reduktion der Herdenprävalenz (Al-Mamun, Smith et al. 2017). Der Ursprung der „test-and-cull“-Methode findet sich im Bekämpfungsprogramm gegen die bovine Tuberkulose, welche mittels intradermaler Tuberkulin-Tests und dem Keulen positiv getesteter Tiere in vielen Ländern, wie auch in Deutschland, erfolgreich eliminiert wurde (Lakew, Srinivasan et al. 2022). Allerdings traten bei der Tuberkulintestung einer kombinierten Bullen- und Eberstation im Rahmen eines geplanten Exports bei den Tieren deutliche Hautreaktionen bei etwa der Hälfte der Tiere auf Vogeltuberkulin und auch auf Rindertuberkulin auf (Fodstad 1977). Nach bakteriologischer Untersuchung aus Proben von zu diagnostischen Zwecken

geschlachteten Tieren wurden jedoch in nur zwei von vierzehn reagierenden Ebern und bei keinem der geschlachteten Bullen Stämme von *Mycobacterium avium* festgestellt (Fodstad 1977). Es wurden atypische Mykobakterienstämme in Proben aus sowohl der Umgebung, als auch aus drei Ebern, zwei Bullen und einer Taube isoliert, was auf eine mögliche Sensibilisierung der Tiere mit ähnlichen Mykobakterienstämmen hindeutete (Fodstad 1977). In weiterführenden Untersuchungen wurden bei gegen einen der nachgewiesenen atypischen Mykobakterienstämme immunisierten Meerschweinchen und Schweinen Kreuzreaktionen auf Vogel- und Rindertuberkulin nachgewiesen (Fodstad 1977). Daraus konnte geschlossen werden, dass die beobachteten Tuberkulinreaktionen nicht auf eine Infektion mit *Mycobacterium bovis* zurückzuführen waren, sondern auf eine Sensibilisierung der Tiere mit atypischen Mykobakterien, was zu einer verringerten Spezifität des Tuberkulin-Hauttests führte (Fodstad 1977, Jenkins, Gormley et al. 2018).

In Deutschland und vielen anderen Ländern mit striktem Bekämpfungsprogramm konnte 1997 der Status „amtlich anerkannt tuberkulosefrei“ erreicht werden, jedoch spielen in manchen Ländern unter anderem Wildreservoir eine Rolle, die aus dem Raster des Bekämpfungsprogramms fallen (BMEL 2019, Juste, Geijo et al. 2021). Strategien in der Paratuberkulosebekämpfung, welche sich lediglich auf das Entfernen positiv getesteter Tiere stützen, konnten keine befriedigende Senkung der Herdenprävalenz erreichen (Groenendaal and Galligan 2003). Das begründet sich unter anderem darin, dass neben dem direkten Übertragungsweg von Tier zu Tier, auch der indirekte Übertragungsweg durch die Umwelt und möglichen Erreger-Reservoirs, eine Rolle spielen (Kirkeby, Græsbøll et al. 2018).

2.2.1.3 **Vakzination**

Eine Impfung gegen die bovine Paratuberkulose ist möglich. Es wurde erstmals 1926 von einem Vakzin berichtet, welches aus einem lebenden, nichtvirulenten MAP-Adjuvans bestand (Vallee and Rinjard 1926). Während des zwanzigsten Jahrhunderts wurden sowohl Lebend- als auch Totvakzine in Verbindung mit Adjuvantien für die aktive Immunisierung von Rindern und Schafen entwickelt (Rosseels and Huygen 2008).

Durch die Anwendung einer Totvakzine vor dem dritten Lebensmonat konnte ein lebensverlängernder Effekt bei Kälbern festgestellt werden (Juste, Geijo et al.

2021). Eine Reduzierung der Erregerausscheidung von 48 % auf 1,4 % konnte mittels Bakterioskopie vom Kot geimpfter Rinder über einen fünfjährigen Zeitraum beobachtet werden (Körmendy 1994). Durch die Abnahme der Erregerausscheidung kam es auch zum Absinken des Infektionsdrucks innerhalb der Herde, was wiederum über einen längeren Zeitraum zu einer sinkenden Prävalenz im Bestand führte (Knust, Patton et al. 2013). Jedoch hat die Vakzination gegen Paratuberkulose den Nachteil, dass immunisierte Tiere aufgrund von Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterienarten, wie *M. bovis* und *M. avium* spp. *avium*, falsch positiv in Nachweisverfahren der zellulären Immunantwort, wie dem Tuberkulintest bei Anwendung der amtlichen Auswertungskriterien reagierten (Serrano, Elguezabal et al. 2017, Juste, Geijo et al. 2021). Außerdem kann es bei der Vakzination zu Granulombildung an der Impfstelle kommen, was zu einer Minderung des Schlachtpreises führen kann (Patton 2011). Des Weiteren reagierten gegen Paratuberkulose immunisierte Tiere positiv in den Untersuchungsmethoden zum Nachweis einer MAP-Infektion (Muskens, van Zijderveld et al. 2002). Nicht zuletzt durch die fehlende Zulassung in der Europäischen Union stellt die Impfung gegen Paratuberkulose aktuell keine Bekämpfungsmaßnahme dar, welche als alleinige Maßnahme angewendet werden könnte. Da die Impfung lediglich die Erregerausscheidung reduziert und den Krankheitsverlauf abmildert, bietet sie keinen vollständigen Schutz vor der Infektion und ermöglicht keine Kontrolle der Erkrankung (Juste, Geijo et al. 2021).

2.2.2 Indirekte Nachweismethoden

Die indirekten Nachweismethoden einer MAP-Infektion unterteilen sich zum einen in Methoden zum Nachweis von humoralen Antikörpern gegen MAP, was über die Komplementbindungsreaktion, den ELISA und die Agargelimmundiffusion möglich ist. Zum anderen kann die zellgebundene Immunreaktion über den Johnin-Hauttest oder den Interferon- γ -Test (IFN- γ -Test) nachgewiesen werden.

2.2.2.1 Nachweis humoraler Antikörper

Die Komplementbindungsreaktion ist das älteste serologische Testverfahren zum Nachweis von MAP-Antikörpern in bovinem Blutserum, welches auf der Aktivierung des Komplementsystems durch Antigen-Antikörper-Komplexe beruht (Cocito, Gilot et al. 1994). Im ersten Schritt des Testverfahrens wird der zu testenden Serumprobe

MAP-Antigen und eine definierte Menge an Fremdkomplement beigefügt (de Lisle, Seguin et al. 1980). Im zweiten Schritt des Tests werden Schaferythrozyten und gegen diese Schaferythrozyten bindende Antikörper hinzugefügt (de Lisle, Seguin et al. 1980). Ist der Test negativ, waren im ersten Schritt des Tests keine Antikörper gegen MAP im Serum vorhanden und es tritt folglich eine Hämolyse ein, da noch freies Komplement vorhanden ist. Bei einer positiven Reaktion bleiben die Erythrozyten erhalten, da das Komplement bereits im ersten Schritt von den Antigen-Antikörper-Komplexen aktiviert und verbraucht wurde. Das Verfahren stellt allerdings eine wenig sensitive (17,9 %) und durch Kreuzreaktion mit anderen Mykobakterien wenig spezifische Methode dar (Körmendy, Nagy et al. 1984). Es gilt daher für die Detektion MAP-positiver Rinder in der Herde als obsolet (Wilks, Taylor et al. 1981, Reichel, Kittelberger et al. 1999).

Die am häufigsten verwendete Methode zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen MAP in Serum oder Milch ist aufgrund seiner leichten und schnellen Durchführbarkeit der ELISA (Wichert, Kasbohm et al. 2022). Der ELISA stellt eine kostengünstige und vor allem schnelle Diagnosemöglichkeit dar und ermöglicht es mittels Testung von gepoolten Sammel- und Tankmilchproben einen Überblick über die Prävalenz innerhalb der Herde zu bekommen (Krieger, Eisenberg et al. 2022). In Deutschland sind derzeit vier ELISA-Tests für den Antikörpernachweis in Serum und Milch vom Rind zugelassen (FLI 2020). Um kreuzreaktive Antikörper zu eliminieren und somit die Spezifität des ELISAs zu erhöhen, werden den Serum- oder Milchproben ein *Mycobacterium phlei* enthaltender Puffer zugesetzt (Yokomizo, Kishima et al. 1991). Die Proben werden im Anschluss auf Platten gegeben, welche mit MAP-Antigen beschichtet sind. Beinhaltet die Probe spezifische Antikörper gegen MAP, können die gebundenen Antikörper mittels spezifischer enzymgekoppelter Sekundärantikörper durch eine Farbreaktion detektiert werden.

Problematisch ist der Einsatz von MAP-ELISAs zur Identifizierung MAP-positiver Tiere in der Herde bei Tieren in der subklinischen Infektionsphase, welche bis zu zehn Jahre andauern kann (Fernández, Colavecchia et al. 2019). Bei einer subklinischen MAP-Infektion wird Erreger zwar über den Kot ausgeschieden und stellt somit potentiell eine Gefahr für gesunde Tiere dar, jedoch können Antikörper mittels ELISA nicht detektiert werden, da noch keine Serokonversion stattgefunden hat (Fernández, Colavecchia et al. 2019). Die Sensitivität schwankt zwischen 7 –

22 %, was für die Beurteilung des Vorhandenseins einer MAP-Infektion wenig Sicherheit garantiert und erklärt, warum viele Bekämpfungsprogramme den Schwerpunkt auf Herdenebene legen und nicht auf das individuelle Tier (Field, Mee et al. 2022).

Es konnte zwar in einer Längsschnittstudie gezeigt werden, dass spezifische Antikörper gegen MAP bereits vor dem Ausscheiden des Erregers über den Kot mittels ELISA detektiert werden können, jedoch steigt trotzdem die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Nachweis mittels ELISA proportional zur ausgeschiedenen Erregermenge (Nielsen 2008). Außerdem wurde eine Assoziation zwischen der Laktationsphase und der humoralen Immunantwort gezeigt (McAloon, O'Grady et al. 2020). Mit typischerweise höheren Antikörperkonzentrationen zu frühen und späten Laktationsstadien, kann diese Assoziation bei der Herdentestung von synchronisierten Herden eine Rolle spielen (McAloon, O'Grady et al. 2020).

Der ELISA hat eine höhere Sensitivität bei Proben von Tieren mit höherer fäkaler Erregerausscheidung – in einer longitudinalen Studie zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen fäkaler Erregerausscheidung und serologisch nachweisbaren Antikörpern gegen MAP mittels ELISA, konnte eine Diskrepanz zwischen fäkaler Erregerausscheidung und positiver ELISA Tests festgestellt werden, denn bei nur 13 % der Tiere, welche mehrfach mittels ELISA negativ getestet wurden, konnte der negative Status immer mittels qPCR bestätigt werden (Navarro-Gonzalez, Fourichon et al. 2019). Es konnte gezeigt werden, dass mehr als zwei positive ELISA Tests mit stark erhöhter fäkaler Erregerausscheidung korrelierten (Navarro-Gonzalez, Fourichon et al. 2019).

Bei Herden, welche wiederholt mittels ELISA getestet werden, nimmt die Sensitivität im Verlauf mehrfacher Testungen ab, da die „high shedders“ von der Herde ausgeschlossen werden und sich folglich immer prozentual mehr Tiere in der Herde befinden, die wenig Erreger ausscheiden (Whitlock, Wells et al. 2000).

Eine weitere Methode zum Nachweis der humoralen Immunantwort bei einer MAP-Infektion ist der Agargelimmunodiffusionstest. Dieser wurde zur Schnelltestung von symptomatischen Tieren mit Verdacht auf eine Paratuberkulose Erkrankung entwickelt (Spangler, Bech-Nielsen et al. 1988). Dieser Test wird jedoch fast ausschließlich in der Diagnostik bei Schafen verwendet (Morales-Pablos, Mejía-Sánchez et al. 2020). Das Verfahren ist sehr spezifisch, weist aber eine geringe Sensitivität bei klinisch unauffälligen Tieren von nur 8 % auf, was den Test

in der Frühdiagnostik nicht brauchbar macht (Robbe-Austerman, Gardner et al. 2006).

2.2.2.2 Nachweis zellgebundener Immunität

Gereinigte Proteinderivate (*engl.* purified protein derivatives, PPD) werden zur Diagnose mykobakterieller Infektionen verwendet (Corneli, Corte et al. 2019). Bovines PPD (PPDB) wird aus dem *Mycobacterium tuberculosis* Komplex gewonnen, während aviäres PPD (PPDA) aus dem *Mycobacterium avium* Komplex gewonnen wird (Corneli, Corte et al. 2019). Beide wurden beim Tuberkulintest im Rahmen der Bekämpfungsprogramme der bovinen Tuberkulose eingesetzt (Abernethy, Denny et al. 2006). Die Diagnosestellung basiert auf der verzögerten Hypersensitivitätsreaktion 72 Stunden nach Injektion von PPD, gewonnen aus *Mycobacterium bovis*, was anhand der Hautdicke gemessen werden kann (Romero, Chang et al. 2022). Die Hautdicke der Injektionsstelle von PPDB wird vergleichend mit der Reaktion auf PPDA beurteilt (Romero, Chang et al. 2022).

Mittels aus MAP gewonnenem Johnin PPD (PPDJ) wurde auch ein Intrakutantest für die Frühdetektion von Paratuberkulose entwickelt (Lash and Mohler 1930). Es bestehen jedoch Zweifel hinsichtlich der Spezifität dieses Tests aufgrund kreuzreaktiver Epitope, die bei PPDJ vorhanden sind (Corneli, Corte et al. 2019). Es können Proteine in PPDJ enthalten sein, die identisch derer anderer Mykobakterien sind und so eine Kreuzreaktion hervorrufen (Corneli, Corte et al. 2019). Es wurden bereits andere rekombinante sekretorische Proteine wie MAP2168c, MAP1693c, MAP3547c, MAP4308c und MAP2677c auf ihre Eignung als Marker einer Hypersensitivitätsreaktion getestet, welche bisher jedoch aufgrund fehlender weiterführender Studien noch nicht eingesetzt werden (Corneli, Corte et al. 2019).

In Studien, welche verschiedene indirekte Nachweismethoden vergleichen, konnte der IFN- γ -Test MAP infizierte Tiere in frühen Krankheitsstadien detektieren (Corneli, Di Paolo et al. 2021). Der IFN- γ -Test wurde in Australien in den späten 1980er Jahren entwickelt und misst mittels eines ELISAs das von sensibilisierten T-Lymphozyten infizierter Tiere vermehrt produzierte Zytokin IFN- γ nach Stimulation mit mykobakteriellen PPDs *in vitro* (Wood, Corner et al. 1990, Corneli, Di Paolo et al. 2021). IFN- γ wird verwendet, da die erste Immunreaktion vieler Kühe auf MAP durch eine Th1-Antwort mediiert ist, gekennzeichnet durch die Produktion von INF-

γ und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen (Baquero and Plattner 2016, Baquero and Plattner 2017). Der Test wurde in der Anwendung als „Frühwarnsystem“ beschrieben, um beispielsweise frühzeitig junge Tiere in einer bereits Paratuberkulose-freien Herde zu detektieren (Corneli, Di Paolo et al. 2021). Diese Testmethode kann sinnvoll sein, da beobachtet wurde, dass im frühen und subklinischen Stadium der Infektion oftmals keine spezifischen Antikörper gebildet werden oder diese in nur so geringem Ausmaß vorhanden sind, dass sie mit handelsüblichen Detektionstests nicht nachgewiesen werden können (Meyer, Bond et al. 2018). Erst in progressiven Erkrankungsstadien nimmt die Zahl an zirkulierenden Antikörpern zu, die dann mittels ELISA im Serum detektiert werden können (Meyer, Bond et al. 2018). Jedoch weist der IFN- γ -Test eine relativ niedrige Spezifität (66 - 94 %) und Sensitivität (13 - 85 %) auf (Kalis, Collins et al. 2003, Corneli, Di Paolo et al. 2021). Die Interpretation der Menge an INF- γ ist ein essentiell zu berücksichtigender Punkt bei der Definition von Cut-Off Werten und daraus folgend bei der Klassifizierung des Infektionsstadiums eines Tieres (Kalis, Collins et al. 2003). Der IFN-03B3q-Test soll infizierte Tiere identifizieren, jedoch hängt die Folgehandlung davon ab, wie hoch die Prävalenz von MAP innerhalb der Herde ist (Corneli, Di Paolo et al. 2021). So sollte in einer Herde mit niedriger Prävalenz ein positiv identifiziertes Tier sofort abgesondert oder geschlachtet werden, um eine weitere Verbreitung von MAP innerhalb der Herde zu verhindern (Corneli, Di Paolo et al. 2021). Im Gegensatz dazu sollte in Herden hoher Prävalenz die Erregerausscheidung dieser Tiere häufiger getestet werden, da sie ein Risiko darstellen, den Erreger in der Herde zukünftig weiter zu verbreiten (Corneli, Di Paolo et al. 2021).

2.2.3 Direkte Nachweismethoden

2.2.3.1 Kulturelle Anzucht

Als Goldstandard im direkten Nachweisverfahren dient noch immer die bakterielle Anzucht von MAP auf geeigneten Nährböden, so wie dem mit Mykobaktin J substituierten Herrold's Egg Yolk Medium, ein auf Eidotter basierendem festem Nährmedium (Schwalm, Obiegala et al. 2018). Aufgrund der langen Generationszeit von MAP (mehr als 20 Stunden) ist die Anzucht mit etwa acht bis 20 Wochen sehr zeitaufwändig, ermöglicht aber eine sichere Detektion lebender, beziehungsweise

kultivierbarer MAP in der untersuchten Probe (Cechova, Beinhauerova et al. 2021, Dane, Koidis et al. 2022). Im Gegensatz dazu stellt die Anzucht im Flüssigmedium eine deutlich schnellere Alternative mit acht bis 12 Wochen dar (Dane, Koidis et al. 2022). Viele aktuelle Studien zur effizienteren Anzucht beim Nachweis lebender MAPs beziehen sich hauptsächlich auf die Flüssigkultur mit dem synthetischen Middlebrook 7H9 Flüssigmedium, ebenfalls substituiert mit Mykobaktin J (Dane, Koidis et al. 2022). Trotzdem hat die Anzucht auf festem Nährboden zum Vorteil, dass die Bakterienanzahl durch die typische Morphologie der Kolonien und auch vorkommende Verunreinigungen durch andere Bakterienstämme leichter bestimmt werden können (Dane, Koidis et al. 2022).

2.2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Seit der kompletten Genomsequenzierung von MAP K-10 des C-Typs konnte die PCR als Werkzeug zur Bestätigung anderer Nachweismethoden sowie als eigenes Diagnosetool genutzt werden (Li, Bannantine et al. 2005). Die IS900 Insertionssequenz (Brahma, Narang et al. 2020) ist 14 bis 17 Mal im MAP-Genom zu finden und der meistgenutzte DNA-Abschnitt für die Nutzung in der PCR (Conde, Price-Carter et al. 2021). Da jedoch bereits in anderen Mykobakterien falsch positive IS900 Signale verzeichnet werden konnten, stellt diese Insertionssequenz zwar eine sehr sensitive, aber nicht ganz spezifische DNA-Sequenz dar (Tasara, Hoelzle et al. 2005). Die F57-Sequenz, mit einer einzigen Kopie im MAP-Genom, konnte in allen aus Tieren und Menschen isolierten MAP Stämmen gefunden werden und weist eine hohe Spezifität auf (Poupart, Coene et al. 1993). Um MAP sowohl qualitativ, als auch quantitativ zu analysieren, wurden in einer kombinierten qPCR sowohl das häufiger vorkommende Element IS900, als auch das single-copy Element F57 verwendet (Slana, Kralik et al. 2008). Für die Diagnostik ist die Aussage über die Quantität wichtig, da der Infektionsstatus über sie klassifiziert werden kann (Beinhauerova, Beinhauerova et al. 2021). Tiere, welche massiv Erreger ausscheiden, werden als „super shedders“ bezeichnet und stellen eine Gefahr für die Herde dar (Pradhan, Mitchell et al. 2011). Da Tiere oft auch ohne die typische klinische Symptomatik zu zeigen stark zur Weiterverbreitung des Erregers beitragen, sollten sie schnellst möglichst aus der Herde ausgeschlossen werden (Pradhan, Mitchell et al. 2011).

Der Nachweis mittels PCR ist eine deutlich schnellere Methode als die kulturelle Anzucht, jedoch kann dabei keine Aussage über die Viabilität der Mykobakterien getroffen werden, weshalb durch diese Methode beispielsweise nicht eingeschätzt werden kann, ob die in pasteurisierter Milch enthaltenen MAPs abgetötet wurden oder nicht (Cechova, Beinhauerova et al. 2021).

In einer kombinierten „viability PCR“, bei der die Proben vor der Durchführung mit Ethidium Monoazid, Propidium Monoazid oder auch Platinium zur Darstellung der lebenden und toten Bestandteile einer Probe behandelt wurden, konnten bereits lebende von toten Bakterien differenziert werden (Cechova, Beinhauerova et al. 2021).

Für die Diagnostik im Betrieb werden entweder einzelne Kot- oder Milchproben, oder als kostengünstigere Alternative mittels Sockentupfer entnommene Sammelkotproben, mittels PCR untersucht (Gschaider, Köchler et al. 2021). So können auch Bestände mit relativ niedriger Durchseuchungsrate identifiziert werden (Gschaider, Köchler et al. 2021).

2.2.4 Immunreaktion und Pathogenese

Um die Lösung für ein erfolgreiches Bekämpfungsprogramm in Mensch und Tier gegen MAP zu finden, ist es essentiell, die Entstehung und Entwicklung der durch den Erreger ausgelösten Krankheit zu verstehen (Ssekitoleko, Ojok et al. 2021). MAP wird hauptsächlich über Fäzes, Kolostrum oder Milch bereits bei Kälbern oral übertragen, eine intrauterine oder aerogene Übertragung ist jedoch ebenfalls möglich (Deutz, Spergser et al. 2005, Field, McAloon et al. 2022). Der Infektionsweg kann über kontaminierte Zitzen, Liegeboxen, Weiden, Böden und Wasser erfolgen (Pritchard, Coffey et al. 2017). Die Krankheit hat eine sehr lange Inkubationszeit, demnach sind die Tiere, welche später im Alter zwischen drei und sechs Jahren klinisch erkranken, bereits im Kälberalter infiziert worden (Vass-Bognár, Bakony et al. 2022). Die Risikofaktoren für eine MAP-Transmission ergeben sich hauptsächlich durch die Einbringung neuer Tiere in die Herde, das Füttern von Kälbern mit gepoolten Milchproben und unzureichender Geburtshygiene (Stabel 2008, Vilar, Santos et al. 2015).

Abweichend von anderen pathogenen Bakterien, fehlen Mykobakterien klassische Virulenzfaktoren, wie beispielsweise Toxine, da sie andere Virulenzmechanismen nutzen um im Zellinneren der Makrophagen zu überleben (Ssekitoleko, Ojok et al.

