

Charakterisierung des Serumproteoms von
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*-
infizierten Milchkühen

von Heidi Clarissa Duda

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

Charakterisierung des Serumproteoms von
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*-
infizierten Milchkühen

von Heidi Clarissa Duda
aus München

München 2025

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

Korreferenten: Prof. Dr. Florian M. Trefz
Univ.-Prof. Dr. Andreas F. Parzefall

Tag der Promotion: 08. Februar 2025

*Für
meine Eltern,
meine Großeltern
und Michael*

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATUR	3
2.1	Paratuberkulose.....	3
2.1.1	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	3
2.1.1.1	Taxonomie und Morphologie	3
2.1.1.2	Aufbau der Zellwand und Tenazität	4
2.1.2	Pathogenese und Immunreaktion	5
2.1.3	Krankheitsverlauf	7
2.1.4	Genetische Prädisposition	9
2.1.5	Diagnostik.....	10
2.1.5.1	Direkte Nachweisverfahren.....	11
2.1.5.1.1	Kulturelle Anzucht	11
2.1.5.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	12
2.1.5.2	Indirekte Nachweisverfahren	13
2.1.5.2.1	Serologische Nachweisverfahren	13
2.1.5.2.2	Nachweis zellgebundener Immunantwort.....	15
2.1.6	Bekämpfungsmaßnahmen.....	16
2.1.6.1	Hygienemanagement	17
2.1.6.2	Merzen positiv getesteter Rinder	18
2.1.6.3	Vakzination	19
2.1.7	Wirtschaftliche Bedeutung	20
2.1.8	Zoonotisches Potential	20
2.2	Bedeutung von Serum für die Diagnostik und Forschung	24
2.3	Differentielle Proteomanalyse	25
2.4	Serumproteomik	27
2.5	Biomarker in mykobakteriellen Infektionen.....	28
2.5.1	Tuberkulose.....	29
2.5.2	Lepra	30
2.5.3	Paratuberkulose.....	31
3	PUBLIKATION.....	34

INHALTSVERZEICHNIS

4	DISKUSSION	56
5	ZUSAMMENFASSUNG	82
6	SUMMARY	84
7	LITERATURVERZEICHNIS	86
	DANKSAGUNG	117

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ACN	Acetonitril
ACTG1	<i>engl.</i> actin, gamma 1
ADA2	Adenosin-Desaminase 2
AGC	<i>engl.</i> automatic gain control
ATP	Adenosintriphosphat
B type	Bisontyp (<i>engl.</i> bison-type)
BCG	bacillus Calmette-Guérin
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BOLA-DRA	<i>engl.</i> major histocompatibility complex, class II, DR alpha
C type	Rindertyp (<i>engl.</i> cattle-type)
CCL1	<i>engl.</i> C-C motif chemokine ligand 1
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
CFH	Komplementfaktor H (<i>engl.</i> complement factor H)
CLIP	Klasse II invariantes Kettenpeptid (<i>engl.</i> class II invariant chain peptide)
CRISP3	<i>engl.</i> cystein-rich secretory protein 3
CTSC	Cathepsin C
CTSS	Cathepsin S
CXCL10	<i>engl.</i> C-X-C motif chemokine ligand 10
DDA	Datenabhängige Erfassung (<i>engl.</i> data-dependent acquisition)
DIA	Datenunabhängige Erfassung (<i>engl.</i> data-independent acquisition)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
ESI	Elektrospray-Ionisation