2021). Nach oraler Aufnahme werden die Mykobakterien über die speziellen Epithelzellen der Ileummukosa, den M-Zellen (*engl.* microfold cells) der Peyer'schen Platten, in die Submukosa aufgenommen, wo sie von Makrophagen phagozytiert werden (Momotani, Whipple et al. 1988, Ibeagha-Awemu, Bissonnette et al. 2021). Interessanterweise konnte in B-Zell-Knockout-Mäusen, die keine Peyer'schen Platten besitzen, gezeigt werden, dass MAP auch ohne die Anwesenheit der M-Zellen die intestinale Mukosa des Darms mittels Enterozyten überwinden kann (Bermudez, Petrofsky et al. 2010). Auch die Tight-Junctions werden durch MAP geschwächt, was die Integrität der Darmschranke beeinflusst und somit dem Erreger ermöglicht, parazellulär eindringen zu können (Bannantine and Bermudez 2013). *In vitro* Stimulationsexperimente von transfizierten Zelllinien, murinen Makrophagen und humanen PBMC konnten zeigen, dass Pattern Recognition Receptors (PRR), wie TLR2, welche sich auf der Oberfläche von Makrophagen befinden, unter anderem an der Erkennung von MAP durch das angeborene Immunsystem beteiligt sind (Ferwerda, Kullberg et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass nach der Aufnahme von MAP in die Enterozyten der Erreger eine Ca^{2+} abhängige Ansäuerung des Endosoms und eine Ausschüttung von IL-1 β bewirkt (Lamont, O'Grady et al. 2012). Dadurch werden die Makrophagen zur Infektionsstelle gelockt (Lamont, O'Grady et al. 2012). Der genaue Mechanismus, wie MAP durch die Makrophagen phagozytiert wird und wie die Proliferation und Persistenz von MAP innerhalb der Makrophagen vonstattengeht, ist bis heute nicht gänzlich erforscht. Innerhalb der Makrophagen entkommt der Erreger in einer sogenannten immunologischen Nische der Immunantwort des Wirtes, indem MAP die Phagolysosomenreifung unterbindet, und löst eine latente Infektion des Ileums aus (Field, McAloon et al. 2022). Eine der Überlebensstrategien der MAPs ist die Deaktivierung von reaktiven Sauerstoffzwischenprodukten (*engl.* reactive oxygen intermediates, ROI), welche in den Makrophagen einen antimikrobiellen Effekt haben (Werling, Hope et al. 2004). Des Weiteren konnte in mit *M. tuberculosis* infizierten Makrophagen eine verminderte Produktion von induzierbarer Stickstoffoxidsynthase (*engl.* inducible nitric oxide synthase, iNOS) beobachtet werden, was eine Maßnahme zur Verminderung der Stickstoffmonoxidproduktion sein könnte um dessen antimykobakteriellen Einfluss aufzuheben (Miller, Fratti et al. 2004). Stickstoffmonoxid (*engl.* nitric oxide, NO) wird physiologisch in Makrophagen, beispielsweise nach der Stimulation mit den pro-inflammatorischen

Zytokinen INF- γ und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) produziert und hat einen antimykobakteriellen Effekt (MacMicking, Xie et al. 1997). Die Intensität der IFN- γ -Immunantwort scheint einen Einfluss auf den weiteren Verlauf der Krankheit zu haben (Begg, Plain et al. 2018). In einem Infektionsversuch von Kälbern konnte gezeigt werden, dass Kälber mit niedrigerer IFN- γ -Ausschüttung stärkere histopathologische Veränderungen am Darm aufwiesen, wohingegen eine höhere IFN- γ -Ausschüttung sogar eine Elimination des Erregers bewirken konnte (Begg, Plain et al. 2018).

Im weiteren Verlauf dieses tuberkuloiden Krankheitsstadiums, welches durch eine zellmedierte pro-inflammatorische Th1-Immunantwort und Zytokine, wie IFN- γ , Interleukin 2 (IL-2), IL-12 und TNF α gekennzeichnet ist, wandern die infizierten Makrophagen zu den regionalen Lymphknoten und verteilen die Erreger in der Lymphe (Ibeagha-Awemu, Bissonnette et al. 2021). Die diffuse Granulombildung in diesem Stadium entsteht durch vermehrte Rekrutierung von Makrophagen gepaart mit deren verringerter Apoptose, was das Abkapseln und Überleben der Mykobakterien in den Makrophagen erleichtert (Coussens 2004). So kann MAP innerhalb der Granuloma in eine Art Ruhezustand übergehen und erreicht somit eine persistente Infektion des Wirtes, wobei die Hintergründe der Reaktivierung und dem Übergang in eine aktive Infektion bis heute nicht geklärt sind (Park, Park et al. 2020). Während dieser tuberkuloiden Phase zirkulieren keine oder kaum spezifische Antikörper gegen MAP im Blut (Field, McAloon et al. 2022). In diesem subklinischen Stadium, das für viele Jahre bestehen kann, zeigt das Tier keine klinischen Symptome (Field, McAloon et al. 2022). Der Wechsel zu einer eher Th2-dominierten Immunantwort kennzeichnet das leproide Stadium der Krankheit (Stabel and Bannantine 2019). Jedoch gibt es Überschneidungen in der Th1/Th2-Immunantwort, denn die Übergänge zwischen den verschiedenen Krankheitsstadien sind fließend und die „alles oder nichts“-Trennung sollte eher als Tendenz betrachtet werden (Stabel and Bannantine 2019). Die Zusammenhänge, die den Übergang zwischen dem tuberkuloiden und dem leproiden Stadium vermitteln, sind bisher ungeklärt und bedürfen weiterführender Forschung. Humorale Immunantworten, mediiert über Th2, sowie anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 treten auf, wenn die Krankheit bereits fortgeschrittener ist (Ganusov, Klinkenberg et al. 2015). Diese im Infektionsgeschehen später auftretende humorale Immunantwort, welche nicht

protektiv ist, ist gekennzeichnet durch den Befall der Makrophagen mit MAP, derer Unfähigkeit MAP zu eliminieren und der Produktion von Immunglobulin G1 (Coussens, Verman et al. 2004).

2.2.5 Krankheitsverlauf der Paratuberkulose

Die Paratuberkulose wird als heimtückische Krankheit bezeichnet, da mit MAP infizierte Tiere nicht immer Erreger ausscheiden und somit schwer mittels diagnostischer Tests zu erfassen sind (Salem, Heydel et al. 2013). Der Zeitpunkt der Infektion betrifft meistens das Kälberalter, in dem die Tiere am empfänglichsten für eine Infektion mit MAP sind (Mitchell, Medley et al. 2012). Die Infektionsquelle stellen infizierte ältere Kühe dar, von denen der Erreger fäkal-oral auf das Kalb übertragen wird (Field, McAloon et al. 2022). Auch wenn einige Kälber es schaffen, die Infektion abzuwehren, bleibt die Mehrheit der mit MAP in Kontakt gekommenen Kälber lebenslang chronisch infiziert (Begg, Plain et al. 2018). Der Krankheitsverlauf wird in eine frühe Phase ohne Erregerausscheidung, eine asymptomatische subklinische Phase, eine klinische Phase und eine progressive klinische Phase mit Erregerausscheidung unterteilt (Whitlock and Buergelt 1996). Hieraus ergibt sich auch die heimtückische Eigenschaft der Krankheit, da im frühen Stadium der Krankheit weder der Erreger zuverlässig detektiert werden (ein Nachweis ist oftmals nur histologisch möglich), noch eine Infektion ausgeschlossen werden kann (Fernández, Colavecchia et al. 2019). Hinzu kommt, dass ein positives Testergebnis im frühen Krankheitsstadium nicht bedeutet, dass dieses Tier einmal klinische Symptome entwickeln wird, da die meisten Tiere zeitlebens subklinisch infiziert bleiben, ohne jemals sichtbare klinische Symptome zu entwickeln (Stabel 1998, Park and Yoo 2021). So ist die oft zeitlich über Jahre ausgedehnte frühe Phase der Paratuberkulose, in der ein Großteil der Rinder einer Herde während ihres produktiven Lebens verbleiben werden, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirt augenscheinlich die Infektion unter Kontrolle hat, indem die Replikation der Erreger innerhalb der Makrophagen zurückgehalten wird (Arsenault, Maattanen et al. 2014). Tiere, die sich im subklinischen Stadium der Infektion befinden, zeigen ebenso keine klinischen Symptome, scheiden aber, zumindest intermittierend, Erreger aus und haben unter Umständen spezifische Antikörper oder eine zelluläre Immunantwort (Whitlock and Buergelt 1996). Obwohl die fäkale Ausscheidung von MAP meistens durch adulte Tiere erfolgt, konnte bei jüngeren Tieren bereits eine

Erregerausscheidung festgestellt werden (Weber, Kogut et al. 2010). Durch subklinisch infizierte Tiere entstehen wirtschaftliche Verluste aufgrund verminderter Milchleistung, schlechterer Fruchtbarkeit, verzögertem Wachstum und allgemein schlechterer Gesundheitszustände (Nielsen, Krogh et al. 2009). Diese Tiere sind die größte Gefahr für den Bestand, da sie oftmals bereits Erreger über Kot und Milch ausscheiden und dadurch gesunde Tiere infizieren, jedoch eine Infektion über die diagnostischen Tests nicht detektierbar ist (Whittington, Donat et al. 2019). Die klinische Phase der Erkrankung, die sogenannte „Spitze des Eisbergs“ aller Infektionen, kann nach zwei bis zehn Jahren nach Infektion eintreten und ist durch sukzessiven Gewichtsverlust und beginnenden, anfangs auch intermittierenden, wässrigen Durchfall gekennzeichnet (Whitlock and Buergelt 1996). Tiere verbleiben meist nicht länger als einige Monate in diesem Stadium bevor das progressiv klinische Stadium der Paratuberkulose eintritt (Whitlock and Buergelt 1996). Diese progressive Form ist gekennzeichnet durch behandlungsresistenten chronischen Durchfall bei erwachsenen Kühen, Milchleistungs- und Gewichtsverlust bis hin zu lebensbedrohlicher Abmagerung, Lethargie und Schwäche (Whitlock and Buergelt 1996). Diese Tiere sind oftmals so abgemagert, dass sie entweder sterben oder zuvor zum Schlachten gebracht werden, wo sie aufgrund genannter Symptome in vielen Fällen die Bestimmungen zur Genusstauglichkeit nicht erfüllen (Whitlock and Buergelt 1996).

2.2.6 Deviante Immunphänotypen

In Zusammenhang mit dem PregSure BVD Impfstoff kam es bei 5 - 10 % aller geimpfter Kühe aufgrund einer Proteinverunreinigung im Impfstoff zu einer pathogenen Produktion von Alloantikörpern, welche durch die Fütterung von Kolostrum betroffener Kühe auf Kälber übertragen wurde und bei diesen die bovine neonatale Panzytopenie (BNP) auslöste (Bridger, Bauerfeind et al. 2011). BNP stellt ein Krankheitsbild mit einer Letalität von über 90 % dar, bei der die Aufnahme pathogener Antikörper über das Kolostrum von BNP-Kühen eine Knochenmarksdepletion bis hin zu einer Knochenmarksaplasie sowie eine intravasale Zerstörung der Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten auslöste (Bridger, Bauerfeind et al. 2011, Friedrich, Büttner et al. 2011, Lutterberg, Kleinwort et al. 2018). *In vitro*-Stimulationsassays mit dem T-Zell Stimulanz Concanavalin A zeigten ein signifikant erhöhtes Proliferationsverhalten

von PBMC aus BNP-Kühen im Vergleich zu geimpften Kontrolltieren, die auch nach Analyse des Proteoms signifikante Unterschiede aufwiesen (Lutterberg, Kleinwort et al. 2018). Dieser hyperproliferative Immunphänotyp konnte auch in gesunden, nicht mit PregSure BVD geimpften Kühen einer Herde festgestellt werden (Lutterberg, Kleinwort et al. 2018). Kühe dieses Phänotyps wurden demzufolge als immundeviant bezeichnet (Lutterberg, Kleinwort et al. 2018).

Interessanterweise konnte danach gezeigt werden, dass Kühe mit differentiellen Immunphänotypen, eine jeweils andere Immunreaktion auf MAP *in vitro* zeigten (Kleinwort, Hauck et al. 2019). PBMC von Kühen mit einem immundevianten Phänotyp reagierten unter anderem mit einer vermehrten Expression von CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 1 (CNOT1), was in Studien mit humanen Zelllinien mit einer Herunterregulation von Proteinen des MHC Klasse II Komplexes assoziiert war (Rodríguez-Gil, Ritter et al. 2017) und deshalb bei diesen Rindern auf eine weniger protektive Immunantwort gegen MAP hinweisen könnte (Kleinwort, Hauck et al. 2019). Im Gegensatz dazu konnte bei nicht immundevianten Tieren eine IL-12 vermittelte Immunantwort als Reaktion auf MAP *in vitro* nachgewiesen werden (Kleinwort, Hauck et al. 2019). Dadurch konnte bereits gezeigt werden, dass MAP *in vitro*, je nach Immunkapazität des Wirtes, eine andere Immunantwort auslösen kann.

2.3 Differentielle Proteomanalyse

Der Terminus Proteom wurde 1996 erstmalig von Marc R. Wilkins analog zu den Begriffen Genom und Transkriptom verwendet (Wilkins, Pasquali et al. 1996). Das Proteom beschreibt die Gesamtheit aller vom Genom kodierten Proteine, wobei das Proteom im Gegensatz zum Genom hochdynamisch ist und eine Momentaufnahme zu definierten Bedingungen eines bestimmten Zeitpunktes darstellt (Buhimschi and Buhimschi 2012). Proteine können veränderte Phänotypen bei Krankheiten repräsentieren und zeigen, wie genetische und nicht-genetische Risikofaktoren die Entstehung klinischer Unterschiede beeinflussen (Suhre, McCarthy et al. 2021). Die Erforschung des Proteoms, die Proteomik, beinhaltet die technologischen Mittel zur Identifizierung und Quantifizierung der Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Gewebes, Körperflüssigkeiten, oder eines Organismus (beispielsweise mittels der Massenspektrometrie) und bietet Einblicke in die durch komplexe Vorgänge beeinflusste Biologie des Lebewesens (Rozanova, Barkovits et al. 2021, Suhre,

McCarthy et al. 2021). Die Proteomik ergänzt die anderen Technologien, wie Genomik und Transkriptomik darin, dass hiermit die gesamtumfassenden Proteine eines Organismus und deren Struktur und Funktionen aufgeklärt werden können (Aslam, Basit et al. 2017). Die Massenspektrometrie mit LC-MS/MS (liquid-chromatography-massspectrometry/massspectrometry) und MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption time-of-flight/time-of-flight) als weit verbreitete Analyseinstrumente, bilden die Basis der heutigen Proteomanalyse (López-Pedrouso, Lorenzo et al. 2020, Łuczaj, Gęgotek et al. 2021).

2.3.1 LC MS/MS

LC-MS/MS beschreibt ein sehr modernes Analyse- und Detektionsverfahren, welches auf der Ermittlung der Abundanz der aus Messung von Massenspektren einzelner Peptide ermittelten Proteine beruht, die anschließend in einer Software normalisiert werden (Kulyyassov, Fresnais et al. 2021).

MS/MS, oder auch Tandem-MS, ist eine Nacheinanderschaltung von mehreren Massenspektrometer-Einheiten, die sich an die Flüssigchromatographie (LC), ein vorangeschaltetes chromatographisches Trennsystem, anschließen (Fazli, Panigrahy et al. 2022). Diese Kombination von Einheiten hat zum Vorteil, dass Proteine exakt und schnell identifiziert und quantifiziert werden können (Fazli, Panigrahy et al. 2022).

Im Gegensatz zu quantitativen Proteomanalysen, wie SILAC (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture), ICPL (Isotope-coded protein label) oder iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation), ist es bei der label-freien Massenspektrometrie (label-free LC MS/MS) ohne fehleranfälliges vorheriges Labeln *in vitro* möglich die Peptide der Probe zu analysieren und zu quantifizieren (Galindo-Luján, Pont et al. 2021). Die Hochdruckflüssigchromatografie trennt die Analyten in einem Substanzgemisch nach der Verdauung zu Beginn auf (Monfort, Jutras et al. 2021). In der Säule werden die Moleküle entsprechend ihrer unterschiedlichen molekularen Eigenschaften aufgetrennt, indem sie die Säule unterschiedlich schnell passieren und das Ende getrennt voneinander erreichen (Harrieder, Kretschmer et al. 2022).

Anschließend bestimmt die Massenspektrometrie, die direkt mit der Hochdruckflüssigchromatographie gekoppelt ist, um welche Moleküle es sich handelt oder quantifiziert sie in einer insgesamt sehr kurzen Zeit anhand derer

Masse (Wooller, Anagnostopoulou et al. 2022). Voraussetzung dafür ist, dass die Moleküle elektrisch geladen sind, weshalb die Moleküle zuerst zu Ionen transformiert werden (Tang, Swezey et al. 2022). In einem elektrisch geladenen Feld werden die Ionen beschleunigt und fliegen an vier parallel angeordneten Stabelektroden entlang, dem Quadrupol (Bekker-Jensen, Martínez-Val et al. 2020). Die Teilchen einer definierten Masse erreichen am Ende des Feldes den Detektor (Bekker-Jensen, Martínez-Val et al. 2020). Aufgrund der Tatsache, dass die Moleküle im Massenspektrometer zu Fragmenten zerfallen, entsteht ein Spektrum mit mehreren Peaks und entsprechenden Werten bezüglich des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z values) (Colangelo, Chung et al. 2013). In einer zweiten Messung werden manuell ausgewählte sogenannte Vorläuferionen (*engl.* precursor ions) durch Kollision in Peptidfragmentionen aufgetrennt und erneut gemessen (Zhang 2012). So können hunderte von MS/MS Datenspektren in einem Durchlauf gemessen werden und Peptide können mittels ihrer m/z Werte in einer Datenanalysesoftware, identifiziert und analysiert werden (Kösters, Leufken et al. 2021). Nach der Normalisierung und statistischer Analyse können die Proteine im Anschluss über ihre Massenspektren mittels Proteinsequenzdatenbanken identifiziert werden (Degroote, Weigand et al. 2019). Um die Quantität eines Proteins zu bestimmen, werden diese identifizierten Proteine erneut in die Datenanalysesoftware eingespeist und die kumulative Abundanz mittels Zusammenfassung aller Abundanzen der Peptide dieses Proteins errechnet (Ruzafa, Pereiro et al. 2018).

3 PUBLIKATION

Titel

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* Infected Cows Reveal Divergent Immune Response in Bovine Peripheral Blood Derived Lymphocyte Proteome

Autoren

Lucia Korbonits, Kristina J. H. Kleinwort, Barbara Amann, Andrea Didier, Erwin Märtlbauer, Stefanie M. Hauck, Cornelia A. Deeg

Journal

MDPI Metabolites

Status

Published.
Metabolites. 2022 Sept 29, 12(10), 924
<https://doi.org/10.3390/metabo12100924>

Article

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* Infected Cows Reveal Divergent Immune Response in Bovine Peripheral Blood Derived Lymphocyte Proteome

Lucia Korbonits ¹, Kristina J. H. Kleinwort ¹, Barbara Amann ¹, Andrea Didier ², Erwin Märtlbauer ², Stefanie M. Hauck ³ and Cornelia A. Deeg ^{1,*}

¹ Chair of Physiology, Faculty of Veterinary Sciences, LMU Munich, D-82152 Martinsried, Germany

² Chair of Dairy Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Sciences, LMU Munich, D-85764 Oberschleißheim, Germany

³ Metabolomics and Proteomics Core, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, D-80939 Munich, Germany

* Correspondence: cornelia.deeg@lmu.de

Citation: Korbonits, L.; Kleinwort, K.J.H.; Amann, B.; Didier, A.; Märtlbauer, E.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infected Cows Reveal Divergent Immune Response in Bovine Peripheral Blood Derived Lymphocyte Proteome. *Metabolites* **2022**, *12*, 924. <https://doi.org/10.3390/metabo12100924>

Academic Editors: Chi Chen

Received: 12 August 2022

Accepted: 28 September 2022

Published: 29 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Bovine paratuberculosis is a serious chronic disease of the gastrointestinal tract that causes economic losses and dramatically affects animal health in livestock. The underlying infectious agent, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), cannot reliably be detected by standard diagnostic tests due to the long asymptomatic disease stage. The aim of this study was to detect proteomic changes in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from cows of the same herd with different MAP infection status after co-incubation with viable MAP in vitro using label-free LC-MS/MS. In our proteomic discovery experiment, we detected 2631 differentially regulated proteins between cows with negative MAP infection status (so-called MAP-resistant cows) and cows with positive MAP infection status (so-called persistently MAP-infected cows). In MAP-resistant cows, we detected enriched immune-related signaling pathways for TLR2 and MHC class II component proteins, among others, indicating a successful defensive immune response of the cows to MAP. In contrast, persistently MAP-infected cows were not directly enriched in immune-related signaling pathways associated with ITGA2B and KCNMA1, among others. The introduction of these distinct immune responses contributes to a better understanding of the bovine immune response and mechanisms of susceptibility to MAP.

Keywords: paratuberculosis; mycobacteria; host-pathogen response; immune system; quantitative label-free liquid chromatography tandem mass spectrometry; bovine

1. Introduction

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP) is the clinically and economically important agent of bovine paratuberculosis [1]. Commonly known as Johne's disease, it is a debilitating chronic disease of the gastrointestinal tract that occurs worldwide in domestic and wild ruminants [2,3]. Because of its high tenacity, MAP is able to survive for about a year in soil and fresh water, which poses a risk because a single infected animal can threaten the health of the entire herd [4].

Fecal-oral transmission of MAP occurs primarily through ingestion of MAP-contaminated feces, colostrum, or milk from infected animals. Infection usually occurs in the first few months of life when older animals excrete the bacterium in their feces but remains subclinical until adulthood [5,6]. In clinically infected cattle it causes weight loss, diarrhea, and reduced milk yields, and therefore causes major economic losses for the farmer [3,7]. After infection, ruminants usually go through a long, asymptomatic subclinical phase during which MAP cannot reliably be detected by standard diagnostic

tests [8,9]. These infected but unrecognized animals are the major spreaders of the disease in livestock and remain difficult to identify because available diagnostic tests are not sensitive enough to detect them [10].

The use of commercial inactivated vaccines against Johne's disease in cattle is still limited in most countries and has not eradicated the disease where it is widespread [11]. In addition, vaccination interferes with tests to detect *Mycobacterium bovis* [12]. Therefore, current management strategies to control Johne's disease aim to limit calf exposure to MAP by avoiding contact with both, adult cattle and their feces and by using aggressive testing and eradication practices [13,14]. However, forced culling strategies have generally failed to reduce MAP prevalence in livestock [13]. Voluntary sanitation and management practices have been used to reduce and prevent MAP transmission to susceptible cows [10]. However, MAP eradication programs based solely on hygiene management are not very promising [15]. In addition, MAP prevalence at the herd level did not decrease with farm participation in a Johne's disease control program that included measurement of herd MAP infection status, risk assessment, and an individualized management plan [16]. We have previously shown that there are at least two different immune phenotypes in cattle in Germany [17]. Therefore, the aim of our study was to investigate whether the difference between MAP-resistant and persistently MAP-infected cows is due to differences in the anti-MAP immune response. Understanding differences in bovine immune responses to MAP could improve selection for natural resistance to MAP through breeding and complement existing MAP eradication programs. On farms where natural MAP infections are detected, there are always differences in the susceptibility of some cattle to the infection. In a previous study, we showed that co-incubation of MAP and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from cows from a MAP-free farm with different immunophenotypes responded to co-incubation with MAP with increased abundance of proteins that can promote MAP infection and persistence [18], while a classical IL-12-driven immune response was observed in control cows [8]. On farms with established MAP occurrence, some cows were more susceptible to MAP infection than others [10]. To gain deeper insights into this differential immune response of cows to MAP, our study tested PBMCs from cows with different natural MAP infection status—from animals in the infected herd that were confirmed MAP-negative (MAP-resistant cows) and from cows with confirmed positive MAP status (persistently MAP-infected cows).

Because we were interested in an in-depth characterization of possible different immune responses, we used differential proteomic analysis to investigate the changes in the proteome between these two groups. The aim of this study was to investigate whether these cattle respond functionally differently to a 48-h infection with MAP *in vitro* and to characterize the different immune responses accordingly in more detail to obtain information on the role of the host immune response in combating MAP.

2. Materials and Methods

2.1. Selection of Animals and Detection of MAP Infection Status

In this study, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 14 cows were analyzed. To select animals for our study, we previously performed a very detailed characterization of the infection status of 31 animals on the dairy farm of interest. For generating the group "MAP-resistant cows", we only included animals showing no positive results after bacterial cultivation of fecal and milk samples on commercial Herrold's Egg Yolk Agars (HEYM agar, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) for 12 weeks, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with serum and milk samples (ID Screen Paratuberculosis Indirect, IDVet, Grabels, France; cattletype MAP Ab, Qiagen, Hilden, Germany), PCR with milk and fecal samples and Ziehl-Neelsen stainings from fecal samples. Assignment to the group "persistently MAP-infected cows" was done when animals showed positive results in the measuring methods mentioned above. After

bacterial cultivation and ELISA, 17 animals could not be clearly assigned due to heterogeneous test results and were not considered for the analyses. Cows were at least 48 months and at the most six years of age at the time of initial sampling. Specifically, for mass spectrometry analysis of bovine PBMC samples, cells from four MAP-resistant (first four cows from negative group in supplementary Table S5) and five persistently MAP-infected cows (first five cows from positive group in supplementary Table S5) were examined. These animals all came from the same dairy farm with identical environmental conditions. To verify differential TLR2 and MHC class II expression by flow cytometry and CD41 and KCNMA1 expression by immunocytochemistry, PBMC from two MAP-resistant (last two cows from negative group in supplementary Table S5) and from two persistently MAP-infected cows (last two cows from positive group in supplementary Table S5) from another dairy farm were examined. These four animals all came from the same dairy farm with identical environmental conditions. The MAP status of these cows was determined by bacterial culturing of fecal samples on HEYM agar for 12 weeks and ELISA with serum samples. The collection of bovine venous whole blood and the experimental protocols were approved by the Government of Upper Bavaria, Munich (approval no. ROB-55.2-2532.Vet_03-17-106). No experimental animals were used in this study. Permission was obtained from dairy farms to use blood samples from their animals for study purposes.

2.2. Preparation of PBMC and Co-Incubation of PBMC with Viable MAP *In Vitro*

Venous bovine whole blood was collected in tubes coated with sodium heparin (25,000 I.U.). Blood was diluted 1:2 in PBS (NaCl 136.9 mM, Na₂HPO₄ × 2H₂O 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, and KCl 2.6 mM; pH 7.2) and isolation of PBMC was performed by density gradient centrifugation (room temperature, 500 × g, 25 min, decelerate) using Pancoll separating solution (PanBiotect, Aidenbach, Germany). PBMC were recovered from the intermediate phase, washed twice in PBS, and used for *in vitro* co-incubation with viable MAP immediately. After resuspension in RPMI 1640 (PanBiotect) with 1% penicillin-streptomycin (PanBiotect), bovine PBMC (5 × 10⁶ cells) were co-incubated with viable MAP of strain DSM 11023 at a multiplicity of infection (MOI) of 4:1 at 37 °C and 5% CO₂. MAP were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany) and grown in Middlebrook 7H9 broth (VWR, Ismaning, Germany) supplemented with Middlebrook enrichment ADC medium (VWR, Ismaning, Germany), Mycobactin J (IDVet, Grabels, France), 0.002% glycerol, and 0.03% Tween 80. After 48 h, cells were washed twice with PBS and the supernatant was discarded before proteomic analysis. For flow cytometry and immunocytological analyses, after 48 h of incubation with viable MAP (strain DSM 11023, MOI of 4:1) *in vitro*, cells were washed twice with PBS, supernatants were discarded, and PBMC were processed immediately.

2.3. Sample Digestion for Differential Proteome Analysis

From each PBMC sample, 6 × 10⁵ cells were digested using a modified FASP protocol, as described [19]. Samples were separately lysed directly in 200 µL urea buffer (UA buffer, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) with the addition of 1 µL 1 M dithiothreitol (DTT), then shaken for 30 min at room temperature and diluted 1:2 with UA buffer. After addition of 10 µL of 300 mM iodoacetamide, samples were shaken for 30 min at room temperature in the dark. 2 µL of 1 M DTT was added to quench unreacted 2-iodoacetamide. 30 kDa cut-off centrifuge filters (Sartorius, Göttingen, Germany) were equilibrated with 100 µL UA buffer and centrifuged at 15,000 × g for 10 min. Samples were subsequently transferred to the filters by centrifugation at 15,000 × g and washed three times with 200 µL UA buffer at 15,500 × g and three times with 100 µL 50 mM ammonium bicarbonate buffer (ABC buffer, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). After washing, proteins were subjected to proteolysis for 2 h at room temperature by adding 0.5 µg lysyl endopeptidase in 40 µL ABC buffer to the filter, followed by the addition of 1 µg trypsin and 10 µL ABC buffer and incubation at 37 °C overnight. Peptides were collected by

centrifugation over the filter, and 20 μ L of ABC buffer containing 5% acetonitrile was added to the filter. After a second centrifugation at 15,900 \times g for 20 min at room temperature, the eluates were combined and acidified with trifluoroacetic acid to give a pH of 2.

2.4. Mass Spectrometric Analysis and Protein Identification

Peptide analysis of each PBMC sample was performed as previously described [17]. No technical replicates were used. Acidified eluted peptides were analyzed in data-dependent mode on a Q Exactive HF mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) coupled on-line to an Ultimate 3000 RSLC nano-HPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Samples were automatically injected and loaded onto the Nanotrap column, eluted after 5 min, and separated from 2 to 40 percent ACN on the analytical column (75 μ m inner diameter \times 25 cm, Acclaim PepMap100 C18, 3 μ m, 100 \AA) by a 265-min gradient flow at a flow rate of 300 nL/minute. By using LTQ OrbitrapXL, peptides were analyzed with acquired MS spectra resolution at 60,000 in profile mode. The ten most intense peptide ions were chosen for fragment analysis in the linear ion trap if they were at least doubly charged and surpassed an intensity of at least 200 counts after the high-resolution prescan. The normalized collision energy for CID was set to a value of 35, and the resulting fragments were detected at normal resolution in the linear ion trap in centroid mode and dynamic exclusion was set to 60 s.

The raw spectra were imported into Progenesis QI (version 2.5, Waters, Milford, MA, USA) software. The spectra were exported as Mascot Generic files and further processed with Mascot [20] (version 2.5.1, Matrix Science, Boston, MA, USA) with the search parameters in the Ensembl bovine database (version 93, number of coding genes: 21,880) as follows: 10 ppm peptide mass tolerance and 20 mmu fragment mass tolerance, one missed cleavage was allowed, carbamidomethylation was set as a fixed modification, methionine oxidation and asparagine or glutamine deamidation were allowed as variable modifications. Assignments of spectra to sequences is based on software algorithms and undergoes a quality cut-off. A Mascot-integrated Decoy database search resulted in an average false discovery of <1% when the search was performed with a Mascot percolator score cut-off of 13 and an appropriate significance threshold p .

Peptide assignments were imported into Progenesis QI software, and the abundances of all individual peptides assigned to each protein were summed up. The resulting normalized abundances of each protein were used to calculate fold-changes of protein ratios between conditions. Statistical analysis was performed on the log₂-transformed normalized abundance values using Student's t test. At $p < 0.05$, changes in protein expression between conditions were considered significant.

2.5. Data Processing

For statistical analysis, transformed normalized frequencies were used to calculate Student's t test. Proteins were considered significant if $p \leq 0.05$ and were used for further analysis. No cutoff value was set for the ratio of persistently MAP-infected to MAP-resistant cows for proteins. Pathway enrichment analyses were performed using the open-source software ShinyGO (version 0.76, <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>, accessed 8 July 2022) with the following settings: Search Species Cow, p -value cutoff (FDR) ≤ 0.05 . The p -value for enrichment analysis was calculated using hypergeometric distribution followed by FDR correction.

2.6. Flow Cytometric Analysis of PBMC

PBMC from four cows, two MAP-resistant and two persistently MAP-infected cows, were stained in 96-well round-bottom plates with 2×10^5 cells per well. All antibodies were incubated at 4 $^{\circ}$ C for 20 min. The bivalent CD282:FITC antibody (clone AbD12542, Bio-Rad AbD Serotec, Puchheim, Germany, 1:25) or the monoclonal mouse anti-horse

MHC class II IgG1 antibody cross-reactive with bovine MHC class II (mAb clone CVS20, Bio-Rad AbD Serotec, Puchheim, Germany, 1:100) was incubated with the cells. After washing with PBS, the secondary antibody F(ab')₂ fragment goat against mouse IgG Alexa 488 (Dianova, Hamburg, Germany, 1:400) was added to the MHC class II-stained cells. Positive controls were mouse IgG1 antibodies against human CD79a cross-reactive with bovine CD79a (mAb clone HM57, Bio-Rad AbD Serotec, Puchheim, Germany, 1:100), against bovine CD4 (mAb clone CC30, Bio-Rad AbD Serotec, Puchheim, Germany, 1:200), against bovine CD3 (mAb clone MM1A, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany, 1:100), IgG2a antibodies against human MHC class I, cross-reactive with bovine MHC class I (mAb clone W6/32, Bio-Rad AbD Serotec, Puchheim, Germany, neat) and against bovine CD8 (mAb clone CC63, Bio-Rad AbD Serotec, Puchheim, Germany, 1:100) and mouse IgG2b antibodies against bovine TCR1 (mAb clone GB21A, $\gamma\delta$ T cells, Biomol, Hamburg, Germany, 1:100) were used. After washing with PBS, the secondary antibody F(ab')₂ fragment goat against mouse IgG Alexa 488 (Dianova, Hamburg, Germany, 1:400) was added to the stained cells. Cell viability was determined by staining with Viability 400/452 Fixable Dye (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Only viable cells were included in further analyses. Measurements were performed using a NovoCyte Quanteon flow cytometer (Agilent, Waldbronn, Germany) and results were analyzed using Flowlogic Software V7 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

2.7. Immunocytology and Quantification of Signal Intensities

PBMC from four cows, two MAP-resistant and two persistently MAP-infected cows, were stained in 96-well round bottom plates with 2×10^5 cells per well. All antibodies were incubated at 4 °C for 20 min. Mouse anti-bovine CD41 (mAb clone CAPP2A, IgG2b, Biomol, Hamburg, Germany, 1:200) or rabbit anti-human KCNMA1 antibody cross-reacting with bovine KCNMA1 (polyclonal, Bio-Rad AbD Serotec, Puchheim, Germany, 1:100) were incubated with the cells. After washing with PBS, an F(ab')₂ fragment of a goat anti-mouse IgG Alexa 488 secondary antibody (Dianova, Hamburg, Germany, 1:400) or a highly cross-absorbing goat anti-rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 488 secondary antibody (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany, 1:400) was added. Cells were fixed with 1% paraformaldehyde [21] and nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The fixed cells were transferred to slides, and sections were mounted on glass coverslips with non-fluorescent mounting medium (SERVA, Heidelberg, Germany). Fluorescence images were acquired with a Leica DMI8 microscope, and LASX software, version 3.4.2 (both Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) was used for image processing. Mean gray factor was measured in representative areas for quantification, and results were compared between MAP-resistant and persistently MAP-infected cows. The Mann–Whitney U test was used to analyze differences in staining intensity because the Kolmogorov–Smirnov test did not reveal a normal distribution of the data using the mean gray factor. The Gaussian distribution was determined using the Kolmogorov–Smirnov test. Results were considered significant at $p \leq 0.05$. Significances were indicated by asterisks with * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$. Data were processed, analyzed, and visualized using GraphPad Prism version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. The Proteome of Bovine Peripheral Blood Lymphocytes Consisted of 2631 Proteins and Showed Significant Differences between MAP-Resistant and Persistently MAP-Infected Cows after 48 h of Co-Incubation with MAP In Vitro

Using LC-MS/MS analysis, we identified the proteome of bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC), which included 2631 proteins. The high number of identified proteins reflects the analytical depth due to standard sample preparation and state-of-the-art analytical methods. After 48 h of co-incubation with *Mycobacterium avium* subsp.

paratuberculosis (MAP) in vitro, we found significant ($p \leq 0.05$) changes in lymphocyte protein abundances between the two groups. After co-incubation with MAP in vitro, the proteomes of PBMC from MAP-resistant and persistently MAP-infected cows showed significant differences. Fifty-one proteins of the lymphocyte proteome from MAP-resistant cows were more abundant, whereas 102 proteins showed increased abundance in lymphocytes from persistently MAP-infected cows.

3.2. Analyses of Enriched Signaling Pathways Revealed Functional Differences between Lymphocytes from MAP-Resistant and Persistently MAP-Infected Cows after Co-Incubation with MAP In Vitro

Our hypothesis-generating approach aimed to clarify the functional effects of the different proteome of cows from the same herd with different MAP status after contact with MAP in vitro. To this end, we used all proteins with significantly ($p \leq 0.05$) different abundance between groups to perform pathway enrichment analysis. Interestingly, among the proteins significantly enriched in MAP-resistant individuals, pathways such as “Epstein–Barr virus infection”, “Ammonium metabolic processes”, “Diabetes mellitus type I”, and “Inflammatory bowel disease” were enriched due to the higher abundance of “Toll-like receptor 2” and “Major histocompatibility complex, class II, DR alpha” proteins (Figure 1A).

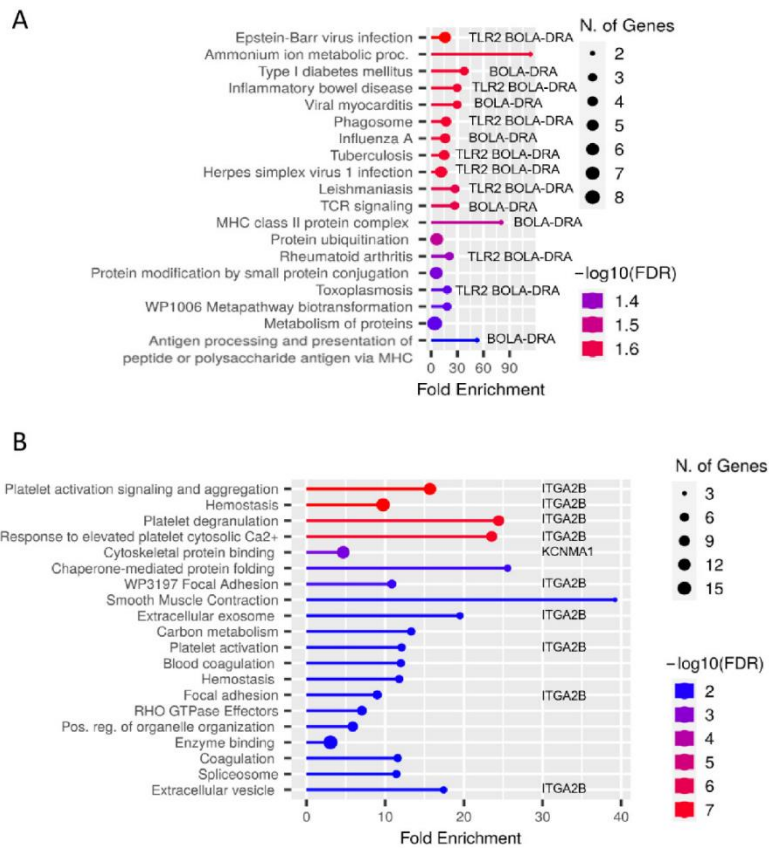


Figure 1. Analysis of functional enrichment of proteins with different abundance ($p \leq 0.05$) in PBMC of (A) MAP-resistant and (B) persistently MAP-infected cows after 48 h incubation with MAP in vitro.

vitro. Functional enrichment shows the 20 most significant categories of all available gene sets. Hierarchical clustering was performed using ShinyGO. The y-axis lists the assigned pathways in order of FDR values for the enrichment of each pathway. The x-axis shows the values in order of FDR enrichment for related paths. The color map shows the enrichment of the FDR for each path. The size of the dots corresponds to the number of genes associated with each pathway. The corresponding pathway enrichment data for MAP-resistant and persistently MAP-infected cows are shown in more detail in Tables S1 and S2. (A) *Bos taurus* toll-like receptor 2 (TLR2) and *Bos taurus* major histocompatibility complex, class II, DR alpha (BOLA-DRA, MHC class II) were associated with several signaling pathways enriched in lysates from MAP-resistant cows after 48-h incubation with MAP in vitro, whereas (B) *Bos taurus* integrin, alpha 2b (ITGA2B, CD41) and *Bos taurus* potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1 (KCNMA1) were associated with enriched signaling pathways in PBMC from persistently MAP-infected cows after 48-h incubation with MAP in vitro.

In contrast, the enriched pathways in persistently MAP-infected cows were not directly immune-related pathways labeled “platelet activation signaling and aggregation”, “hemostasis”, “platelet degranulation”, and “cytoskeletal protein binding” (Figure 1B). In association with these enriched signaling pathways, integrin alpha 2b (ITGA2B, CD41) and potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1 (KCNMA1), among others, were significantly enriched in persistently MAP-infected cows after in vitro co-incubation with MAP (Figure 1B).

3.3. In Vitro Co-Incubation with MAP for 48 h Increased the Abundances of TLR2, BOLA-DRB3, and BOLA-DRA in MAP-Resistant Cows

In our analysis of differential proteomic changes in MAP-resistant cows, a term we use to describe cows that are less susceptible to infection with MAP, we observed a significant increase in the expression of TLR2, BoLA-DRB3, and BoLA-DRA in PBMC after co-incubation with MAP in vitro. Cells from MAP-resistant cows responded to MAP co-incubation with a 2.5-fold higher expression of TLR2 ($p = 0.012$) compared with cells from persistently MAP-infected cows. Therefore, we examined the increase in expression of TLR2 in lymphocytes from MAP-resistant cows by flow cytometry (Figure 2(A1,A2)). Interestingly, after co-incubation with MAP, MAP-resistant cows expressed 2.5-fold more BoLA-DRB3 ($p = 0.017$) than cells from persistently MAP-infected cows. In addition, BoLA-DRA ($p = 0.044$) was enriched 1.4-fold more in cells from MAP-resistant than in cells from persistently MAP-infected cows. The data for MAP-resistant cows are shown in supplemental Table S3.

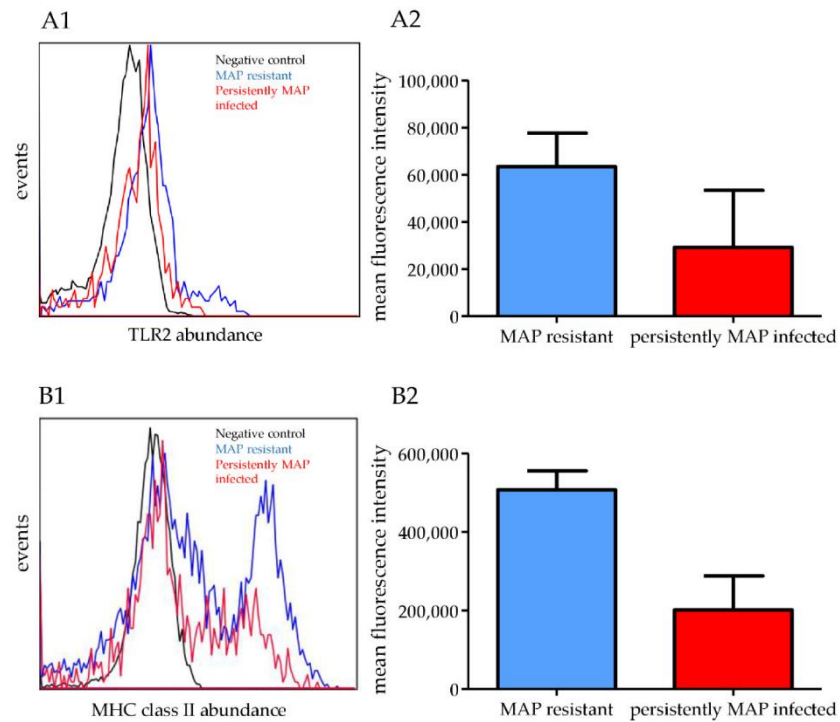


Figure 2. Higher abundance of TLR2 and MHC class II in PBMC of MAP-resistant compared with persistently MAP-infected cows. **(A1)** Higher abundance of TLR2 in PBMC from MAP-resistant compared with persistently MAP-infected cows as measured by flow cytometry analysis with representative histograms. **(A2)** Higher mean fluorescence intensity of TLR2 positive PBMC from MAP-resistant compared to persistently MAP-infected cows. Mean fluorescence intensity from flow cytometry \pm SD **(B1)** Higher MHC class II abundance in PBMC from MAP-resistant compared with persistently MAP-infected cows as measured by flow cytometry analysis with representative histograms. **(B2)** Higher mean fluorescence intensity of MHC class II positive PBMC from MAP-resistant compared to persistently MAP-infected cows. Mean fluorescence intensity from flow cytometry \pm SD.

We detected higher expression and higher mean fluorescence intensity of TLR2 on the cell surface of lymphocytes from MAP-resistant cows (Figure 2(A1,A2)). Because BoLA-DRB3 and BoLA-DRA are both proteins associated with class II of the major histocompatibility complex, we examined MHC class II expression on PBMC from MAP-resistant and persistently MAP-infected cows. There was a marked increase in MHC class II expression on the cell surface of lymphocytes from MAP-resistant cows (Figure 2(B1,B2)). Differential expression of TLR2 and MHC class II on the cell surface of PBMC from MAP-resistant and persistently MAP-infected cows was demonstrated by flow cytometry analysis with additional animals from another dairy farm (Figure 2).

3.4. Significantly Higher Expression of *ITGA2B* and *KCNMA1* in Persistently MAP-Infected Cows after Co-Incubation with MAP In Vitro

In contrast to the differences observed in the PBMC proteomes of MAP-resistant cows, the expression of *ITGA2B* and *KCNMA1* was significantly higher in the lymphocytes of persistently MAP-infected cows after co-incubation with MAP. Persistently MAP-infected cows expressed 2.2-fold more *ITGA2B* ($p = 0.047$) than cells from MAP-resistant cows after co-incubation with MAP. In addition, cells from

persistently MAP-infected cows responded to co-incubation with MAP with 15.2-fold higher expression of KCNMA1 ($p = 0.004$) compared with cells from MAP-resistant cows. The data for persistently MAP-infected cows are shown in supplemental Table S4.

We detected cell expression of CD41, the product of the ITGA2B gene, on bovine PBMC. Based on cell expression of CD41 on bovine platelets and cell adhesion of platelets to PBMC, we could not quantify differential expression of CD41 on bovine PBMC from MAP-resistant compared with persistently MAP-infected cows. Because we could not technically detect CD41 expression in flow cytometry, we show CD41 expression of MAP-resistant compared with persistently MAP-infected cows measured by immunocytochemistry (Figure 3). We were able to detect the expression of KCNMA1 in PBMC from cattle. Moreover, we detected significantly ($p \leq 0.001$) higher KCNMA1 abundance on the cell surface in PBMC from persistently MAP-infected cows compared to MAP-resistant ones (Figure 4).