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

et al.	und andere (<i>lat.</i> et alii)
FCGR	Fc-gamma-Rezeptor
FCGR1	<i>engl.</i> Fc receptor, IgG, high affinity I
FCGR1A	<i>engl.</i> Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor
FCGR2B	<i>engl.</i> Fc gamma receptor IIb
FCGR3B	<i>engl.</i> Fc gamma receptor IIIb
FCR	<i>engl.</i> false discovery rate
FETUB	Fetuin B
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEYM	Herrold's Egg Yolk Medium
HPLC	Hochflüssigkeitschromatographie <i>engl.</i> high performance liquid chromatography
IFN- γ	Interferon gamma
IGFBP2	<i>engl.</i> insulin like growth factor binding protein 2
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgY	Immunglobulin Y
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-2	Interleukin-2
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KNG1	Kininogen 1
lat.	lateinisch
LBP	<i>engl.</i> lipopolysaccharide-binding protein
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>engl.</i> liquid chromatography)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (<i>engl.</i> liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry)
LRG1	<i>engl.</i> leucine-rich alpha-2-glycoprotein
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>engl.</i> matrix-assistent laser desorption/ionization, MALDI)
MALDI-TOF	<i>engl.</i> matrix-assistent laser desorption/ionization-time of flight
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
Mb	<i>Mycobacterium bovis</i>
MHC-Klasse-II	Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II (<i>engl.</i> major histocompatibility complex class II)
min	Minuten
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunden
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS1	erste Messung
MS2	zweite Messung
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NETs	<i>engl.</i> neutrophil extracellular traps
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
ORM1	<i>engl.</i> alpha-1 acid glycoprotein
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>engl.</i> pathogen-associated molecular patterns)
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen (<i>engl.</i> peripheral blood mononuclear cells)
PBS-T	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween (<i>engl.</i> phosphate buffered saline with Tween)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PEA	<i>engl.</i> proximity extension assay
PPD	aufgereinigtes Proteinderivat (<i>engl.</i> purified protein derivate)
PRDX6	<i>engl.</i> peroxiredoxin 6
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP-T	Polyvinylpyrrolidon-Tween
qPCR	quantitative PCR
QTLRs	<i>engl.</i> quantitative trait loci regions
QTLs	<i>engl.</i> quantitative trait loci
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> ribonucleic acid)
ROS	reactive Sauerstoffspezies (<i>engl.</i> reactive oxygen species)
RSLC	<i>engl.</i> rapid separation liquid chromatography
S type	Schafttyp (<i>engl.</i> sheep-type)
SDS-PAGE	<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SELL	L-selectin
SERPINC1	Antithrombin III
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (<i>engl.</i> single nucleotide polymorphisms)
subsp.	<i>lat.</i> subspecies
Th1	Typ 1 T-Helferzelle
Th2	Typ 2 T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TLR1	Toll-like-Rezeptor 1
TLR2	Toll-like-Rezeptor 2
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TOF	<i>engl.</i> time of flight
VEGF	<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor
WOAH	Weltorganisation für Tiergesundheit (<i>engl.</i> World Organisation of Animal Health)