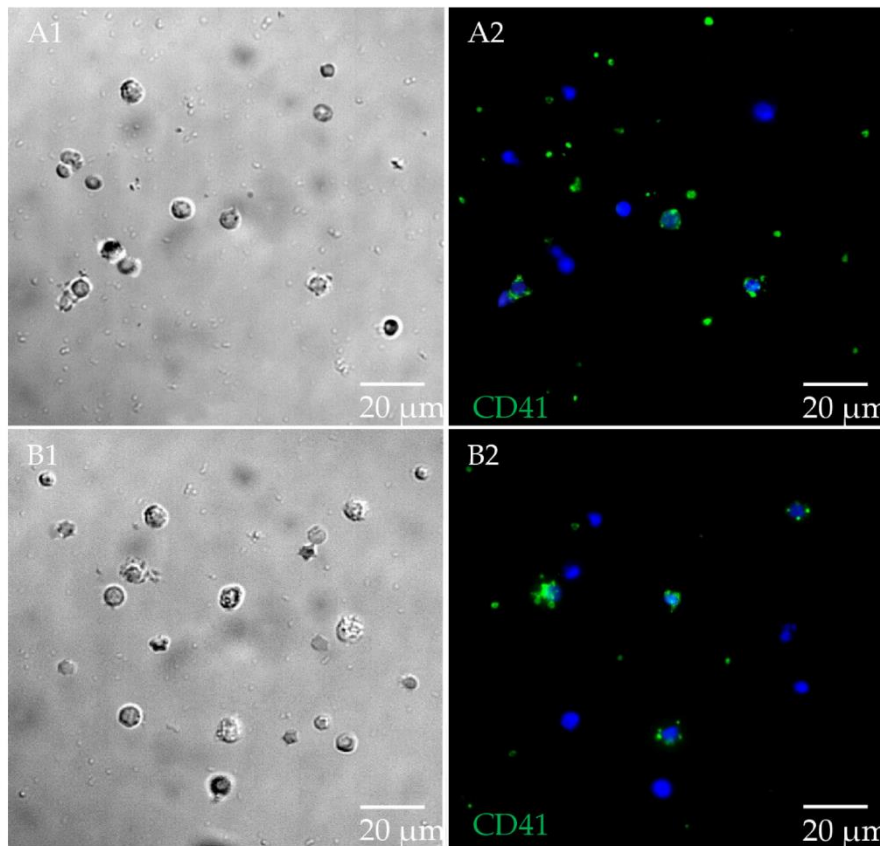


Figure 3. CD41 on PBMC from MAP-resistant and persistently MAP-infected cows. (A1) Differential interference contrast (DIC) imaging of PBMC from MAP-resistant cows. (A2) CD41 (in green) in PBMC from MAP-resistant cows (nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)). CD41 expression identified on platelets and PBMC from MAP-resistant cows. (B1) DIC of PBMC from persistently MAP-infected cows. (B2) CD41 (in green) in persistently MAP-infected cows. CD41 expression on platelets and PBMC of persistently MAP-infected cows (all representative images). Image sizes are annotated by scale bar in lower right corner of respective image.

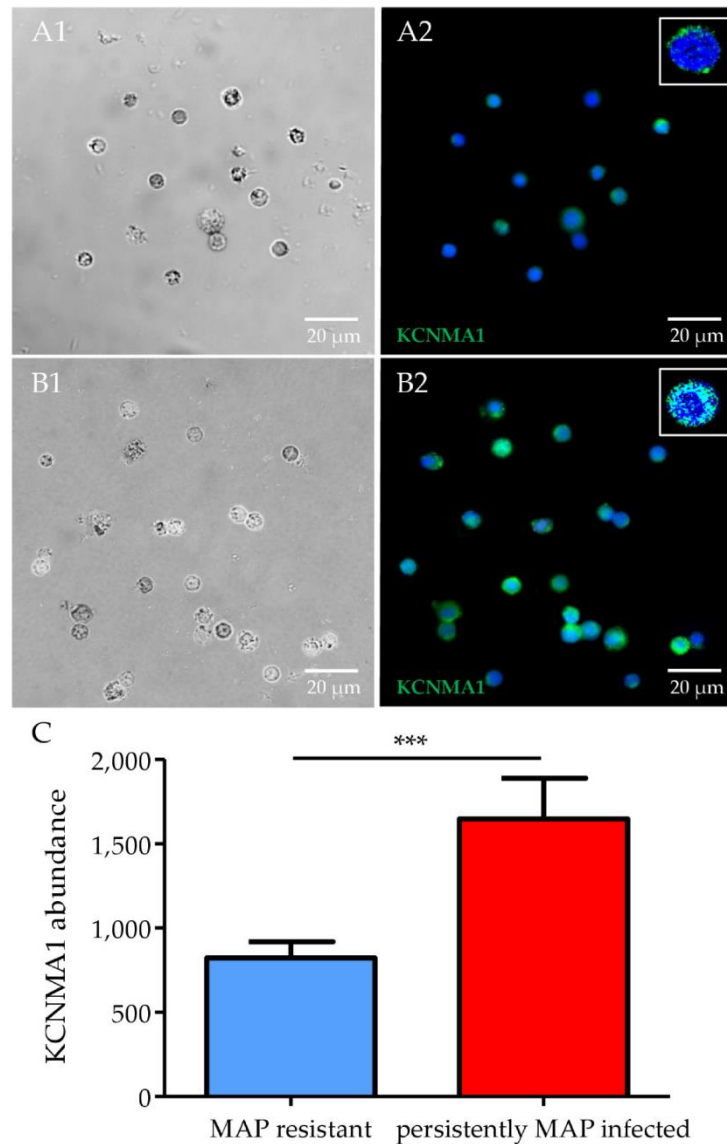


Figure 4. Higher abundance of KCNMA1 in PBMC of MAP-resistant compared with persistently MAP-infected cows. (A1) Differential interference contrast (DIC) imaging of PBMC from MAP-resistant cows. (A2) KCNMA1 (in green) in PBMC of MAP-resistant cows (nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)). (B1) DIC of cells from persistently MAP-infected cows. (B2) More KCNMA1 (in green) in persistently MAP-infected cows (all representative images). (C) Significantly higher KCNMA1 abundance in persistently MAP-infected cows than in MAP-resistant ones (quantified mean gray abundance from immunocytochemistry \pm SD, *** $p \leq 0.001$). Image sizes are annotated by scale bar in lower right corner of respective image.

4. Discussion

The importance of JD is undisputed for animal welfare and economic reasons [22]. PBMCs are an essential component of the immune system of cattle and contribute to the

defense against bacteria through activation, immune response, and inflammatory response [23].

TLR2, a pattern recognition factor, is present on the surface of bovine cells and is highly expressed by peripheral blood monocytes; it plays an important role in eliciting immune responses to mycobacteria [24,25]. In our study, we demonstrated higher abundance of TLR2 in the proteome and on the cell surface of PBMC from MAP-resistant compared to persistently MAP-infected cows from two different dairy farms (Figure 2). In an in vivo infection study, TLR2 was markedly downregulated in response to MAP in PBMC from cattle experimentally inoculated with MAP, indicating a role for TLR2 in the pathogenesis of paratuberculosis [26]. The lower abundance of TLR2 in PBMC from cows persistently infected with MAP is due to either downregulation of TLR2 by MAP or a differential host immune response. An important link between protection against mycobacteria and TLR2 regulation was demonstrated in TLR2^{-/-} mice, which, compared with wild-type mice, exhibited higher susceptibility to *M. tuberculosis* infection, showed decreased bacterial clearance and defective granulomatous response, and developed chronic pneumonia [27]. Therefore, downregulation of TLR2 in PBMCs from cows persistently infected with MAP suggests an unsuccessful immune response that is likely involved in the development of persistence of MAP in these cows. In human THP-1 cells, a monocytic leukemia cell line, it has been suggested that a TLR2-expressing cluster of classically differentiated macrophages exhibits the best defense response against MAP infection by increasing the expression of proinflammatory cytokines and chemokines such as IL1B, CCL4, CCL3, and CCL20 [28]. We hypothesized that MAP-resistant individuals choose a more successful immune response to combat MAP by upregulating TLR2.

MHC class II is a protein complex involved in the initiation of an inflammatory response by antigen presentation leading to macrophage activation, and is expressed on the surface of bovine PBMCs [29]. The more abundant proteins in PBMC of MAP-resistant cows were assigned to the enriched pathways “MHC class II protein complex” “antigen processing”, and “presentation of peptide or polysaccharide antigens via MHC” (Figure 1A). Proteins belonging to the MHC complex (bovine leukocyte antigen: BoLA), respectively, BoLA-DRA and BoLA-DRB3, showed induction of antigen presentation on PBMC of MAP-resistant cows after contact with MAP in vitro. The BoLA-DRB3 allele, which encodes the β -chain in the class II antigen complex, is the only gene described as functional among the three DRB loci in cattle [30]. In summary, we found that MHC class II abundance was higher in MAP-resistant cows than in persistently MAP-infected cows, possibly indicating that upregulation of MHC class II in PBMC is required as an appropriate defense mechanism against MAP infection. In contrast, MHC class II was actually decreased in persistently MAP-infected cows. We cannot explain this response to in vitro MAP infection at the moment, but it probably suggests that MAP causes the decreased MHC class II expression. In an in vitro infection study, MHC class II proteins were decreased in bovine macrophages after infection with MAP, whereas the decrease in MHC class II was not detected or was much less after infection with nonvirulent *M. avium* subsp. *avium*, illustrating a strategy of MAP to delay presentation and subsequent recognition by the adaptive immune system that may allow mycobacteria to persist in hosts [31]. In mice, a recombinant Bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine against *M. tuberculosis* was used to ameliorate defects of BCG such as phagosome maturation, autophagy, and reduced MHC class II expression [32]. Recombinant BCG was found to induce robust MHC class II-dependent antigen presentation on CD4 T cells in vitro, activating TLR2 and thus leading to a better protection against tuberculosis in mice [32]. Interestingly, we also detected “phagosome” as one of the upregulated pathways associated with upregulated proteins in the PBMC proteome of MAP-resistant cows, which in turn is related to TLR2 and BoLA-DRA (Figure 1A). In nonpathogenic mycobacteria, phagosomes take up mycobacteria that fuse with lysosomes during maturation [32]. In contrast, *M. tuberculosis* inhibits phagosomal maturation and reduces MHC class II antigen processing, allowing survival in macrophages and providing a

strategy for mycobacteria to evade immune surveillance [33]. Therefore, phagosomes from MAP-resistant cows could ingest and fuse with lysosomes during maturation, promoting adequate defense against mycobacteria. Investigation of possible defects in phagosome activity of persistently infected cows is planned to clarify the defects in immune response of persistently MAP-infected cows. This study demonstrates the importance of MHC class II and TLR2 in the defense against mycobacteria, as the abundance of TLR2 and MHC class II was higher in MAP-resistant cows than in persistently infected cows.

In our *in vitro* MAP co-incubation study with bovine PBMC from persistently MAP-infected cows compared to MAP-resistant ones, we observed a higher abundance of ITGA2B in PBMC from persistently MAP-infected cows. ITGA2B, also known as antigen CD41, is commonly known as a platelet surface marker [34]. To our knowledge, we are the first to describe a possible association between higher susceptibility to infection with MAP and higher expression of ITGA2B on bovine PBMC. ITGA2B is not only present in platelet morphology but is also expressed on PBMC (Figure 3). Adhesion of platelets to PBMC in our experiments prevented clear differentiation of PBMC from platelets in our assay (Figure 3); therefore, we could not verify the result of differential proteomic analyses in this study. To elucidate whether ITGA2B could have a clinical use in MAP diagnostics, further studies should be applied with animals in different stages of infection. Moreover, as we only included animals with clear infection status to our study, testing of PBMC from animals which could not clearly be differentiated into negative or positive by current diagnostic tests should be analyzed for ITGA2B expression. Differential expression of ITGA2B was recently demonstrated in a proteomic study of bovine monocytes [35]. This study aimed to investigate the role of bovine monocytes during the non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cows, demonstrating upregulation of ITGA2B in bovine monocytes during cytopathic BVDV infection [35]. Clinically, non-cytopathic BVDV infection can be followed by acute infection with cytopathic BVDV, which causes the fatal disease “mucosal disease” [35]. In a mouse lung model of tuberculosis, CD41 was highly expressed in lung areas with severe TB pathology with inflammation and tissue remodeling and was associated not only with nucleated cells but also with some nucleated cells, which was attributed to either staining of the marker on nucleated cells, phagocytosis of platelets, or adhesion of platelets to nucleated cells [36]. Therefore, the finding of upregulated ITGA2B on PBMC from persistently MAP-infected cows is, in our opinion, very interesting, and the underlying mechanisms deserve further investigation in future studies.

In addition, we detected higher expression of the calcium-activated potassium ion channel KCNMA1 in the PBMC proteome of persistently MAP-infected cows. We detected KCNMA1 on bovine PBMC for the first time and elucidated a significant (ratio: 15.2, $p \leq 0.001$) KCNMA1 abundance in persistently MAP-infected cows after contact with viable MAP *in vitro*. To date, KCNMA1 has not been reported to be associated with the immune response to mycobacteria. Gene expression analysis of endometrial tissue of gravid heifers revealed a lower abundance of KCNMA1 compared with non-gravid heifers and has been discussed as an early response marker for maternal recognition of pregnancy [37]. The versatility of KCNMA1 due to multiple Ca^{2+} perception sites explains the presence of these channels in different human cell types, in which Ca^{2+} concentrations can vary widely [38]. In a recent transcriptome study of porcine small intestinal epithelial cells obtained from tissue samples of large white piglets, upregulation of KCNMA1 was observed in pigs with a phenotype susceptible to enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) F4 compared with naturally resistant pigs [39]. Pigs susceptible to ETEC express higher levels of KCNMA1 in epithelial cells of the small intestine than pigs with a naturally resistant phenotype, which is due to a functional ETEC F4 receptor [39]. Another transcriptome study on human PBMC described that KCNMA1 is upregulated in PBMC from patients with type 1 diabetes mellitus compared with a healthy control group [40]. It was hypothesized that the upregulation of KCNMA1 triggers an inflammatory response

in PBMC from patients with type 1 diabetes [40]. Although these transcriptome data suggest a role of KCNMA1 in human and porcine disease susceptibility, transfer of these insights to our proteome-based findings needs to be interpreted with care due to transcriptome–proteome correlation discrepancy [41,42]. Nevertheless, the selective distinct upregulation of KCNMA1 in bovine PBMC is a highly interesting finding, suggesting an important role of this molecule in unsuccessful MAP defense. As suggested for ITGA2B, PBMC from animals which could not clearly be differentiated to the groups MAP-resistant or persistently MAP-infected cows by current diagnostic tests should be tested for KCNMA1 expression. Therefore, we aim to elucidate clinical use of KCNMA1 in MAP diagnostics in future studies. Because the physiological function of KCNMA1 on bovine PBMC is still unknown, further fundamental work is needed here to better understand its role in immune defense. To expand the insight given through the proteome data presented in this study, we will perform additional transcriptome-based experiments in the future.

According to our study, MHC class II and TLR2 are important proteins for successful immune defense against MAP in cows. In contrast, we can demonstrate for the first time a significant increase of ITGA2B and KCNMA1 in the immune response of cows with persistent MAP infection. The underlying mechanisms are currently unknown and should be further investigated.

5. Conclusions

We found significant differences in PBMC immune responses of MAP-resistant compared with persistently MAP-infected cows after contact with MAP *in vitro*. We hypothesize that the higher abundance of MHC class II complex proteins and TLR2 are important mechanisms for successful immune defense against MAP in cows. In contrast, the immune response of cows with persistent MAP infection showed significantly higher abundance of ITGA2B and KCNMA1 for the first time. The underlying mechanisms are currently unknown and should be further investigated.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo12100924/s1>, supplemental Table S1: pathway enrichment data for MAP-resistant, supplemental Table S2: pathway enrichment data for persistently MAP-infected cows, supplemental Table S3: Selection of proteins with different abundance in MAP resistant cows after 48-h incubation with MAP *in vitro*, supplemental Table S4: Selection of proteins with different abundance in persistently MAP-infected cows after 48-h incubation with MAP *in vitro*, supplemental Table S5: Age distribution of cows used in study.

Author Contributions: conceptualization, K.J.H.K., S.M.H., and C.A.D.; formal analysis, L.K., K.J.H.K., S.M.H., and C.A.D.; fundraising, C.A.D. and E.M.; investigation, L.K., K.J.H.K., B.A., S.M.H., C.A.D.; methodology, L.K., K.J.H.K., B.A., A.D., E.M., S.M.H., and C.A.D.; project management, L.K., K.J.H.K., and C.A.D.; supervision, C.A.D.; visualization, L.K., B.A. and C.A.D.; writing—original draft, L.K.; writing—review and editing, C.A.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the German Federal Ministry of Economics and Technology (via AiF) and the FEI, project AiF 18388 N to C.A.D. and E.M.

Institutional Review Board Statement: No experimental animals were used in this study. Collection of blood was permitted by the local authority, Government of Upper Bavaria, Munich (permit no. ROB-55.2-2532.Vet_03-17-106).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [43] partner repository (<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive>, accessed on 21 September 2022) with the dataset identifier PXD036881.

Acknowledgments: The authors thank Stefan Nüske and Heidi Duda for assistance with blood collection, Anne Hoffmann and Roxane Degroote for critical discussion, and Stefanie Püls and Sieglinde Hirmer for excellent technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare that there are no conflicts of interest. The funders had no influence on the design of the study, the collection, analysis, or interpretation of the data, the writing of the manuscript, or the decision to publish the results.

References

1. Conde, C.; Branger, M.; Cochard, T.; Rossignol, M.-N.; Fourichon, C.; Delafosse, A.; Davergne, A.; Joly, A.; Ngwa-Mbot, D.; Journaux, L.; et al. Draft Genome Sequences of 142 Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Strains Isolated from Naturally Infected Dairy Cattle. *Microbiol. Resour. Announc.* **2021**, *10*, e0069721. <https://doi.org/10.1128/mra.00697-21>.
2. Hernández-Reyes, A.L.; Chávez-Gris, G.; Maldonado-Castro, E.; Alcaraz-Sosa, E.L.; Díaz-Negrete, M.T. First identification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in wild ruminants in a zoo in Mexico. *Vet. World* **2022**, *12*, 655–661. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.655-661>.
3. Rasmussen, P.; Barkema, H.W.; Mason, S.; Beaulieu, E.; Hall, D.C. Economic losses due to Johne's disease (paratuberculosis) in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 3123–3143. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19381>.
4. Kravitz, A.; Pelzer, K.; Sriranganathan, N. The Paratuberculosis Paradigm Examined: A Review of Host Genetic Resistance and Innate Immune Fitness in Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis Infection. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 721706. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.721706>.
5. Alonso-Hearn, M.; Canive, M.; Blanco-Vazquez, C.; Torremocha, R.; Balseiro, A.; Amado, J.; Varela, E.; Ramos, R.; Jugo, B.M.; Casais, R. RNA-Seq analysis of ileocecal valve and peripheral blood from Holstein cattle infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis revealed dysregulation of the CXCL8/IL8 signaling pathway. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14845. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51328-0>.
6. Whittington, R.; Donat, K.; Weber, M.F.; Kelton, D.; Nielsen, S.S.; Eisenberg, S.; Arrigoni, N.; Juste, R.; Sáez, J.L.; Dhand, N.; et al. Control of paratuberculosis: Who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 198. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>.
7. Taylor, E.N.; Beckmann, M.; Villarreal-Ramos, B.; Vordermeier, H.-M.; Hewinson, G.; Rooke, D.; Mur, L.A.J.; Koets, A.P. Metabolomic Changes in Naturally MAP-Infected Holstein-Friesian Heifers Indicate Immunologically Related Biochemical Reprogramming. *Metabolites* **2021**, *11*, 727. <https://doi.org/10.3390/metabo11110727>.
8. Kleinwort, K.J.; Hauck, S.M.; Degroote, R.; Scholz, A.M.; Hölzel, C.; Maertlbauer, E.P.; Deeg, C. Peripheral blood bovine lymphocytes and MAP show distinctly different proteome changes and immune pathways in host-pathogen interaction. *PeerJ* **2019**, *7*, e8130. <https://doi.org/10.7717/peerj.8130>.
9. Hobmaier, B.F.; Lutterberg, K.; Kleinwort, K.J.; Mayer, R.; Hirmer, S.; Amann, B.; Hölzel, C.; Maertlbauer, E.P.; Deeg, C.A. Characterization of plant lectins for their ability to isolate Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from milk. *Food Microbiol.* **2019**, *82*, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.009>.
10. Canive, M.; Fernandez-Jimenez, N.; Casais, R.; Vázquez, P.; Lavín, J.L.; Bilbao, J.R.; Blanco-Vázquez, C.; Garrido, J.M.; Juste, R.A.; Alonso-Hearn, M. Identification of loci associated with susceptibility to bovine paratuberculosis and with the dysregulation of the MECOM, eEF1A2, and U1 spliceosomal RNA expression. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 313. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79619-x>.
11. Juste, R.; Geijo, M.; Elguezal, N.; Sevilla, I.; Alonso-Hearn, M.; Garrido, J. Paratuberculosis vaccination specific and non-specific effects on cattle lifespan. *Vaccine* **2021**, *39*, 1631–1641. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.058>.
12. Rosseels, V.; Huygen, K. Vaccination against paratuberculosis. *Expert Rev. Vaccines* **2008**, *7*, 817–832. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.6.817>.
13. Crociati, M.; Grispoldi, L.; Chalias, A.; Monaci, M.; Cenci-Goga, B.; Sylla, L. Effect of Culling Management Practices on the Seroprevalence of Johne's Disease in Holstein Dairy Cattle in Central Italy. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 162. <https://doi.org/10.3390/vetsci9040162>.
14. Lu, Z.; Mitchell, R.; Smith, R.; Van Kessel, J.; Chapagain, P.; Schukken, Y.; Grohn, Y. The importance of culling in Johne's disease control. *J. Theor. Biol.* **2008**, *254*, 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.05.008>.
15. McAloon, C.G.; Roche, S.; Ritter, C.; Barkema, H.W.; Whyte, P.; More, S.J.; O'Grady, L.; Green, M.J.; Doherty, M.L. A review of paratuberculosis in dairy herds—Part 2: On-farm control. *Vet. J.* **2019**, *246*, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.009>.
16. Ritter, C.; Wolf, R.; Adams, C.; Kelton, D.; Pickel, C.; Mason, S.; Orsel, K.; De Buck, J.; Barkema, H. Short communication: Herd-level prevalence of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis is not associated with participation in a voluntary Alberta Johne's disease control program. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 2157–2160. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10356>.
17. Lutterberg, K.; Kleinwort, K.J.H.; Hobmaier, B.F.; Hauck, S.M.; Nüske, S.; Scholz, A.M.; Deeg, C.A. A Functionally Different Immune Phenotype in Cattle Is Associated With Higher Mastitis Incidence. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2884. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02884>.
18. Rodríguez-Gil, A.; Ritter, O.; Saul, V.V.; Wilhelm, J.; Yang, C.-Y.; Grosschedl, R.; Imai, Y.; Kuba, K.; Kracht, M.; Schmitz, M.L. The CCR4-NOT complex contributes to repression of Major Histocompatibility Complex class II transcription. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3547. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03708-7>.

19. Grosche, A.; Hauser, A.; Lepper, M.F.; Mayo, R.; von Toerne, C.; Merl-Pham, J.; Hauck, S.M. The Proteome of Native Adult Müller Glial Cells from Murine Retina. *Mol. Cell Proteom.* **2016**, *15*, 462–480. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.052183>.
20. Perkins, D.N.; Pappin, D.J.; Cottrell J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551–3567. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1522-2683\(19991201\)20:18<3551::Aid-elps3551>3.0.Co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1522-2683(19991201)20:18<3551::Aid-elps3551>3.0.Co;2-2).
21. Ezz, M.A.; Marey, M.A.; Elweza, A.E.; Kawai, T.; Heppelmann, M.; Pfarrer, C.; Balboula, A.Z.; Montaser, A.; Imakawa, K.; Zaabel, S.M.; et al. TLR2/4 signaling pathway mediates sperm-induced inflammation in bovine endometrial epithelial cells in vitro. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0214516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214516>.
22. Nielsen, S.S.; Houe, H.; Denwood, M.; Nielsen, L.R.; Forkman, B.; Otten, N.D.; Agger, J.F. Application of Methods to Assess Animal Welfare and Suffering Caused by Infectious Diseases in Cattle and Swine Populations. *Animals* **2021**, *11*, 3017. <https://doi.org/10.3390/ani11113017>.
23. Gondaira, S.; Nishi, K.; Iwano, H.; Fujiki, J.; Watanabe, R.; Eguchi, A.; Hirano, Y.; Higuchi, H.; Nagahata, H. Transcriptome analysis of Mycoplasma bovis stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2021**, *232*, 110166. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2020.110166>.
24. Kwong, L.S.; Parsons, R.; Patterson, R.; Coffey, T.J.; Thonur, L.; Chang, J.-S.; Russell, G.; Haig, D.; Werling, D.; Hope, J.C. Characterisation of antibodies to bovine Toll-like receptor (TLR)-2 and cross-reactivity with ovine TLR2. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2011**, *139*, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.10.014>.
25. Underhill, D.M.; Ozinsky, A.; Smith, K.D.; Aderem, A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14459–14463. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14459>.
26. Thirunavukkarasu, S.; de Silva, K.; Whittington, R.J.; Plain, K.M. In vivo and in vitro expression pattern of Toll-like receptors in Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2013**, *156*, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.08.008>.
27. Drennan, M.B.; Nicolle, D.; Quesniaux, V.J.; Jacobs, M.; Allie, N.; Mpagi, J.; Frémond, C.; Wagner, H.; Kirschning, C.; Ryffel, B. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 49–57. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63095-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63095-7).
28. Park, H.-T.; Bin Park, W.; Kim, S.; Lim, J.-S.; Nah, G.; Yoo, H.S. Revealing immune responses in the Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-infected THP-1 cells using single cell RNA-sequencing. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0254194. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254194>.
29. Taylor, B.C.; Choi, K.Y.; Scibienski, R.J.; Moore, P.F.; Stott, J.L. Differential expression of bovine MHC class II antigens identified by monoclonal antibodies. *J. Leukoc. Biol.* **1993**, *53*, 479–489. <https://doi.org/10.1002/jlb.53.5.479>.
30. Miyasaka, T.; Takeshima, S.-N.; Sentsui, H.; Aida, Y. Identification and diversity of bovine major histocompatibility complex class II haplotypes in Japanese Black and Holstein cattle in Japan. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 420–431. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4621>.
31. Weiss, D.J.; Evanson, O.A.; McClenahan, D.J.; Abrahamsen, M.S.; Walcheck, B.K. Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis or Mycobacterium avium subsp. avium. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 1002–1008. <https://doi.org/10.1128/iai.69.2.1002-1008.2001>.
32. Khan, A.; Bakhru, P.; Saikolappan, S.; Das, K.; Soudani, E.; Singh, C.R.; Estrella, J.L.; Zhang, D.; Pasare, C.; Ma, Y.; et al. An autophagy-inducing and TLR-2 activating BCG vaccine induces a robust protection against tuberculosis in mice. *NPJ Vaccines* **2019**, *4*, 34. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0122-8>.
33. Ramachandra, L.; Noss, E.; Boom, W.H.; Harding, C.V. Processing of Mycobacterium tuberculosis antigen 85B involves intraphagosomal formation of peptide-major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation. *J. Exp. Med.* **2001**, *194*, 1421–1432. <https://doi.org/10.1084/jem.194.10.1421>.
34. Simon, M.; Dusinsky, R.; Horovska, L.; Bilka, F.; Hluchy, S. Immunohistochemical reactivity of anti-platelet monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1996**, *52*, 377–382. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(96\)05590-0](https://doi.org/10.1016/0165-2427(96)05590-0).
35. Ammari, M.; McCarthy, F.M.; Nanduri, B.; Pinchuk, L.M. Analysis of Bovine Viral Diarrhea Viruses-infected monocytes: Identification of cytopathic and non-cytopathic biotype differences. *BMC Bioinform.* **2010**, *11* (Suppl. S6), S9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-s6-s9>.
36. Fox, K.A.; Kirwan, D.E.; Whittington, A.M.; Krishnan, N.; Robertson, B.D.; Gilman, R.H.; López, J.W.; Singh, S.; Porter, J.C.; Friedland, J.S. Platelets Regulate Pulmonary Inflammation and Tissue Destruction in Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2018**, *198*, 245–255. <https://doi.org/10.1164/rccm.201710-2102OC>.
37. Forde, N.; Carter, F.; Spencer, T.; Bazer, F.; Sandra, O.; Mansouri-Attia, N.; Okumu, L.; McGettigan, P.; Mehta, J.; McBride, R.; et al. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: How soon does the cow know she is pregnant? *Biol. Reprod.* **2011**, *85*, 144–156. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.090019>.
38. Salkoff, L.; Butler, A.; Ferreira, G.; Santi, C.; Wei, A. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 921–931. <https://doi.org/10.1038/nrn1992>.
39. Augustino, S.M.A.; Xu, Q.; Liu, X.; Liu, L.; Zhang, Q.; Yu, Y. Transcriptomic Study of Porcine Small Intestine Epithelial Cells Reveals Important Genes and Pathways Associated With Susceptibility to Escherichia coli F4ac Diarrhea. *Front. Genet.* **2020**, *11*, 68. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00068>.

40. Santos, A.S.; Cunha-Neto, E.; Gonfinetti, N.V.; Bertonha, F.B.; Brochet, P.; Bergon, A.; Moreira-Filho, C.A.; Chevillard, C.; da Silva, M.E.R. Prevalence of Inflammatory Pathways Over Immuno-Tolerance in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Recent-Onset Type 1 Diabetes. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 765264. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.765264>.
41. Gry, M.; Rimini, R.; Strömberg, S.; Asplund, A.; Pontén, F.; Uhlén, M.; Nilsson, P. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genom.* **2009**, *10*, 365. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-365>.
42. Reimegård, J.; Tarbier, M.; Danielsson, M.; Schuster, J.; Baskaran, S.; Panagiotou, S.; Dahl, N.; Friedländer, M.R.; Gallant, C.J. A combined approach for single-cell mRNA and intracellular protein expression analysis. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 624. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02142-w>.
43. Perez-Riverol, Y.; Bai, J.; Bandla, C.; García-Seisdedos, D.; Hewapathirana, S.; Kamatchinathan, S.; Kundu, D.J.; Prakash, A.; Frericks-Zipper, A.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE database resources in 2022: A hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D543-d552. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1038>.

4 DISKUSSION

Die bovine Paratuberkulose ist eine Erkrankung, die unter anderem domestizierte Wiederkäuer, wie das Hausrind, betrifft (Hernández-Reyes, Chávez-Gris et al. 2022). Die Erkrankung hat sowohl für die Tiergesundheit als auch für die wirtschaftlichen Erträge der Landwirte negative Folgen (Rasmussen, Barkema et al. 2021).

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Rind in Kontakt mit dem Erreger kommt, ist aufgrund der Herdenprävalenzen innerhalb Deutschlands, welche zwischen 3,6 – 50,1 % liegen (Eisenberg, Krieger et al. 2022), hoch. Trotzdem sind verhältnismäßig wenige Tiere positiv auf den Erreger getestet oder entwickeln gar Symptome (Whitlock and Buergelt 1996). Wir haben daher im Vorfeld zu unserer Studie die Hypothese aufgestellt, dass manche Tiere aufgrund einer abweichenden Immunantwort eine höhere oder niedrigere Wahrscheinlichkeit mitbringen, sich mit dem Erreger zu infizieren und schlussendlich an Paratuberkulose erkranken. Es wurde die *in vitro*-Immunantwort auf MAP von PBMC MAP-resistenter und persistent MAP-infizierter Kühe eines auf MAP positiv getesteten Bestandes untersucht. Dies erfolgte mit dem Ziel zu analysieren, ob und auf welche Art das PBMC-Proteom beider Gruppen differiert.

Nach vergleichender Analyse des Proteoms konnten wir eine signifikante Erhöhung der Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) - Abundanz gesunder, MAP-resistenter Tiere im Vergleich zu persistent MAP-infizierten Tieren feststellen. TLR2 ist ein Membranprotein auf der Oberfläche von Leukozyten und spielt eine wichtige Rolle bei der initialen Immunantwort auf Mykobakterien (Underhill, Ozinsky et al. 1999, Kwong, Parsons et al. 2011). *In vitro*-Stimulationsexperimente von transfizierten Zelllinien, murinen Makrophagen und humanen PBMC konnten zeigen, dass TLR2 unter anderem an der Erkennung von MAP durch das angeborene Immunsystem beteiligt ist (Ferwerda, Kullberg et al. 2007).

Die 2,5-fach erhöhte Abundanz des Proteins TLR2 im Proteom MAP-resistenter Tiere kann bedeuten, dass eine vermehrte Expression von TLR2 in PBMC von MAP-resistenten Tieren die Voraussetzung für eine adäquate Immunantwort ist, wodurch eine bessere Pathogenerkennung ermöglicht wird. Im Gegensatz dazu konnte nach Analyse des Proteoms der PBMC persistent MAP-infizierter Kühe eine im Vergleich zu MAP-resistenten Kühen, niedrigere Abundanz von TLR2 nach Co-

Inkubation mit MAP *in vitro* beobachtet werden. Das kann bedeuten, dass bei persistent MAP-infizierten Tieren die TLR2 Expression durch MAP herabgesetzt wird und der Erreger es bei Tieren dieses Immunphänotyps schafft, die Expression dieses Proteins zu beeinträchtigen. Dies ist für den Erreger vorteilhaft, da TLR2 bei der Pathogenerkennung eine Rolle spielt und somit eine verminderte Expression dieses wichtigen Rezeptors eine Persistenz des Erregers im Organismus begünstigen könnte.

In einer *in vivo*-Studie mit experimentell MAP-infizierten gesunden Rindern konnte eine signifikant niedrigere Expression von TLR2 in der initialen Phase der Immunreaktion beobachtet werden (Thirunavukkarasu, de Silva et al. 2013). Wir konnten in unserer Studie bei persistent MAP-infizierten Tieren ebenfalls eine signifikant niedrigere Abundanz von TLR2 im Vergleich zu MAP-resistenten Tieren feststellen. Tiere unserer Studie sind bereits zuvor mit MAP in Kontakt gekommen, was bedeuten kann, dass es MAP bei Tieren eines persistent MAP-infizierten Phänotyps gelingt TLR2 herunter zu regulieren, jedoch nicht bei MAP-resistenten Tieren. Daher ermöglicht es der Immunphänotyp MAP-resistenter Tiere, MAP als Pathogen zu erkennen und dadurch die Bekämpfung des Erregers durch Zellen des Immunsystems zu ermöglichen.

Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass im Proteom von PBMC nach Co-Inkubation mit MAP *in vitro* bei MAP-resistenten Tieren TLR2 höher abundant war, als bei persistent MAP-infizierten Tieren. Daraus kann geschlossen werden, dass die erhöhte TLR2-Abundanz bei MAP-resistenten Tieren eine protektive Wirkung hatte. Eine höhere Abundanz von TLR2 im Zusammenhang mit einer protektiven Immunantwort gegen Paratuberkulose bei Rindern wurde bisher noch nicht beschrieben. In einer Studie mit MAP-infizierten ausdifferenzierten CaCo-2 Zellen, einer immortalisierten humanen Darmkrebs-Zelllinie, konnte eine erhöhte Expression von TLR2 beobachtet werden, die die Aktivität des Serotonin-Transporters hemmte, welche mit erhöhten Konzentrationen an pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF α , IL-6 und IL-8, verbunden war (Qasem, Naser et al. 2021). Diese Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte Expression von TLR2 eine pro-inflammatorische Immunantwort bedingen kann. Die MAP-resistenten Tiere in unserer Studie hatten sich nachweislich bis zu dem Zeitpunkt der Probenentnahme nicht mit dem Erreger infiziert, obwohl sie in derselben Stallumgebung wie die persistent MAP-infizierten Tiere lebten und daher die

Wahrscheinlichkeit, sich mit dem Erreger zu infizieren, dieselbe hätte sein müssen. Die erfolgreiche Immunantwort gegen MAP bei MAP-resistenten Kühen könnte sich unter anderem dadurch erklären, dass TLR2 eine pro-inflammatorische Immunreaktion auslösen kann (Qasem, Naser et al. 2021).

Auch in humanen klassisch differenzierten Makrophagen einer TLR2-exprimierenden monozytären Zelllinie (THP-1), konnten nach Infektion mit MAP *in vitro* die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL1B, CCL4, CCL3 und CCL20 beobachtet werden (Park, Park et al. 2021). Diese Zelllinie zeigte die beste und aktivste Reaktion gegen MAP im Vergleich zu anders differenzierten Makrophagen dieser Zelllinie, die weniger TLR2 exprimierten (Park, Park et al. 2021). Dadurch kann bestätigt werden, dass eine erhöhte TLR2 Expression eine pro-inflammatorische und protektive Immunantwort mit sich zieht. Somit ist eine geringere TLR2 Expression für die erfolgreiche Bekämpfung des Erregers nachteilig und könnte erklären, weshalb die Kühe des persistent MAP-infizierten Immunphänotyps an einer Infektion leiden, während die Kühe des MAP-resistenten Immunphänotyps sich nicht infizieren, obwohl sie ebenfalls durch die Stallumgebung mit MAP in Kontakt kommen.

Neben einer signifikant erhöhten Abundanz des Proteins TLR2 bei MAP-resistenten Tieren war nach Pathway-Enrichment-Analysen aller signifikant erhöht exprimierter Proteine von MAP-resistenten Kühen der Pathway „Phagosom“ angereichert. Die Anreicherung dieses Pathways ist auf die im Proteom von PBMC MAP-resistenter Tiere erhöht abundanten Proteine TLR2, BoLa-DRA (*engl.* bovine leucocyte antigen DR alpha) und DYNC1H1 (Dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1) zurückzuführen. Es ist bekannt, dass MAP innerhalb der Makrophagen der protektiven Immunantwort in einer sogenannten immunologischen Nische entkommt, indem MAP die Phagolysosomenreifung unterbindet (Field, McAloon et al. 2022). Interessanterweise konnte in aus *Dictyostelium* Zellen oder murinen Zelllinien (J774 oder RAW264.7) durch Phagozytose von Latexkugeln hergestellten Phagosomen gezeigt werden, dass sich Dynein-Cluster in Mikrodomänen auf der Phagosomenmembran während der Phagosomenreifung ansammeln (Rai, Pathak et al. 2016). Über Reorganisation der einzelnen Dynein-Proteine innerhalb eines Clusters können diese Dynein-Cluster bewirken, dass Kraft auf einen einzelnen Mikrotubulus erzeugt wird, was zu einem gerichteten Transport des Phagosoms führt (Rai, Pathak et al. 2016). Dieser gerichtete Phagosomentransport fördert

vermutlich die Phagolysosomenfusion und damit den Pathogenabbau (Rai, Pathak et al. 2016). Bei der Aufnahme von Pathogenen durch Phagozyten findet *de novo* eine Bildung spezialisierter Kompartimente statt, welche als Phagosomen bezeichnet werden, die dann eine Reihe von Fusions- und Spaltungsprozesse durchlaufen und mit dem endolysosomalen System interagieren, was als Phagosomenreifung bekannt ist (Levin-Konigsberg and Mantegazza 2021). Das kann bedeuten, dass MAP-resistente, im Gegensatz zu persistent MAP-infizierten Tieren, durch eine erhöhte Abundanz von DYNC1H1 im PBMC-Proteom, eine daraus resultierende gerichtete Bewegung des Phagosoms hin zum Lysosom zeigen. Diese gerichtete Bewegung des Phagosoms verstärkt die Phagolysosomenfusion und somit auch den Abbau zuvor phagozytierter MAPs. Um die möglicherweise differentiellen Vorgänge und Defekte in den Phagosomen der Makrophagen und der Fusion mit Lysosomen zum Phagolysosom genauer zu verstehen, müssten weiterführend Assays zur Untersuchung der Phagosomen durchgeführt werden. Beispielsweise könnten mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Stimulation mit MAP die Phagosomenbildung angeregt werden und diese Phagosomen zu bestimmten Zeitpunkten während des Phagozytoseprozesses fixiert, permeabilisiert (Levin-Konigsberg and Mantegazza 2021) und mit beispielsweise einem anti-DYNC1H1 Antikörper sondiert werden. So könnten einerseits mittels Differentialinterferenzkontrast die beweglichen Prozesse des Phagosoms beobachtet und verglichen werden und andererseits die Unterschiede in der örtlichen und zeitlichen Beteiligung des Proteins DYNC1H1 und dessen differentieller Abundanz zwischen MAP-resistenten und persistent MAP-infizierten Tieren.

Neben einer höheren Abundanz von TLR2 im PBMC-Proteom MAP-resistenter Tiere konnten wir außerdem eine signifikant erhöhte Abundanz der Proteine BoLa (*engl.* bovine leucocyte antigen) –DRA und -DRB3 feststellen. Diese bovinen Proteine sind Teil des MHC II-Komplexes (*engl.* major histocompatibility complex class II), einem Proteinkomplex auf der Oberfläche von bovinen Lymphozyten (Behl, Verma et al. 2012). Im Vergleich zu persistent MAP-infizierten Tieren war bei MAP-resistenten Tieren BoLA-DRA 1,4-fach und BoLA-DRB3 2,5-fach stärker abundant. Zusätzlich waren die Pathways „MHC class II protein complex“ und „Antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC“ nach Pathway-Enrichment Analyse aller signifikant erhöht exprimierter Proteine in PBMC

von MAP-resistenten Kühen angereichert. Diese waren auf das Protein BoLA-DRA zurückzuführen. Dieses Protein bildet die α -Kette der DR-Gruppe des MHC II-Komplexes, welcher Antigene bindet und diese T-Lymphozyten präsentiert und somit eine Rolle bei der adaptiven Immunantwort auf Antigene spielt (Zhou, Hickford et al. 2007). Eine erhöhte Abundanz von Proteinen des MHC II-Komplexes (MHC II) könnte also dazu führen, dass beispielsweise durch Makrophagen, die zuvor Erreger phagozytiert haben, mehr Antigene des Erregers über MHC II präsentiert werden und dadurch eine Bekämpfung der Pathogene erleichtert wird. Im Gegensatz dazu könnte eine niedrigere Abundanz von Proteinen des MHC II-Komplexes, wie es in unserer Studie bei persistent MAP-infizierten Tieren beobachtet wurde, dazu führen, dass Antigene phagozytierter MAPs nicht, oder nicht ausreichend den Immunzellen präsentiert werden und somit die Mykobakterien intrazellulär über- und weiterleben sowie proliferieren können.

Diese niedrigere Expression von MHC II konnte in einer *in vitro*-Infektionsstudie mit bovinen Makrophagen, welche mit dem apathogenen *Mycobacterium avium* subsp. *avium* im Vergleich zu pathogenen MAP infiziert wurden, beobachtet werden (Weiss, Evanson et al. 2001). Eine Stimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IFN- γ oder TNF- α konnte in dieser Studie nur bei mit *Mycobacterium avium* subsp. *avium* infizierten Makrophagen eine vermehrte Expression von MHC II auslösen (Weiss, Evanson et al. 2001). MAP hemmte also bei *in vitro* infizierten Makrophagen die MHC II Expression. Des Weiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass MAP die MHC II Expression trotz pro-inflammatorischer Signale unterdrücken konnte (Weiss, Evanson et al. 2001). Bei PBMC persistent MAP-infizierter Tiere konnten wir eine signifikant niedrigere Abundanz von Proteinen des MHC II Komplexes im Vergleich zu MAP-resistenten Tieren beobachten. Das kann bedeuten, dass die Pathogenese-Mechanismen von MAP nur bei persistent MAP-infizierten Tieren umgesetzt werden können, da sie einen anderen Immunphänotyp haben als MAP-resistente Tiere. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass wir bereits bei gesunden Kühen einen devianten Immunphänotyp feststellen konnten (Lutterberg, Kleinwort et al. 2018) und PBMC differentieller Immunphänotypen eine jeweils andere Immunantwort auf MAP Co-Inkubation *in vitro* zeigten (Kleinwort, Hauck et al. 2019).

In der zuvor beschriebenen Studie von Weiss und Evanson et al. konnte außerdem gezeigt werden, dass mit *Mycobacterium avium* subsp. *avium* infizierte

Makrophagen im Gegensatz zu den MAP infizierten Makrophagen von Lymphozyten lysiert wurden, was vermutlich der fehlenden oder ungenügenden Antigenpräsentation von MAP infizierten Makrophagen geschuldet war (Weiss, Evanson et al. 2001). Dies zeigt die Unterschiede bei pathogenen und nicht pathogenen Mykobakterien bezüglich ihrer Kapazität die Präsentation mykobakterieller Antigene zu beeinflussen auf (Weiss, Evanson et al. 2001). Interessanterweise konnten wir durch Pathway-Enrichment-Analysen aller signifikant erhöht abundanter Proteine von MAP-resistenten Kühen zeigen, dass der Pathway „Phagosom“ angereichert war. Die Anreicherung dieses Pathways war auf die höher abundanten Proteine TLR2, BoLA-DRA und DYNC1H1 zurückzuführen. Weiss und Evanson et al. konnten zeigen, dass die Beseitigung des apathogenen *Mycobacterium avium* subsp. *avium* im Gegensatz zu MAP durch Makrophagen gelang (Weiss, Evanson et al. 2001). MAP gelingt es also, die Pathogen-schädlichen Mechanismen in den Immunzellen zu umgehen. In unserer Studie fanden wir jedoch Hinweise darauf, dass dieser Umgehungs-Mechanismus des Immunsystems, der durch MAP angewendet wird, bei Kühen des MAP-resistenten Immunphänotyps nicht gelingt. Durch höhere Abundanz der Proteine TLR2, BoLA-DRA und DYNC1H1 scheinen die Prozesse im Phagosom aktiviert, was dazu führen könnte, dass innerhalb der Zelle Phagosomen reifen, mit Lysosomen zu Phagolysosomen verschmelzen und so die MAPs lysiert und damit abgetötet werden können. Da die Antigenpräsentation über MHC II eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung des Erregers durch Immunzellen zu spielen scheint, könnte diese signifikant erhöhte Expression von MHC II bei den MAP-resistenten Tieren einen Teil der vorteilhaften Immunreaktion gegenüber MAP erklären. Denn nur, wenn Antigene erfolgreich von beispielsweise Makrophagen präsentiert werden, können infizierte Makrophagen erkannt und so die Infektion bekämpft werden.

Eine vermehrte Expression von TLR2 und MHC II gleichzeitig könnte bedeuten, dass durch die erhöhte Expression von TLR2 vermehrt MAP vom Immunsystem erkannt und von den Makrophagen phagozytiert werden. Was mitunter bei den Umgehungs-Mechanismen des Immunsystems von MAP zur Persistenz innerhalb der Makrophagen führen könnte, wird von resistenten Tieren „abgefangen“, indem vermehrt MHC II exprimiert wird und die Antigene auf der Zelloberfläche der Makrophagen präsentiert und infizierte Zellen so beseitigt werden können.