1 EINLEITUNG

Die Paratuberkulose, auch Johnesche Krankheit genannt, ist eine infektiöse, chronische, granulomatöse Enteritis des Rindes sowie weiterer Haus- und Wildwiederkäuer (Johnes and Frothingham 1895; Ottardi, Lechner et al. 2024). Der verursachende Erreger *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) zeichnet sich durch eine sehr hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und antibakteriellen Therapien aus, wodurch sich dessen Eradikation als besonders herausfordernd gestaltet (Vass-Bognar, Khol et al. 2024). Die Erkrankung ist durch eine lange Inkubationszeit von mehreren Jahren gekennzeichnet, bis sich klinische Symptome wie wässriger Durchfall und Kachexie manifestieren und letztendlich mangels therapeutischer Behandlungsmöglichkeiten zum Tod führt (Whitlock and Buergelt 1996). Allerdings erreichen nur wenige Tiere „die Spitze des Eisbergs“, gekennzeichnet durch eine klinische Manifestation, wohingegen eine Infektion bei den meisten Rindern nicht sichtbar ist, aber ein hohes Risiko birgt (Whitlock and Buergelt 1996). Denn bereits subklinisch erkrankte Rinder scheiden den Erreger mit Kot und Milch aus und stellen damit eine erhebliche Gefahr für die Transmission des Erregers auf gesunde Tiere dar, da sie durch derzeit zur Verfügung stehende diagnostische Nachweisverfahren aufgrund intermittierender Erregerausscheidung und fehlender Detektion spezifischer Antikörper nicht zuverlässig detektiert werden können (Tuberquia-Lopez, Correa-Valencia et al. 2022). Eine Infektion mit MAP führt zu einem hohen wirtschaftlichen Schaden, der sich aus reduzierter Milchleistung, vorzeitiger Schlachtung und vermindertem Schlachtwert ergibt (Griss, Knific et al. 2024). Zudem wird ein zoonotisches Potential des Erregers im Hinblick auf eine Assoziation mit humanen Autoimmunerkrankungen, vor allem Morbus Crohn, seit Jahrzehnten diskutiert, konnte bis dato allerdings nicht bewiesen werden (Agrawal, Borody et al. 2024). Dennoch wird ein Eintrag von lebenden MAPs in die Lebensmittelkette als eine mögliche Gefahr für die menschliche Gesundheit dargestellt (Agrawal, Borody et al. 2024). Bekämpfungsmaßnahmen, die sich aus Hygienemanagementverfahren, Merzen positiv getesteter Rinder und Vakzination zusammensetzen, können zwar zu einer Reduktion der Prävalenz innerhalb einer Herde führen, resultieren aber nur selten in einer Eradikation des Erregers (Weber, Kelton et al. 2024). Daher ist es von erheblicher Bedeutung, neue Eradikationsmaßnahmen zu erörtern und bestehende weiterzuentwickeln, wobei

letzteres nur durch eine Verbesserung der Sensitivität und Spezifität von diagnostischen Nachweisverfahren ermöglicht werden kann (Alonso-Hearn, Ballesteros et al. 2023). Folglich war es daher ein Teilziel dieser Doktorarbeit, potenzielle Biomarker für den Nachweis der Paratuberkulose im Serum für eine einfache, schnelle, kostengünstige und vor allem zuverlässige Detektion von MAP-infizierten Rinder zu identifizieren. Darüber hinaus ist für eine Weiterentwicklung von effektiven Bekämpfungsmaßnahmen eine grundlegende Aufklärung der komplexen Wirt-Pathogen-Interaktionen essentiell (Badia-Bringue, Canive et al. 2023), weshalb ein weiteres Ziel dieser Dissertation darin bestand, durch Veränderungen im Serumproteom neue Erkenntnisse über die Immunantwort des Wirts auf eine Infektion mit MAP zu gewinnen.

2 LITERATUR

2.1 Paratuberkulose

2.1.1 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

2.1.1.1 Taxonomie und Morphologie

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose beim Wiederkäuer und gehört zur Familie der *Mycobacteriaceae* (Twort, Ingram et al. 1912). MAP ist ein grampositives, unbewegliches, aerobes, säurefestes Stäbchenbakterium (Ssekitoleko, Ojok et al. 2021). Das obligat pathogene Bakterium ist nicht dem Tuberkulosekomplex zugehörig, wozu *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium bovis* – die Erreger der Tuberkulose des Menschen und des Rindes – zählen, sondern wird aufgrund seiner genetischen Eigenschaften dem *Mycobacterium avium*-Komplex zugeordnet (Hodgeman, Mann et al. 2023; Silva-Pereira, Soler-Camargo et al. 2024). MAP grenzt sich durch ein sehr langsames Wachstum mit einer Generationszeit von ein bis mehrere Tage von anderen Vertretern des *Mycobacterium avium*-Komplexes ab (Elguezabal, Bastida et al. 2011). Zudem ist das Wachstum von MAP von einer Zugabe des Eisenchelatbildners Mykobaktin abhängig, wodurch es von anderen Mykobakterien, die zu dessen Synthese selbstständig fähig sind, differenziert werden kann (Lambrecht and Collins 1992).