Die Herunterregulation von MHC II und TLR2 konnte auch in einer Studie von Park und Park et al. beobachtet werden (Park, Park et al. 2020). Diese Studie hat den Einfluss des Prozessierens von MAP über Madin-Darby bovine Kidney-Epithelzellen im Vergleich zu MAPs ohne vorheriges Prozessieren über Epithelzellen, direkt aus der Flüssigkultur, auf die nachfolgende Wirkung von MAP auf bovine PBMC *in vitro* untersucht (Park, Park et al. 2020). Es wurde in beiden Ansätzen beobachtet, dass die Wirtszelle, sobald MAP eingedrungen ist, die Expression von Oberflächenrezeptoren wie TLR2 und MHC II unterdrückt, welche für die Pathogenpräsentation und -erkennung notwendig sind (Park, Park et al. 2020). Diese Immunreaktion konnten wir in unserer Studie bei Tieren des persistent MAP-infizierten Phänotyps beobachten. Das kann bedeuten, dass bei dieser Immunantwort die Mykobakterien für sie schädliche Immunmechanismen umgehen indem für die Pathogenerkennung und -präsentation wichtige Proteine herunterreguliert werden. Im Gegensatz dazu zeigen diese Proteine bei den MAP-resistenten Tieren eine höhere Abundanz, was die erfolgreiche Bekämpfung des Pathogens erklären kann. Da wir in unserer *in vitro*-Studie beide Ansätze in der gleichen Art und Weise behandelt haben, kann beispielsweise eine differentielle Pathogenkonzentration oder Inkubationszeit mit dem Erreger ausgeschlossen werden, welche dazu führen könnten, dass eine andere Immunreaktion ausgelöst wird. Die zwei verschiedenen Immunphänotypen scheinen intrinsisch eine differentielle Kapazität dafür zu besitzen, die Mechanismen zu aktivieren, die MAP erkennen, sie den Immunzellen zu präsentieren und sie zu eliminieren. Die Immunreaktion der MAP-resistenten Tiere ist diejenige, welche zielführend ist und wie bereits zuvor in einer anderen Studie beschrieben, ausgelöst wird, wenn PBMC in Kontakt mit apathogenen Mykobakterien kommen (Weiss, Evanson et al. 2001). Tieren dieses MAP-resistenten Immunphänotyps gelingt es also, die pathogenen Mechanismen der Mykobakterien zu umgehen und nicht umgekehrt.

Die Massenspektrometrie stellt ein sehr genaues Analyseverfahren dar und eignet sich um Proteine genau zu quantifizieren (Fazli, Panigrahy et al. 2022). Sie bildet jedoch lediglich ab, welche Proteine und in welcher Menge in der Probe zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhanden waren und kann keine Aussage über das Proteom vor oder nach der Messung geben. Daher müsste untersucht werden, ob die Stärke der Expression sich im Laufe der Zeit verändert, da unsere Messungen lediglich den Zeitpunkt 48 h *post infectionem* abbildeten. Dadurch könnte analysiert werden, ob

die differentielle Immunreaktion auch über einen längeren Zeitraum verändert ist und vor allem, ab wann Differenzen zu beobachten sind. Dies kann einerseits Aufschluss über die zeitlichen Abläufe in der MAP-Erkennung und –Präsentation sowie –Bekämpfung bei bovinen PBMC geben. Andererseits auch darüber, wie schnell die Veränderungen in der Immunantwort beider Immunphänotypen passieren. Das könnte unter anderem über Durchflusszytometrie-Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten *post infectionem* eruiert werden. Ebenso würde die Immunzytologie zu unterschiedlichen Zeitpunkten *post infectionem* Aufschluss darüber geben können.

Zudem wäre es interessant zu analysieren, ob die erhöhte TLR2 Expression die erhöhte MHC II Expression bedingt. Dies könnte über eine TLR2 Inhibition über einen TLR2 Antagonisten wie CU-CPT22 (Cheng, Wang et al. 2012, Ezz, Marey et al. 2019) vor der Infektion erreicht werden.

Im Gegensatz zu den genannten erhöht exprimierten Proteinen TLR2 und MHC II im PBMC-Proteom MAP-resistenter Tiere konnten wir bei persistent MAP-infizierten Tieren nach Infektion mit MAP *in vitro* eine signifikant erhöhte Expression von ITGA2B feststellen. Bis heute wurde noch kein Zusammenhang von CD41 mit bovinen PBMC oder der Paratuberkulose des Rindes beziehungsweise einer differentiellen Empfänglichkeit bei Rindern für die Infektion mit MAP publiziert. Die Expression von ITGA2B, einem Integrin der Untereinheit alpha 2b, auch bekannt als Antigen CD41, wurde bisher stark exprimiert auf der Oberfläche boviner Thrombozyten beschrieben (Simon, Dusinsky et al. 1996). Wir konnten erstmalig eine 2,2-fach stärkere Abundanz von CD41 im Proteom boviner PBMC bei persistent MAP-infizierten im Vergleich zu MAP-resistenten Tieren feststellen. Interessanterweise konnte ITGA2B bereits mit einer differentiellen Abundanz im Proteom von bovinen Monozyten festgestellt werden, welche mit nicht-zytopathischen (ncp) oder zytopathischen (cp) Viren der Bovinen Virusdiarrhoe (*engl.* bovine viral diarrhoea virus, BVDV) *in vitro* infiziert waren (Ammari, McCarthy et al. 2010). Die Pathogenese dieser Krankheit ist komplex, da es mit ncp und cp zwei Virustypen gibt, wobei die fatale Verlaufsform „Mucosal Disease“ durch eine Infektion mit dem cp-Virustyp bei schon zuvor bestehender Infektion der Kuh mit dem ncp-Virustyp entsteht (Ammari, McCarthy et al. 2010). Bei einer Proteom-Analyse *in vitro* infizierter boviner Monozyten mit dem cp-Virustyp konnte interessanterweise eine stärkere Abundanz des Integrins ITGA2B festgestellt

werden, als bei ncp-infizierten Monozyten (Ammari, McCarthy et al. 2010). Der cp-Infektionstyp wird damit in Verbindung gebracht, die Antigenpräsentation gegenüber immunkompetenten T-Zellen zu hemmen, was somit zu unkontrollierter Entzündung und Viruspersistenz im Wirt führt (Ammari, McCarthy et al. 2010). Dieser Virustyp kann in bovinen Monozyten also eine andere Immunreaktion auslösen, welche unter anderem auf eine stärkere Abundanz des Integrins ITGA2B zurückzuführen war (Ammari, McCarthy et al. 2010). Wir konnten in unserer Studie ebenfalls eine erhöhte Abundanz von ITGA2B im Proteom boviner PBMC eines Immunphänotyps zeigen, bei dem eine persistente Infektion mit MAP beobachtet wurde. Bis heute konnten wir nicht feststellen, auf welchen PBMC-Untergruppen ITGA2B exprimiert wird. Möglicherweise könnte das Integrin ITGA2B eine Reaktion zwischen mit MAP infizierten PBMC und anderen Immunzellen vermitteln, welche eine Herunterregulation anderer, zum Beispiel TLR2 und Proteinen des Klasse II Komplexes, bedingt. Integrine sind Membranrezeptoren der extrazellulären Matrix und besitzen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und ermöglichen Zellen, sich mit dem Aktin-Zytoskelett anderer Zellen zu verbinden (Delon and Brown 2007). ITGA2B scheint eine wichtige Funktion bei der Definierung der Immunantwort zu haben, welche darüber entscheidet, ob MAP im Wirt persistiert oder eliminiert werden kann. Die Funktion von CD41 auf PBMC und die Rolle dieses Integrins bei der Pathogenese von MAP und Paratuberkulose gilt es in zukünftigen Studien zu definieren.

In einer weiteren Studie, konnten CD41-Antigene auch in murinen und humanen Lymphknoten nachgewiesen werden (Dai, Uehara et al. 2022). Diese CD41+ Zellen wiesen keine Thrombozyten-Marker auf, was die Annahme bestärkt, dass CD41-Antigene auf anderen Zellen, die aufgrund ihrer Lokalisation in Lymphknoten vermutlich eine Immunfunktion haben, neben Thrombozyten zu finden sind (Dai, Uehara et al. 2022). Diese Studienergebnisse unterstützen unsere Befunde darin, dass sie Hinweise auf das Vorhandensein von CD41 Antigenen auf Subpopulationen von Immunzellen liefern. Wir konnten in unseren immunzytologischen Färbungen CD41 Antigene sowohl auf Thrombozyten, als auch auf kernhaltigen PBMC nachweisen. Weiterführend sollten die Subpopulationen mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen der Lymphozyten identifiziert werden. Über die Kenntnis definierter Subpopulationen auf PBMC könnten Rückschlüsse auf die Funktion dieses exprimierten Integrins bei

Lymphozyten gezogen werden. Außerdem könnten darüber Hypothesen über die pathophysiologische Rolle von CD41 bei der Infektion mit MAP aufgestellt werden. Diese Kenntnisse können dann zu einem verbesserten Verständnis der differentiellen Immunantwort zwischen MAP-resistenten und persistent-MAP infizierten Kühen führen.

Die Tuberkulose des Menschen und die Paratuberkulose beim Rind haben gemeinsam, dass meist eine große Zahl an Individuen mit dem betreffenden Erreger in Kontakt kommt, jedoch nur eine Minderheit dieser klinisch erkrankt (Bloom, Atun et al. 2017). Für das Protein CD41 konnte in Studien zur Untersuchung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten (*engl.* platelet-monocyte aggregates, PMAs) in humanen PBMC und bei murinen Lungen-Infektionsmodellen eine Rolle beschrieben werden, welche sich für den Verlauf der Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* als nicht protektiv erwies (Fox, Kirwan et al. 2018, Wang, Li et al. 2022). Wir konnten eine differentielle Abundanz von CD41 im Proteom boviner PBMC bei MAP-resistenten und persistent MAP-infizierten Tieren feststellen, obwohl sie in derselben Stallumgebung mit demselben Ausmaß an Kontakt zum Erreger lebten, wie MAP-resistente Tiere, die sich nicht infizierten. Dies deutet auf eine Beteiligung des Integrins CD41 bei der wirkungslosen Immunreaktion auf MAP hin, da Tiere mit einer erhöhten Abundanz von CD41 an einer persistenten Infektion litten. Es ist deshalb anzunehmen, dass der immunologische Phänotyp des Wirts, der sich bei MAP-resistenten und persistent MAP-infizierten Tieren unterscheidet, eine Rolle bei der verstärkten Expression von CD41 nach Kontakt mit dem Erreger spielen könnte. Die erhöhte Abundanz dieses Integrins könnte eine bedeutende Rolle bei der Etablierung einer persistenten Infektion des Wirts durch MAP spielen.

Neben dem signifikant stärker abundanten Integrin ITGA2B bei persistent MAP-infizierten Tieren konnten wir auch eine 15,2-fach höhere Abundanz des Proteins KCNMA1 (*engl.* calcium-activated potassium channel subunit alpha-1), auch bekannt unter den Namen KCa1.1, Slo1 oder BK channel, bei persistent MAP-infizierten im Vergleich zu MAP-resistenten Kühen nach Infektion mit MAP *in vitro* feststellen. KCNMA1 ist eine Untereinheit eines Kaliumkanals, der über Membrandepolarisation, Erhöhung des zytosolischen Kalziums oder über die Konzentration des zytosolischen Magnesiums aktiviert wird und daraufhin durch passiven Kalium-Efflux, verursacht durch den elektrochemischen Gradienten, die Repolarisation des Membranpotentials bewirkt (Sancho and Kyle 2021). Die

sogenannte Kalzium-Sensor-Domäne, welche in *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde, befindet sich an der C-terminalen zytosolischen Domäne, welche eine hohe Affinität aufweist Kalzium und weitere Kationen, wie Magnesium, zu binden (Sancho and Kyle 2021).

Obwohl KCNMA1 auf fast allen Körperzellen vorzufinden ist, wurde das Vorkommen dieses Proteins auf Immunzellen lange Zeit bestritten (Ge, Hoa et al. 2014). KCNMA1 wurde bislang nicht auf bovinen PBMC beschrieben (PubMed Recherche vom 22.09.2022). Wir konnten daher zum ersten Mal KCNMA1 im Proteom boviner PBMC nachweisen. Darüber hinaus war es das am stärksten veränderte Protein in PBMC persistent MAP-infizierter Kühe. Dieses interessante Ergebnis konnte mit weiteren Tieren eines anderen MAP-infizierten Bestands mit einer anderen Technik bestätigt werden. Die Funktion von KCNMA1 bei bovinen PBMC ist bislang unbekannt.

Bis heute ist über die Funktion von KCNMA1 auf Immunzellen nichts bekannt, es konnte jedoch eine erhöhte Expression von KCNMA1 in Ösophagus-Plattenepithelkarzinom- Zelllinien (ESCC, esophageal squamous cell carcinoma) beschrieben werden (Ge, Yang et al. 2021). Diese erhöhte Expression konnte die resistenzaufhebende Wirkung von Verapamil, einem Kalziumkanalantagonisten, gegenüber Cisplatin, einem Zytostatikum, auf ESCC verbessern (Ge, Yang et al. 2021). Es konnte gezeigt werden, dass die KCNMA1-Expression in Zelllinien erhöht war, in denen Verapamil einen resistenzaufhebenden Effekt gegenüber Cisplatin zeigte, jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen bei der resistenzaufhebenden Wirkung von Verapamil bis heute ungeklärt (Ge, Yang et al. 2021).

Es konnten noch keine Assoziationen zwischen KCNMA1 und MAP oder anderen Mykobakterien beschrieben werden. Jedoch konnte in einer Studie, die die Wirkung des löslichen Antigens von *Mycobacterium leprae* (MLSA, *Mycobacterium leprae* soluble antigen) auf menschliche Jurkat-T-Zellen untersuchte, festgestellt werden, dass MLSA über das Öffnen von Calcium release activated Calcium-Kanälen (CRAC- Kanäle) einen Anstieg der freien intrazellulären Kalzium-Konzentrationen induzierte, was eine Rolle bei der immunsuppressiven Wirkung von MLSA spielen könnte (Joshi, Khedouci et al. 2006). Das wiederum zeigt, dass Kalzium-aktivierte Ionenkanäle eine Rolle bei der Immunpathogenese bei Mykobakterien spielen.

In einer Studie zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten und CCR7- Effektor-Gedächtnis T-Zellen, isoliert aus Ratten mit kollageninduzierter Arthritis, konnte eine regulatorische Rolle von KCNMA1 im Zusammenhang mit der Progression von rheumatoider Arthritis gezeigt werden (Tanner, Pennington et al. 2019). In Bezug auf unsere Studienergebnisse könnte eine höhere Abundanz von KCNMA1 für die Funktion der Lymphozyten bei Infektion mit MAP bedeuten, dass die vermehrte Expression auf den Zellen auftritt, die mit MAP infiziert sind. Die erhöhte Abundanz könnte des Weiteren für MAP eine günstige Rolle in der Pathogenese spielen, welche bisher noch nicht erklärt werden konnte. Die Repolarisation der Zellmembran, die der Kaliumkanal, von dem KCNMA1 eine Untereinheit bildet, nach Aktivierung auslöst, könnte ebenfalls mit den Pathogenese-Mechanismen von MAP zusammenhängen. Der Kaliumionenausfluss könnte Prozesse aktivieren, welche den Mykobakterien das Persistieren in den infizierten Zellen ermöglichen.

In Untersuchungen zur Rolle von Kalium bei einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* konnte in aus dem Knochenmark stammenden Makrophagen und in einem *in vivo*-Mausmodell gezeigt werden, dass die intraphagosomalen Kaliumspiegel während der Phagosomenreifung in Makrophagen zunehmen (MacGilvary, Kevorkian et al. 2019). Diese interessanten Erkenntnisse können möglicherweise auch für die Infektion mit MAP bedeuten, dass ein Kaliumefflux durch KCNMA1 für MAP vorteilhaft ist, da möglicherweise die Phagosomenreifung durch erhöhten Kaliumefflux beeinträchtigt wird und es MAP gelingt, die phagolysosomalen Prozesse zu unterbinden. Außerdem konnte in dieser Studie von MacGilvary und Kevorkian et al. gezeigt werden, dass Kalium für die Makrophageninfektion zwar nicht limitierend war, dass jedoch eine Störung der Kaliumhomöostase zu einem verringerten bakteriellen Einfluss auf den pH-Wert und die Chlorid-Konzentrationen in der infizierten Umgebung und zu einer abgeschwächten bakteriellen Wirtsbesiedlung führte (MacGilvary, Kevorkian et al. 2019). Diese Erkenntnisse könnten unter anderem die persistente Infektion bei den Tieren erklären, die eine höhere Abundanz von KCNMA1 aufwiesen, da durch ein erhöhtes Vorkommen dieses Proteins der Kaliumefflux erhöht werden kann.

In anderen Studien konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression von KCNMA1 eine Assoziation mit malignen Erkrankungen zeigte (Bloch, Ousingsawat et al. 2007, Khaitan, Sankpal et al. 2009). Diese

Assoziationen von vermehrter KCNMA1-Expression mit erhöhter maligner Zellteilung bei der Prostatakrebs-Zelllinie PC-3 und bei primären sowie metastasierendem Brustkrebsgewebe, lässt möglicherweise darauf schließen, dass KCNMA1 eine Rolle bei der Aktivierung maligner Prozesse spielen könnte (Bloch, Ousingsawat et al. 2007, Khaitan, Sankpal et al. 2009). KCNMA1 wurde als Marker für eine erhöhte Metastasierungs-Wahrscheinlichkeit vorgeschlagen, um bei der Entscheidung über die Durchführung einer Chemotherapie beim Menschen behilflich zu sein (Bloch, Ousingsawat et al. 2007, Khaitan, Sankpal et al. 2009). Da wir in unserer Studie eine signifikant erhöhte Abundanz von KCNMA1 bei PBMC persistent MAP-infizierter Tiere feststellen konnten, könnte dieses Protein in der Zukunft auch als diagnostischer Marker eine Rolle spielen. Da wir in unserer Studie lediglich Tiere eines eindeutigen MAP-Infektionsstatus verwendet haben, sollten zukünftig außerdem PBMC von Tieren auf die KCNMA1-Expression getestet werden, welche in einem anderen Infektionsstadium sind, um zu analysieren, ob sich KCNMA1 als diagnostischer Marker in der Praxis eignen würde.

Da über die physiologische Rolle von KCNMA1 auf bovinen PBMC bis heute noch keine Forschungsergebnisse vorliegen, bedarf es bei diesem Protein noch an Grundlagenforschung, insbesondere darüber, auf welchen PBMC-Untergruppen dieses Protein exprimiert wird und welche Funktion KCNMA1 auf den PBMC der Rinder hat. Die immunologische Bedeutung von KCNMA1 sowie dessen abundante Expression stellen interessante Forschungsansätze für die Zukunft dar.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass in der vorliegenden Studie signifikante Unterschiede in der Immunantwort von PBMC MAP-resistenter und persistent MAP-infizierter Kühe nach Infektion mit MAP *in vitro* festgestellt werden konnten. Die im Vergleich zu MAP-infizierten Tieren signifikant erhöhte Expression von TLR2 und Proteinen des MHC II-Komplexes im PBMC-Proteom MAP-resistenter Kühe können durch eine gesteigerte Antigenerkennung und -präsentation eine wichtige Rolle bei der erfolgreichen Immunantwort gegen MAP spielen. Diese helfen dabei, den Erreger MAP zu bekämpfen. Im Gegensatz dazu konnten wir im PBMC-Proteom persistent MAP-infizierter Kühe erstmalig eine signifikant erhöhte Expression der Proteine ITGA2B und KCNMA1 im Vergleich zu MAP-resistenten Kühen feststellen. ITGA2B ist ein Integrin, das neben der bekannten Expression auf Thrombozyten, auch bereits mit bovinen Monozyten in Verbindung gebracht wurde (Ammari,

McCarthy et al. 2010). Unsere Hypothese ist, dass dieses Integrin eine funktionelle Rolle auf bovinen PBMC hat, die es dem Erreger über Transduktion bestimmter Signale ermöglicht im Wirt zu persistieren. KCNMA1, die Untereinheit eines Kalziumkanals, konnte erstmalig auf bovinen PBMC nachgewiesen werden und könnte über Veränderung der Ionen-Homöostase ebenfalls eine Persistenz des Erregers im Wirt ermöglichen. Die höhere Abundanz der Proteine ITGA2B und KCNMA1 konnten in dieser Studie mit einem persistent MAP-infizierten Immunphänotyp assoziiert werden, was bedeuten kann, dass diese Proteine in einer für den Wirt nachteiligen Immunreaktion eine Rolle spielen und die persistente Infektion des Wirts mit MAP begünstigen. Die zugrundeliegenden Mechanismen, die durch diese vermehrt exprimierten Proteine ausgelöst werden und die für das Überleben von MAP und Voranschreiten der Infektion günstigere Immunreaktion, sind bis heute nicht geklärt und bedürfen weiterführender Forschung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Paratuberkulose ist eine weltweit verbreitete infektiöse, chronische, gastrointestinale Erkrankung des Rindes, die zu Einbußen bei der Tiergesundheit und demzufolge Leistungsminderungen bei landwirtschaftlichen Nutztieren führt. Kühe derselben Rasse innerhalb eines Bestandes, indem für alle Tiere der Kontakt zum Erreger das gleiche Ausmaß beträgt, haben eine divergierende Prädisposition sich mit dem Erreger zu infizieren und klinisch zu erkranken. Um die immunologischen Hintergründe dieser Unterschiede besser verstehen zu können, wurden in unserer Studie PBMC MAP-resistenter und persistent MAP-infizierter Rinder für 48 h mit MAP *in vitro* infiziert und anschließend das Proteom beider Gruppen mittels LC-MS/MS vergleichend analysiert.

Das Proteom boviner PBMC ergab nach Analyse 2631 verschiedene Proteine und zeigte signifikante Unterschiede zwischen MAP-resistenten und persistent MAP-infizierten Kühen. Pathway-Enrichment-Analysen aller signifikant differentiell exprimierter Proteine von MAP-resistenten und persistent MAP-infizierten Rindern ergaben funktionelle Unterschiede, welche eine abweichende, möglicherweise nicht erfolgreiche Immunantwort der persistent MAP-infizierten Rinder auf MAP anzeigte. Die Analyse des Proteoms der PBMC von MAP-resistenten Kühen nach Infektion mit MAP *in vitro* ergab unter anderem eine erhöhte Expression von TLR2 und Proteinen des MHC Klasse II-Komplexes (BoLA-DRA und BoLA-DRB3). TLR2 ist ein Leukozyten-Membranprotein, das eine wichtige Rolle bei der Erkennung von MAP durch das Immunsystem spielt. Eine vermehrte Expression dieses Proteins kann zu einer verbesserten Pathogenerkennung beitragen, welche die Voraussetzung für eine adäquate Immunantwort ist. Da die Antigenpräsentation über MHC II eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung des Erregers von Immunzellen spielt, kann eine vermehrte Expression dieses Proteins einen Teil der vorteilhaften Immunreaktion gegen MAP erklären.

Im Gegensatz dazu konnten wir im Proteom persistent MAP-infizierter Tiere nach Infektion mit MAP *in vitro* eine erhöhte Expression des Integrins ITGA2B (auch bekannt als CD41) und KCNMA1, der Untereinheit eines Kalzium-aktivierten Kalium-Kanals, feststellen. Keines der Proteine wurde bis heute mit der Paratuberkulose des Rindes und einer möglichen divergierenden Immunantwort auf MAP assoziiert.

Diese Erkenntnisse zu den differentiell exprimierten Proteinen können zum weiteren Verständnis der unterschiedlichen Immunantworten von MAP-resistenten und persistent MAP-infizierten Tieren beitragen. Wir konnten bestätigen, dass die erhöhte Abundanz der Proteine TLR2, BoLa-DRA und BoLA-DRB3 offenbar eine wichtige Rolle für eine erfolgreiche Immunantwort zur Beseitigung der MAP-Erreger spielen.

Im Gegensatz dazu konnten wir zum ersten Mal eine signifikant erhöhte Expression der Proteine ITGA2B und KCNMA1 auf bovinen PBMC persistent MAP-infizierter Tiere feststellen, die möglicherweise in Pathogenese und Persistenz von MAP durch eine abweichende Immunantwort involviert sind, welche eine Infektion des Organismus begünstigen könnten.

Um die Zusammenhänge dieser Proteine mit der Pathogenese der Paratuberkulose besser verstehen zu können, sind weitere Studien notwendig, die sich mit der Grundlagenforschung dieser Proteine befassen. Sie bilden dann die Grundlage um die immunologischen Erkenntnisse in der Paratuberkuloseforschung zu erweitern, Zuchtkriterien und potentielle therapeutische Ansatzpunkte zu schaffen und als übergreifendes Ziel die Tiergesundheit zu verbessern.

6 SUMMARY

Paratuberculosis is an infectious, chronic, gastrointestinal disease of cattle with a worldwide distribution, which leads to losses in animal health and consequently reduced performance in farm animals. Cows of same breed within a herd, in which the contact with the pathogen is the same for all animals, have a divergent predisposition to become infected with the pathogen and to suffer from a clinical course of the disease. To better understand the immunological background of these differences, in our study PBMC of MAP-resistant and persistently MAP-infected cattle were infected with MAP *in vitro* for 48 h and then the proteome of both groups was comparatively analyzed by LC-MS/MS.

Bovine peripheral blood derived lymphocyte proteome consisted of 2631 different proteins and showed significant differences between MAP-resistant and persistently MAP-infected cows. Pathway enrichment analyses of all significantly differentially expressed proteins from MAP-resistant and MAP-infected cattle revealed functional differences indicating a divergent, possibly unsuccessful immune response of persistently MAP-infected cattle to MAP.

Analysis of the PBMC proteome from MAP-resistant cattle after co-incubation with viable MAP *in vitro* revealed increased abundance of TLR2 and proteins of the MHC II complex (BoLA-DRA and BoLA-DRB3), among others. TLR2 is a leukocyte membrane protein that plays an important role in the recognition of MAP by the immune system. Increased expression of this protein could contribute to improved pathogen recognition, which this is a prerequisite for an adequate immune response. Since antigen presentation via MHC II plays an important role in the targeting of the pathogen by immune cells, increased expression of this protein could explain part of the beneficial immune response against MAP.

In contrast, we detected increased expression of integrin ITGA2B (also known as CD41) and KCNMA1, the subunit of a calcium-activated potassium channel, in PBMC proteomes of persistently MAP-infected animals after co-incubation with MAP *in vitro*. Neither protein has yet been associated with bovine paratuberculosis and a possible divergent immune response to MAP. These findings on differentially expressed proteins may contribute to further understanding of the differential immune responses of MAP-resistant and persistently MAP-infected animals.

We could confirm that increased abundance of the proteins TLR2, BoLa-DRA, and BoLA-DRB3 play an important role in a successful immune response for elimination of MAP pathogens.

In contrast, we detected for the first time a significantly increased abundance of ITGA2B and KCNMA1 on bovine PBMC that might be involved in the pathogenesis of MAP-persistence through a divergent immune response that is favorable for the infection by the bacteria.

To better understand the correlations of these proteins with the pathogenesis of paratuberculosis, further studies addressing the function of these proteins in bovine PBMC are necessary. They will then form the basis for expanding knowledge in paratuberculosis research, creating breeding criteria and potential therapeutic targets, and improving animal health as an overall goal.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abernethy, D. A., et al. (2006). "The Northern Ireland programme for the control and eradication of *Mycobacterium bovis*." *Vet Microbiol* 112(2-4): 231-237. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.023>

Abrahams, K. A. and G. S. Besra (2021). "Synthesis and recycling of the mycobacterial cell envelope." *Curr Opin Microbiol* 60: 58-65. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.mib.2021.01.012>

Al-Mamun, M. A., et al. (2016). "Modeling of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis dynamics in a dairy herd: An individual based approach." *J Theor Biol* 408: 105-117. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.08.014>

Al-Mamun, M. A., et al. (2017). "Use of an Individual-based Model to Control Transmission Pathways of *Mycobacterium avium* Subsp. paratuberculosis Infection in Cattle Herds." *Sci Rep* 7(1): 11845. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-017-12078-z>

Aly, S. S., et al. (2012). "Cost-effectiveness of diagnostic strategies to identify *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis super-shedder cows in a large dairy herd using antibody enzyme-linked immunosorbent assays, quantitative real-time polymerase chain reaction, and bacterial culture." *J Vet Diagn Invest* 24(5): 821-832. DOI: <http://doi.org/10.1177/1040638712452107>

Ammari, M., et al. (2010). "Analysis of Bovine Viral Diarrhea Viruses-infected monocytes: identification of cytopathic and non-cytopathic biotype differences." *BMC Bioinformatics* 11 Suppl 6(Suppl 6): S9. DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2105-11-s6-s9>

Arsenault, R. J., et al. (2014). "From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis." *Vet Res* 45(1): 54. DOI: <http://doi.org/10.1186/1297-9716-45-54>

Aslam, B., et al. (2017). "Proteomics: Technologies and Their Applications." *J Chromatogr Sci* 55(2): 182-196. DOI: <http://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>

Bannantine, J. P. and L. E. Bermudez (2013). "No holes barred: invasion of the intestinal mucosa by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis." *Infect Immun* 81(11): 3960-3965. DOI: <http://doi.org/10.1128/iai.00575-13>

Baquero, M. M. and B. L. Plattner (2016). "Bovine WC1(+) $\gamma\delta$ T lymphocytes modify monocyte-derived macrophage responses during early *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection." *Vet Immunol Immunopathol* 170: 65-72. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.12.002>

Baquero, M. M. and B. L. Plattner (2017). "Bovine peripheral blood WC1(+) and WC1(neg) $\gamma\delta$ T lymphocytes modulate monocyte-derived macrophage effector functions during in vitro *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection." *Cell Immunol* 315: 34-44. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.01.009>

Barkema, H. W., et al. (2018). "Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection." *Transbound Emerg Dis* 65 Suppl 1: 125-148. DOI: <http://doi.org/10.1111/tbed.12723>

Beard, P. M., et al. (2001). "Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland." *J Clin Microbiol* 39(4): 1517-1521. DOI: <http://doi.org/10.1128/jcm.39.4.1517-1521.2001>

Beaver, A., et al. (2016). "Comparative risk assessment for new cow-level *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infections between 3 dairy production types: Organic, conventional, and conventional-grazing systems." *J Dairy Sci* 99(12): 9885-9899. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2016-11360>

Beaver, A., et al. (2017). "Longitudinal relationship between fecal culture, fecal quantitative PCR, and milk ELISA in *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis-infected cows from low-prevalence dairy herds." *J Dairy Sci* 100(9): 7507-7521. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2017-12928>

Begg, D. J., et al. (2018). "Immunopathological changes and apparent recovery from infection revealed in cattle in an experimental model of Johne's disease using a lyophilised culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis." *Vet Microbiol* 219: 53-62. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.029>

Behl, J. D., et al. (2012). "The major histocompatibility complex in bovines: a review." *ISRN Vet Sci* 2012: 872710. DOI: <http://doi.org/10.5402/2012/872710>

Beinhauerova, M., et al. (2021). "Development of a reference standard for the detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by quantitative PCR." *Sci Rep* 11(1): 11622. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-021-90789-0>

Bekker-Jensen, D. B., et al. (2020). "A Compact Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with FAIMS Interface Improves Proteome Coverage in Short LC Gradients." *Mol Cell Proteomics* 19(4): 716-729. DOI: <http://doi.org/10.1074/mcp.TIR119.001906>

Bermudez, L. E., et al. (2010). "Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination." *Infect Immun* 78(8): 3570-3577. DOI: <http://doi.org/10.1128/iai.01411-09>

Biemans, F., et al. (2021). "Modelling transmission and control of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis within Irish dairy herds with compact spring calving." *Prev Vet Med* 186: 105228. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105228>

Bloch, M., et al. (2007). "KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer." *Oncogene* 26(17): 2525-2534. DOI: <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1210036>

Bloom, B. R., et al. (2017). Tuberculosis. Major Infectious Diseases. K. K. Holmes, S. Bertozzi, B. R. Bloom and P. Jha. Washington (DC), The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.

BMEL (2019). "Tuberkulose der Rinder." <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tiergesundheit/tierseuchen/rindertuberkulose.html>, zuletzt aufgerufen am 20.09.2022.

BMEL (2021). "Meldepflichtige Tierkrankheiten." <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tiergesundheit/tierseuchen/meldepflichtige-tierkrankheiten.html>, zuletzt aufgerufen am 20.09.2022.

Brahma, D., et al. (2020). "Comparison of multiplex and ordinary PCR for diagnosis of paratuberculosis and tuberculosis in blood samples (buffy coat) of cattle and buffaloes." *Iran J Vet Res* 21(1): 52-56. DOI: n.a.

Bridger, P. S., et al. (2011). "Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia." *Vet Immunol Immunopathol* 141(1-2): 1-10. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.01.001>

Buhimschi, I. A. and C. S. Buhimschi (2012). "Proteomics/diagnosis of chorioamnionitis and of relationships with the fetal exposome." *Semin Fetal Neonatal Med* 17(1): 36-45. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.siny.2011.10.002>

Carslake, D., et al. (2011). "Endemic cattle diseases: comparative epidemiology and governance." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1573): 1975-1986. DOI: <http://doi.org/10.1098/rstb.2010.0396>

Cechova, M., et al. (2021). "A Novel Approach to the Viability Determination of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Using Platinum Compounds in Combination With Quantitative PCR." *Front Microbiol* 12: 748337. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2021.748337>

Cheng, K., et al. (2012). "Discovery of small-molecule inhibitors of the TLR1/TLR2 complex." *Angew Chem Int Ed Engl* 51(49): 12246-12249. DOI: <http://doi.org/10.1002/anie.201204910>

Cheng, Z., et al. (2020). "Characteristics and Epidemiological Investigation of Paratuberculosis in Dairy Cattle in Tai'an, China." *Biomed Res Int* 2020: 3896754. DOI: <http://doi.org/10.1155/2020/3896754>

Chiaradia, L., et al. (2017). "Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane." *Sci Rep* 7(1): 12807. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-017-12718-4>

Chiodini, R. J. and J. Hermon-Taylor (1993). "The thermal resistance of Mycobacterium paratuberculosis in raw milk under conditions simulating pasteurization." *J Vet Diagn Invest* 5(4): 629-631. DOI: <http://doi.org/10.1177/104063879300500424>

Cho, Y. S., et al. (2020). "Comparing recombinant MPB70/SahH and native 20-kDa protein for detecting bovine tuberculosis using ELISA." *J Vet Med Sci* 82(11): 1631-1638. DOI: <http://doi.org/10.1292/jvms.20-0422>

Clawin-Rädecker, I., et al. (2021). "The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurisation of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products." *Efsa j* 19(4): e06576. DOI: <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6576>

Cocito, C., et al. (1994). "Paratuberculosis." *Clin Microbiol Rev* 7(3): 328-345. DOI: <http://doi.org/10.1128/cmr.7.3.328>

Colangelo, C. M., et al. (2013). "Review of software tools for design and analysis of large scale MRM proteomic datasets." *Methods* 61(3): 287-298. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.05.004>

Collins, M. T., et al. (2010). "Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: results of a six-year field trial." *J Dairy Sci* 93(4): 1638-1643. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2009-2664>

Conde, C., et al. (2021). "Whole-Genome Analysis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis IS900 Insertions Reveals Strain Type-Specific Modalities." *Front Microbiol* 12: 660002. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660002>

Corneli, S., et al. (2019). "Spectroscopic Characterization of Bovine, Avian and Johnin Purified Protein Derivative (PPD) with High-Throughput Fourier Transform InfraRed-Based Method." *Pathogens* 8(3). DOI: <http://doi.org/10.3390/pathogens8030136>

Corneli, S., et al. (2021). "Early Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Infected Cattle: Use of Experimental Johnins and Innovative Interferon-Gamma Test Interpretative Criteria." *Front Vet Sci* 8: 638890. DOI: <http://doi.org/10.3389/fvets.2021.638890>

Coussens, P. M. (2004). "Model for immune responses to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in cattle." *Infect Immun* 72(6): 3089-3096. DOI: <http://doi.org/10.1128/iai.72.6.3089-3096.2004>

Coussens, P. M., et al. (2004). "Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern." *Infect Immun* 72(3): 1409-1422. DOI: <http://doi.org/10.1128/iai.72.3.1409-1422.2004>

Čurlík, J., et al. (2020). "Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Slovakian wildlife." *Pol J Vet Sci* 23(4): 529-535. DOI: <http://doi.org/10.24425/pjvs.2020.134702>

Daffé, M. and H. Marrakchi (2019). "Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope." *Microbiol Spectr* 7(4). DOI: <http://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018>

Dai, L., et al. (2022). "Characterization of CD41(+) cells in the lymph node." *Front Immunol* 13: 801945. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2022.801945>

Dane, H., et al. (2022). "Optimization of the composition of a solid culture medium for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using factorial design and response surface methodology." *J Appl Microbiol* 132(6): 4252-4265. DOI: <http://doi.org/10.1111/jam.15517>

de Lisle, G. W., et al. (1980). "Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests." *Can J Comp Med* 44(2): 177-182. DOI: n.a.

Degroote, R. L., et al. (2019). "IL8 and PMA Trigger the Regulation of Different Biological Processes in Granulocyte Activation." *Front Immunol* 10: 3064. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03064>

Delon, I. and N. H. Brown (2007). "Integrins and the actin cytoskeleton." *Curr Opin Cell Biol* 19(1): 43-50. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.12.013>

Deutz, A., et al. (2005). "[*Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in wild animal species and cattle in Styria/Austria]." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 118(7-8): 314-320. DOI: n.a.

Dhand, N. K., et al. (2009). "Adsorption of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis to soil particles." *Appl Environ Microbiol* 75(17): 5581-5585. DOI: <http://doi.org/10.1128/aem.00557-09>

Donat, K. (2017). "The Thuringian bovine paratuberculosis control programme-results and experiences." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 130(1-2): 42-49. DOI: n.a.

Echeverr, G., et al. (2020). "Prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in ecuador." *Int J Mycobacteriol* 9(1): 1-6. DOI: http://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_175_19

Eisenberg, S., et al. (2022). "Herd Prevalence Estimation of *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis Burden in the Three Main Dairy Production Regions of Germany (PraeMAP)." *Animals (Basel)* 12(4). DOI: <http://doi.org/10.3390/ani12040447>

Ekundayo, T. C., et al. (2022). "Systematic and meta-analysis of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis related type 1 and type 2 diabetes mellitus." *Sci Rep* 12(1): 4608. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-022-08700-4>

Ekundayo, T. C., et al. (2022). "Systematic review and meta-analysis of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis as environmental trigger of multiple sclerosis." *Mult Scler Relat Disord* 59: 103671. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103671>

Elguezabal, N., et al. (2011). "Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis growth parameters: strain characterization and comparison of

methods." *Appl Environ Microbiol* 77(24): 8615-8624. DOI: <http://doi.org/10.1128/AEM.05818-11>

Ezz, M. A., et al. (2019). "TLR2/4 signaling pathway mediates sperm-induced inflammation in bovine endometrial epithelial cells in vitro." *PLoS One* 14(4): e0214516. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0214516>

Fazli, A. A., et al. (2022). "Multiple-reaction monitoring (MRM) LC-MS/MS quantitation of venlafaxine and its O-desmethyl metabolite for a preclinical pharmacokinetic study in rabbits." *Sci Rep* 12(1): 9322. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-022-13389-6>

Fechner, K., et al. (2019). "Efficacy of dairy on-farm high-temperature, short-time pasteurization of milk on the viability of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis." *J Dairy Sci* 102(12): 11280-11290. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2019-16590>

Feller, M., et al. (2007). "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Infect Dis* 7(9): 607-613. DOI: [http://doi.org/10.1016/s1473-3099\(07\)70211-6](http://doi.org/10.1016/s1473-3099(07)70211-6)

Fernández, B., et al. (2019). "Early IgG2 in calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis." *Vet Immunol Immunopathol* 213: 109886. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109886>

Ferwerda, G., et al. (2007). "Mycobacterium paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2." *J Leukoc Biol* 82(4): 1011-1018. DOI: <http://doi.org/10.1189/jlb.0307147>

Fichtelová, V., et al. (2022). "Effective Control of Johne's Disease in Large Czech Dairy Herds." *J Vet Res* 66(1): 61-67. DOI: <http://doi.org/10.2478/jvetres-2022-0001>

Field, N. L., et al. (2022). "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in cattle - a review in the context of seasonal pasture-based dairy herds." *Ir Vet J* 75(1): 12. DOI: <http://doi.org/10.1186/s13620-022-00217-6>

Field, N. L., et al. (2022). "Characteristics (sensitivity and specificity) of herd-level diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle - A systematic review." *Vet J* 279: 105786. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105786>

FLI (2020). "Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose." <https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-molekulare-pathogenese-imp/referenzlabore/nrl-fuer-paratuberkulose/>, zuletzt aufgerufen am 20.09.2022.

Fodstad, F. H. (1977). "Tuberculin reactions in bulls and boars sensitized with atypical *Mycobacteria* from sawdust." *Acta Vet Scand* 18(3): 374-383. DOI: <http://doi.org/10.1186/bf03548435>

Fox, K. A., et al. (2018). "Platelets Regulate Pulmonary Inflammation and Tissue Destruction in Tuberculosis." *Am J Respir Crit Care Med* 198(2): 245-255. DOI: <http://doi.org/10.1164/rccm.201710-2102OC>

Friedrich, A., et al. (2011). "Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves." *BMC Vet Res* 7: 10. DOI: <http://doi.org/10.1186/1746-6148-7-10>

Galindo-Luján, R., et al. (2021). "Characterization and differentiation of quinoa seed proteomes by label-free mass spectrometry-based shotgun proteomics." *Food Chem* 363: 130250. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130250>

Ganusov, V. V., et al. (2015). "Evaluating contribution of the cellular and humoral immune responses to the control of shedding of *Mycobacterium avium* spp. paratuberculosis in cattle." *Vet Res* 46(1): 62. DOI: <http://doi.org/10.1186/s13567-015-0204-1>

Gavin, W. G., et al. (2018). "Johne's disease: a successful eradication programme in a dairy goat herd." *Vet Rec* 182(17): 483. DOI: <http://doi.org/10.1136/vr.104507>

Ge, L., et al. (2014). "Big Potassium (BK) ion channels in biology, disease and possible targets for cancer immunotherapy." *Int Immunopharmacol* 22(2): 427-443. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.06.040>

Ge, N., et al. (2021). "Upregulation of KCNMA1 facilitates the reversal effect of verapamil on the chemoresistance to cisplatin of esophageal squamous cell carcinoma cells." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 25(4): 1869-1880. DOI: http://doi.org/10.26355/eurrev_202102_25082

Gerrard, Z. E., et al. (2018). "Survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in retail pasteurised milk." *Food Microbiol* 74: 57-63. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.004>

Groenendaal, H. and D. T. Galligan (2003). "Economic consequences of control programs for paratuberculosis in midsize dairy farms in the United States." *J Am Vet Med Assoc* 223(12): 1757-1763. DOI: <http://doi.org/10.2460/javma.2003.223.1757>

Gschaider, S., et al. (2021). "Individual faecal and boot swab sampling to determine John's disease status in small cattle herds." *Vet Ital* 57(1): 19-27. DOI: <http://doi.org/10.12834/VetIt.1389.7584.2>

Gupta, S., et al. (2019). "Vaccine approaches for the 'therapeutic management' of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in domestic livestock." *Vet Q* 39(1): 143-152. DOI: <http://doi.org/10.1080/01652176.2019.1667042>

Harrieder, E. M., et al. (2022). "Current state-of-the-art of separation methods used in LC-MS based metabolomics and lipidomics." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1188: 123069. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123069>

Hermann, C., et al. (2021). "Cell Envelope Proteomics of *Mycobacteria*." *J Proteome Res* 20(1): 94-109. DOI: <http://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00650>

Hernández-Reyes, A. L., et al. (2022). "First identification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in wild ruminants in a zoo in Mexico." *Vet World*. 12(3): 655-661. DOI: <http://doi.org/10.14202/vetworld.2022.655-661>

Honap, S., et al. (2021). "Anti-Mycobacterium paratuberculosis (MAP) therapy for Crohn's disease: an overview and update." *Frontline Gastroenterol* 12(5): 397-403. DOI: <http://doi.org/10.1136/flgastro-2020-101471>

Ibeagha-Awemu, E. M., et al. (2021). "Whole Genome Methylation Analysis Reveals Role of DNA Methylation in Cow's Ileal and Ileal Lymph Node Responses to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Infection." *Front Genet* 12: 797490. DOI: <http://doi.org/10.3389/fgene.2021.797490>

Ibeagha-Awemu, E. M., et al. (2021). "Regionally Distinct Immune and Metabolic Transcriptional Responses in the Bovine Small Intestine and Draining Lymph Nodes During a Subclinical Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Infection." *Front Immunol* 12: 760931. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2021.760931>

Jenkins, A. O., et al. (2018). "Cross reactive immune responses in cattle arising from exposure to Mycobacterium bovis and non-tuberculous mycobacteria." *Prev Vet Med* 152: 16-22. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.02.003>

Joshi, B., et al. (2006). "On cell signalling mechanism of Mycobacterium leprae soluble antigen (MLSA) in Jurkat T cells." *Mol Cell Biochem* 287(1-2): 157-164. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11010-006-9132-8>

Juste, R. A., et al. (2021). "Paratuberculosis vaccination specific and non-specific effects on cattle lifespan." *Vaccine* 39(11): 1631-1641. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.058>

Kaczmarkowska, A., et al. (2022). "The Mycobacterium avium complex - an underestimated threat to humans and animals." *Ann Agric Environ Med* 29(1): 22-27. DOI: <http://doi.org/10.26444/aaem/136398>

Kalis, C. H., et al. (2003). "Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay." *Vet Microbiol* 97(1-2): 73-86. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.07.003>

Keen, E. C., et al. (2021). "Comparative Genomics of Mycobacterium avium Complex Reveals Signatures of Environment-Specific Adaptation and Community Acquisition." *mSystems* 6(5): e0119421. DOI: <http://doi.org/10.1128/mSystems.01194-21>

Khaitan, D., et al. (2009). "Role of KCNMA1 gene in breast cancer invasion and metastasis to brain." *BMC Cancer* 9: 258. DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2407-9-258>

Kirkeby, C., et al. (2018). "Evaluating the impact of transmission mode, calibration level and farmer compliance in simulation models of paratuberculosis in dairy herds." *Sci Rep* 8(1): 9100. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-018-27518-7>

Kleinwort, K. J. H., et al. (2019). "Peripheral blood bovine lymphocytes and MAP show distinctly different proteome changes and immune pathways in host-pathogen interaction." *PeerJ* 7: e8130. DOI: <http://doi.org/10.7717/peerj.8130>

Klopfstein, M., et al. (2021). "Limitations in the implementation of control measures for bovine paratuberculosis in infected Swiss dairy and beef herds." *PLoS One* 16(2): e0245836. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0245836>

Knust, B., et al. (2013). "Evaluation of the effects of a killed whole-cell vaccine against *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in 3 herds of dairy cattle with natural exposure to the organism." *J Am Vet Med Assoc* 242(5): 663-669. DOI: <http://doi.org/10.2460/javma.242.5.663>

Körmendy, B. (1994). "The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds." *Veterinary microbiology* 41(1-2): 117-125. DOI: n.a.

Körmendy, B., et al. (1984). "Cross-reactions between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* strains in complement fixation and gel precipitation tests." *Acta Vet Hung* 32(1-2): 3-7. DOI: n.a.

Kösters, M., et al. (2021). "SMITER-A Python Library for the Simulation of LC-MS/MS Experiments." *Genes (Basel)* 12(3). DOI: <http://doi.org/10.3390/genes12030396>

Krieger, M., et al. (2022). "Within-herd prevalence threshold for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis antibody-positive dairy herds using pooled milk samples: A field study." *J Dairy Sci* 105(1): 585-594. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2021-20401>

Kuenstner, L. and J. T. Kuenstner (2021). "Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in the Food Supply: A Public Health Issue." *Front Public Health* 9: 647448. DOI: <http://doi.org/10.3389/fpubh.2021.647448>

Kulyyassov, A., et al. (2021). "Targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of proteins: Basic principles, applications, and perspectives." *Proteomics* 21(23-24): e2100153. DOI: <http://doi.org/10.1002/pmic.202100153>

Kwong, L. S., et al. (2011). "Characterisation of antibodies to bovine Toll-like receptor (TLR)-2 and cross-reactivity with ovine TLR2." *Vet Immunol Immunopathol* 139(2-4): 313-318. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.10.014>

Lakew, M., et al. (2022). "Utility of the Intradermal Skin Test in a Test-and-Cull Approach to Control Bovine Tuberculosis: A Pilot Study in Ethiopia." *Front Vet Sci* 9: 823365. DOI: <http://doi.org/10.3389/fvets.2022.823365>

Lamont, E. A., et al. (2012). "Infection with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis results in rapid interleukin-1 β release and macrophage transepithelial migration." *Infect Immun* 80(9): 3225-3235. DOI: <http://doi.org/10.1128/iai.06322-11>

Lash, E. and W. M. Mohler (1930). Johne's Disease (paratuberculosis) of Livestock, US Department of Agriculture.

- Levin-Konigsberg, R. and A. R. Mantegazza (2021).** "A guide to measuring phagosomal dynamics." *Febs j* 288(5): 1412-1433. DOI: <http://doi.org/10.1111/febs.15506>
- Li, L., et al. (2005).** "The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35): 12344-12349. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0505662102>
- Liverani, E., et al. (2014).** "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon?" *World J Gastroenterol* 20(36): 13060-13070. DOI: <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.13060>
- Lombard, J. E., et al. (2013).** "Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in United States dairy herds in 2007." *Prev Vet Med* 108(2-3): 234-238. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.08.006>
- López-Pedrouso, M., et al. (2020).** "Current Trends in Proteomic Advances for Food Allergen Analysis." *Biology (Basel)* 9(9). DOI: <http://doi.org/10.3390/biology9090247>
- Łuczaj, W., et al. (2021).** "Analytical approaches to assess metabolic changes in psoriasis." *J Pharm Biomed Anal* 205: 114359. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114359>
- Lutterberg, K., et al. (2018).** "A Functionally Different Immune Phenotype in Cattle Is Associated With Higher Mastitis Incidence." *Front Immunol* 9: 2884. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02884>
- MacGilvary, N. J., et al. (2019).** "Potassium response and homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis* modulates environmental adaptation and is important for host colonization." *PLoS Pathog* 15(2): e1007591. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007591>
- MacMicking, J., et al. (1997).** "Nitric oxide and macrophage function." *Annu Rev Immunol* 15: 323-350. DOI: <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>
- Marek, J. (1910).** "Enteritis paratuberculosa." *Alltrorv Lapok* 33: 504. DOI: n.a.
- Matern, W. M., et al. (2021).** "Genetic Determinants of Intrinsic Antibiotic Tolerance in *Mycobacterium avium*." *Microbiol Spectr* 9(2): e0024621. DOI: <http://doi.org/10.1128/Spectrum.00246-21>
- McAloon, C. G., et al. (2020).** "Individual and herd-level milk ELISA test status for Johne's disease in Ireland after correcting for non-disease-associated variables." *J Dairy Sci* 103(10): 9345-9354. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2019-18018>
- McAloon, C. G., et al. (2019).** "A review of paratuberculosis in dairy herds - Part 2: On-farm control." *Vet J* 246: 54-58. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.009>
- Meyer, A., et al. (2018).** "A probabilistic approach to the interpretation of milk antibody results for diagnosis of Johne's disease in dairy cattle." *Prev Vet Med* 150: 30-37. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.11.016>

Miller, B. H., et al. (2004). "Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection." *Infect Immun* 72(5): 2872-2878. DOI: <http://doi.org/10.1128/iai.72.5.2872-2878.2004>

Mitchell, R. M., et al. (2012). "A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) in experimentally infected calves and cows." *Epidemiol Infect* 140(2): 231-246. DOI: <http://doi.org/10.1017/s0950268811000689>

Momotani, E., et al. (1988). "Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves." *Vet Pathol* 25(2): 131-137. DOI: <http://doi.org/10.1177/030098588802500205>

Monfort, A., et al. (2021). "Simultaneous quantification of 19 analytes in breast milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)." *J Pharm Biomed Anal* 204: 114236. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114236>

Morales-Pablos, M. I., et al. (2020). "Risk factors associated with the seroprevalence of paratuberculosis in sheep flocks in the hot-arid region of Sonora, México." *Trop Anim Health Prod* 52(3): 1357-1363. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11250-019-02139-y>

More, S. J., et al. (2015). "Evaluation of testing strategies to identify infected animals at a single round of testing within dairy herds known to be infected with *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis." *J Dairy Sci* 98(8): 5194-5210. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2014-8211>

Münster, P., et al. (2013). "Distribution of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in a German zoological garden determined by IS900 semi-nested and quantitative real-time PCR." *Vet Microbiol* 163(1-2): 116-123. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.009>

Muskens, J., et al. (2002). "Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds." *Vet Microbiol* 86(3): 269-278. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00006-8](http://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00006-8)

Navarro-Gonzalez, N., et al. (2019). "Longitudinal study of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis fecal shedding patterns and concurrent serological patterns in naturally infected dairy cattle." *J Dairy Sci* 102(10): 9117-9137. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2018-15897>

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2005). "Leitlinien für den Umgang mit Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen vom 17.01.2005." https://tierseucheninfo.niedersachsen.de/startseite/service/tierseuchenbekämpfung_beseitigung_tierischer_nebenprodukte_dezernat_31/paratuberkulose/bekanntmachung-des-bundesministeriums-fuer-verbraucherschutz-ernaehrung-und-landwirtschaft-21662.html, zuletzt aufgerufen am 20.09.2022.

Nielsen, S. S. (2008). "Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infections in cattle." *Vet Microbiol* 132(3-4): 274-282. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.018>

Nielsen, S. S., et al. (2009). "Time to the occurrence of a decline in milk production in cows with various paratuberculosis antibody profiles." *J Dairy Sci* 92(1): 149-155. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2008-1488>

Nielsen, S. S. and N. Toft (2009). "A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe." *Prev Vet Med* 88(1): 1-14. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.07.003>

Nielsen, S. S. and N. Toft (2011). "Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds." *J Dairy Sci* 94(4): 1849-1857. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2010-3817>

Octora, M., et al. (2022). "Challenge of Ziehl-Neelsen stain for Basidiobolomyces diagnosis in Indonesia: A unique case report." *Ann Med Surg (Lond)* 74: 103278. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.103278>

Park, H. E. and H. S. Yoo (2021). "Biomarkers as diagnostic tools for mycobacterial infections in cattle." *Anim Health Res Rev* 22(1): 72-84. DOI: <http://doi.org/10.1017/s1466252320000195>

Park, H. T., et al. (2020). "Epithelial processed Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis induced prolonged Th17 response and suppression of phagocytic maturation in bovine peripheral blood mononuclear cells." *Sci Rep* 10(1): 21048. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-020-78113-8>

Park, H. T., et al. (2021). "Revealing immune responses in the Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-infected THP-1 cells using single cell RNA-sequencing." *PLoS One* 16(7): e0254194. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0254194>

Patton, E. A. (2011). "Paratuberculosis vaccination." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 27(3): 573-580, vi. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.004>

Poupart, P., et al. (1993). "Preparation of a specific RNA probe for detection of Mycobacterium paratuberculosis and diagnosis of Johne's disease." *J Clin Microbiol* 31(6): 1601-1605. DOI: <http://doi.org/10.1128/jcm.31.6.1601-1605.1993>

Pradhan, A. K., et al. (2011). "Molecular epidemiology of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in a longitudinal study of three dairy herds." *J Clin Microbiol* 49(3): 893-901. DOI: <http://doi.org/10.1128/jcm.01107-10>

Pritchard, T. C., et al. (2017). "Phenotypic effects of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in dairy cattle." *J Dairy Sci* 100(1): 679-690. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2016-11323>

Qasem, A., et al. (2021). "Enteropathogenic infections modulate intestinal serotonin transporter (SERT) function by activating Toll-like receptor 2 (TLR-2) in Crohn's disease." *Sci Rep* 11(1): 22624. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-021-02050-3>

Rai, A., et al. (2016). "Dynein Clusters into Lipid Microdomains on Phagosomes to Drive Rapid Transport toward Lysosomes." *Cell* 164(4): 722-734. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.054>

Rasmussen, P., et al. (2021). "Economic losses due to Johne's disease (paratuberculosis) in dairy cattle." *J Dairy Sci.* 104(3): 3123-3143. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2020-19381>

Reichel, M. P., et al. (1999). "Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in cattle and analysis of the antigens involved." *Vet Microbiol* 66(2): 135-150. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00311-3](http://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00311-3)

Robbe-Austerman, S., et al. (2006). "Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations." *Vet Res* 37(4): 553-564. DOI: <http://doi.org/10.1051/vetres:2006018>

Rodríguez-Gil, A., et al. (2017). "The CCR4-NOT complex contributes to repression of Major Histocompatibility Complex class II transcription." *Sci Rep* 7(1): 3547. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-017-03708-7>

Romero, M. P., et al. (2022). "Machine learning classification methods informing the management of inconclusive reactors at bovine tuberculosis surveillance tests in England." *Prev Vet Med* 199: 105565. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105565>

Rosseels, V. and K. Huygen (2008). "Vaccination against paratuberculosis." *Expert Rev Vaccines* 7(6): 817-832. DOI: <http://doi.org/10.1586/14760584.7.6.817>

Rožanova, S., et al. (2021). "Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview." *Methods Mol Biol* 2228: 85-116. DOI: http://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4_8

Ruzafa, N., et al. (2018). "A Proteomics Approach to Identify Candidate Proteins Secreted by Müller Glia that Protect Ganglion Cells in the Retina." *Proteomics* 18(11): e1700321. DOI: <http://doi.org/10.1002/pmic.201700321>

Salem, M., et al. (2013). "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: an insidious problem for the ruminant industry." *Trop Anim Health Prod* 45(2): 351-366. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11250-012-0274-2>

Salem, M. A., et al. (2019). "Investigation of Mycobacterium paratuberculosis in Arabian dromedary camels (*Camelus dromedarius*)." *Vet World* 12(2): 218-223. DOI: <http://doi.org/10.14202/vetworld.2019.218-223>

Sallam, A. M., et al. (2017). "An across-breed genome wide association analysis of susceptibility to paratuberculosis in dairy cattle." *J Dairy Res* 84(1): 61-67. DOI: <http://doi.org/10.1017/s0022029916000807>

Samba-Louaka, A., et al. (2018). "Environmental Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Hosted by Free-Living Amoebae." *Front Cell Infect Microbiol* 8: 28. DOI: <http://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00028>

Sancho, M. and B. D. Kyle (2021). "The Large-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channel: A Big Key Regulator of Cell Physiology." *Front Physiol* 12: 750615. DOI: <http://doi.org/10.3389/fphys.2021.750615>

Savarino, E., et al. (2019). "Antimicrobial treatment with the fixed-dose antibiotic combination RHB-104 for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Crohn's disease: pharmacological and clinical implications." *Expert Opin Biol Ther* 19(2): 79-88. DOI: <http://doi.org/10.1080/14712598.2019.1561852>

Saxegaard, F., et al. (1988). "Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis." *Apmis* 96(6): 497-502. DOI: n.a.

Schwalm, A. K., et al. (2018). "Enhanced sensitivity and fast turnaround time in laboratory diagnosis for bovine paratuberculosis in faecal samples." *J Microbiol Methods* 152: 39-47. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.07.010>

Selby, W., et al. (2007). "Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease." *Gastroenterology* 132(7): 2313-2319. DOI: <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.031>

Serrano, M., et al. (2017). "Tuberculosis Detection in Paratuberculosis Vaccinated Calves: New Alternatives against Interference." *PLoS One* 12(1): e0169735. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0169735>

Sharma, S., et al. (2020). "Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) infection in suspected diarrhoeic buffaloes and cattle reporting at Veterinary University in India." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 73: 101533. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101533>

Shin, J. I., et al. (2020). "Differential Genotyping of *Mycobacterium avium* Complex and Its Implications in Clinical and Environmental Epidemiology." *Microorganisms* 8(1). DOI: <http://doi.org/10.3390/microorganisms8010098>

Simon, M., et al. (1996). "Immunohistochemical reactivity of anti-platelet monoclonal antibodies." *Vet Immunol Immunopathol* 52(4): 377-382. DOI: [http://doi.org/10.1016/0165-2427\(96\)05590-0](http://doi.org/10.1016/0165-2427(96)05590-0)

Slana, I., et al. (2008). "On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination." *Int J Food Microbiol* 128(2): 250-257. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.013>

Spangler, L., et al. (1988). "A prospective evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and agar gel immunodiffusion test (AGID) relative to fecal culture in the diagnosis of clinical and subclinical paratuberculosis in cattle in central Ohio." *Acta Vet Scand Suppl* 84: 243-245. DOI: n.a.

Ssekitoleko, J., et al. (2021). "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Virulence: A Review." *Microorganisms* 9(12). DOI: <http://doi.org/10.3390/microorganisms9122623>

Stabel, J. R. (1998). "Johne's disease: a hidden threat." *J Dairy Sci* 81(1): 283-288. DOI: [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75577-8](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75577-8)

Stabel, J. R. (2008). "Pasteurization of colostrum reduces the incidence of paratuberculosis in neonatal dairy calves." *J Dairy Sci* 91(9): 3600-3606. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2008-1107>

Stabel, J. R. and J. P. Bannantine (2019). "Divergent Antigen-Specific Cellular Immune Responses during Asymptomatic Subclinical and Clinical States of Disease in Cows Naturally Infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis." *Infect Immun* 88(1). DOI: <http://doi.org/10.1128/iai.00650-19>

Suhre, K., et al. (2021). "Genetics meets proteomics: perspectives for large population-based studies." *Nat Rev Genet* 22(1): 19-37. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41576-020-0268-2>

Tang, L., et al. (2022). "Enhancement of sensitivity and quantification quality in the LC-MS/MS measurement of large biomolecules with sum of MRM (SMRM)." *Anal Bioanal Chem* 414(5): 1933-1947. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00216-021-03829-z>

Tanner, M. R., et al. (2019). "KCa1.1 and Kv1.3 channels regulate the interactions between fibroblast-like synoviocytes and T lymphocytes during rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 21(1): 6. DOI: <http://doi.org/10.1186/s13075-018-1783-9>

Tasara, T., et al. (2005). "Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) specific multiplex PCR assay." *Int J Food Microbiol* 104(3): 279-287. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.009>

Thirunavukkarasu, S., et al. (2013). "In vivo and in vitro expression pattern of Toll-like receptors in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection." *Vet Immunol Immunopathol* 156(1-2): 20-31. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.08.008>

Tilocca, B., et al. (2020). "Immunoinformatic-Based Prediction of Candidate Epitopes for the Diagnosis and Control of Paratuberculosis (Johne's Disease)." *Pathogens* 9(9). DOI: <http://doi.org/10.3390/pathogens9090705>

Twort, F. W. and G. Ingram (1912). "A method for isolating and cultivating the mycobacterium enteritidis chronicæ pseudotuberculosisæ bovis, Jöhne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 84(575): 517-542. DOI: n.a.

Underhill, D. M., et al. (1999). "Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25): 14459-14463. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14459>

Vallee, H. and P. Rinjard (1926). "Etudes sur l'enterite paratuberculeuse des bovines." *Res. Gen. Med. Vet* 35(1). DOI: n.a.

Vass-Bognár, B., et al. (2022). "Association between calf rearing technology and farm-level paratuberculosis infection in Hungarian dairy farms." *Prev Vet Med* 207: 105719. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105719>

Viale, M. N., et al. (2016). "The genomics of mycobacteria." *Rev Sci Tech* 35(1): 215-240. DOI: <http://doi.org/10.20506/rst.35.1.2429>

Vilar, A. L., et al. (2015). "Herd-level prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cattle in the State of Paraíba, Northeastern Brazil." *Prev Vet Med* 121(1-2): 49-55. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.06.003>

Waddell, L. A., et al. (2015). "The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis: a systematic review and meta-analyses of the evidence." *Epidemiol Infect* 143(15): 3135-3157. DOI: <http://doi.org/10.1017/s095026881500076x>

Wang, M., et al. (2022). "TLT-1 Promotes Platelet-Monocyte Aggregate Formation to Induce IL-10-Producing B Cells in Tuberculosis." *J Immunol* 208(7): 1642-1651. DOI: <http://doi.org/10.4049/jimmunol.2001218>

Weber, M. F., et al. (2010). "Age at which dairy cattle become *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis faecal culture positive." *Prev Vet Med* 97(1): 29-36. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.004>

Weiss, D. J., et al. (2001). "Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis or *Mycobacterium avium* subsp. *avium*." *Infect Immun* 69(2): 1002-1008. DOI: <http://doi.org/10.1128/iai.69.2.1002-1008.2001>

Werling, D., et al. (2004). "Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists." *Immunology* 111(1): 41-52. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01781.x>

Whitlock, R. H. and C. Buergelt (1996). "Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology)." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12(2): 345-356. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30410-2](http://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30410-2)

Whitlock, R. H., et al. (2000). "ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method." *Vet Microbiol* 77(3-4): 387-398. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00324-2](http://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00324-2)

Whittington, R. A.-O. X., et al. (2019). "Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries." *BMC Vet Res* 15(1): 198. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>

Whittington, R. J., et al. (2005). "Survival of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in dam water and sediment." *Appl Environ Microbiol* 71(9): 5304-5308. DOI: <http://doi.org/10.1128/aem.71.9.5304-5308.2005>

Wichert, A., et al. (2022). "Detection of Low MAP Shedder Prevalence in Large Free-Stall Dairy Herds by Repeated Testing of Environmental Samples and Pooled Milk Samples." *Animals (Basel)* 12(11). DOI: <http://doi.org/10.3390/ani12111343>

Wilkins, M. R., et al. (1996). "From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis." *Biotechnology (N Y)* 14(1): 61-65. DOI: <http://doi.org/10.1038/nbt0196-61>

Wilks, C., et al. (1981). "Isolation of mycobacteria inducing cross-reactions in the complement fixation test for Johne's disease." *Research in veterinary science* 30(3): 323-327. DOI: n.a.

Wood, P. R., et al. (1990). "Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon." *Res Vet Sci* 49(1): 46-49. DOI: n.a.

Wooller, S., et al. (2022). "A combined bioinformatics and LC-MS-based approach for the development and benchmarking of a comprehensive database of Lymnaea CNS proteins." *J Exp Biol* 225(7). DOI: <http://doi.org/10.1242/jeb.243753>

Yokomizo, Y., et al. (1991). "Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle." *J Vet Med Sci* 53(4): 577-584. DOI: <http://doi.org/10.1292/jvms.53.577>

Yoshimura, H. H. and D. Y. Graham (1988). "Nucleic acid hybridization studies of mycobactin-dependent mycobacteria." *J Clin Microbiol* 26(7): 1309-1312. DOI: <http://doi.org/10.1128/jcm.26.7.1309-1312.1988>

Zhang, Z. (2012). "Automated precursor ion exclusion during LC-MS/MS data acquisition for optimal ion identification." *J Am Soc Mass Spectrom* 23(8): 1400-1407. DOI: <http://doi.org/10.1007/s13361-012-0401-3>

Zhou, H., et al. (2007). "Short communication: Identification of allelic variation at the bovine DRA locus by polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism." *J Dairy Sci* 90(4): 1943-1946. DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2006-578>

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen lieben Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zu aller erst möchte ich mich bei meiner Doktormutter, **Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg**, bedanken. Vielen Dank für die tolle Betreuung, auf die ich mich immer verlassen konnte. Auch wenn es mal knapp wurde, hatte ich das Glück, immer schnell Rückmeldungen oder Korrekturen zu bekommen, was mir mein Doktorandendasein um einiges erleichtert hat. Vielen Dank auch für die vielen Denkanstöße und Besprechungen, die mich immer motiviert haben vor allem, wenn Experimente Mal nicht so geklappt haben, wie ich mir das vorgestellt habe.

Ebenfalls bedanke ich mich bei **Frau Dr. Stefanie Hauck**, ohne die die massenspektrometrischen Analysen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären. **Herrn Dr. Adrian Schmalen** und **Frau Dr. Christine von Törne** danke ich für Ihre Unterstützungen und Erklärungen bei der Analyse der Daten.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei **Herrn Prof. Dr. Armin Scholz**, Leiter des Lehr- und Versuchsguts in Oberschleißheim bedanken, dessen Rinder ich als tolle Kontrolldamen verwenden durfte. Auch dafür, dass bis September 2021 unsere Kuh Lillie immer gut am LVG versorgt war. Ebenso danke ich **Herrn Dr. Stefan Nüske** für die Unterstützung im Stall wann immer ich sie benötigt habe und die immer netten aufmunternden Worte. Ein großer Dank gilt auch **Herrn Michael Saller**, **Dr. Helen Schweizer** und **Herrn Richard Bätz**, die mir bei all meinen Fragen schnell weitergeholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen tollen ehemaligen und aktuellen Arbeitskollegen, die zu Freundinnen und Freunden geworden sind und durch die ich fast jeden Tag mit einem Grinsen und / oder einer „Geschichte“ aus der Arbeit gekommen bin - auch wenn es Mal stressig war. Unsere Nachmittagsbesprechungen, die Mittagspausen unter dem Sonnenschirm, gemeinsame Labortage die Mal mehr und Mal weniger organisiert waren und fantastische Teamarbeit bei Probenentnahmen im Rinderstall werde ich so

vermissen. Vielen Dank ihr Lieben: **Anne Hoffmann, Marie-Christin Schilloks, Felix Gard, Dr. Claudia Barfüßer, Dr. Lea Lorenz, Dr. Roxane Degroote, Dr. Margarete Swadzba, Dr. Kristina Kleinwort, Heidi Duda, Amelie Fleischer und Ronja Söth.** Vielen Dank auch unseren ehemaligen und aktuellen TAs **Sieglinde Hirmer, Barbara Amann, Stefanie Püls, Lydia Hoffmann und Hanna Chepliaka,** die immer gerne bereit waren zu helfen, wenn es darum ging unauffindbare Antikörper zu finden, Protokolle durchzusprechen, wunderschöne Immunzytos zu fotografieren, schnell noch Puffer anzurühren, Proteinmengen zu bestimmen oder auch mal einen Blot von der To-Do Liste zu erledigen.

Zum Schluss möchte ich mich mit meinem ganzen Herzen bei meinen lieben Freunden und Freundinnen und meiner Familie bedanken, die die meisten meiner Schachtelsätze entzerrt haben und Kommata an die hoffentlich richtige Stelle gesetzt haben. Mein ganz besonderer Dank gilt **Pascal Frech** - danke, dass Du immer Verständnis und liebe Worte hattest, danke **Annika Seifert**, dass Du immer für mich da warst, obwohl oder gerade weil Du selber an deiner Dissertation geschrieben hast, danke liebe **Viola Haas**, dass Du immer ein Ohr und für mich hattest und mir das Lachen nicht vergehen konnte. Zuletzt tausend Dank **meinen Eltern**, die immer hinter mir standen und für mich da waren.