Phylogenetisch kann MAP in zwei große Gruppen unterteilt werden: den Schaftyp (*engl. sheep-type*, S type) mit Typ I und Typ III und den Rindertyp (*engl. cattle-type*, C type) mit Typ II, dem auch der Bisontyp (*engl. bison-type*, B type) untergliedert ist (Ssekitoleko, Ojok et al. 2021). Obwohl der Schaftyp hauptsächlich aus Schafen und der Rindertyp aus Rindern isoliert wird, weisen beide Typen keine Wirtsspezifität auf (Bryant, Thibault et al. 2016; Rasper-Hossinger, Biggel et al. 2023). Dennoch wird die bovine Paratuberkulose vor allem durch MAPs vom C type ausgelöst, kann aber auch selten durch eine Infektion mit dem S type hervorgerufen werden (Rasper-Hossinger, Biggel et al. 2023). Neben ihrer Wirtsassoziationen unterscheiden sich die Typen auch in ihrem Wachstum und ihren Virulenzeigenschaften (Whittington, Marsh et al. 2011; Stevenson 2015; Wibberg, Price-Carter et al. 2020).

2.1.1.2 Aufbau der Zellwand und Tenazität

MAPs weisen außerhalb des Wirts eine hohe Tenazität auf und sind sehr robust gegenüber Umwelteinflüssen (Field, McAloon et al. 2022). Entscheidend für die herausragende Überlebensfähigkeit ist die Beschaffenheit der Zellwand des Erregers (Batt, Burke et al. 2020). Die Zellhülle von Mykobakterien besteht aus drei großen Schichten: beginnend von innen mit der Plasmamembran, gefolgt von der Zellwand, der nach außen hin die Kapsel anliegt (Daffe and Marrakchi 2019). Die Plasmamembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die von Phospholipiden und Proteinen gebildet wird (Daffe and Marrakchi 2019). Das Skelett der Zellwand ist aus Peptidoglykanen aufgebaut, an denen Arabinogalaktane gebunden sind (Daffe and Marrakchi 2019). In der sich anschließenden Mykomembran ist Mykolsäure in deren inneren Blatt kovalent an die Arabinogalaktane gebunden (Dulberger, Rubin et al. 2020). Das äußere Blatt der Mykomembran besteht hauptsächlich aus Mykolsäuren, die frei oder an Trehalose gebunden als Trehalose-Mykolate vorliegen (Dulberger, Rubin et al. 2020). Im Gegensatz zu *Mycobacterium avium*-Isolaten produziert MAP anstelle von Glykopeptidolipiden, die in der Kapsel enthalten sind, Lipopeptide, an denen keine Zuckermoleküle gebunden sind (Bannantine, Etienne et al. 2017; Bay, Begg et al. 2021). Bei *Mycobacterium tuberculosis* besteht diese Kapsel hauptsächlich aus Polysacchariden (Daffe and Marrakchi 2019). Die Zellhülle von Mykobakterien weist einen sehr hohen Anteil an Lipiden (40 %) auf und ist verantwortlich für deren Säurefestigkeit, hydrophobe Eigenschaften, hohe Resistenz gegenüber Chemikalien, unter anderem Antibiotika, und Barriere gegenüber dem Immunsystem des Wirts (Daffe and Marrakchi 2019; Batt, Burke et al. 2020).

Diese Beschaffenheit der Zellwand ermöglicht es den MAPs, über mehrere Monate in fäkalen Exkrementen und im Boden zu überleben (Whittington Richard, Marshall et al. 2004). Ein Aussetzen der Bakterien gegenüber der UV-Strahlung der Sonne führt zwar nicht zu einem sofortigen Absterben der Erreger, reduziert dessen Überlebenszeit allerdings bei MAPs vom C type um das Neunfache und vom S type um das 20-fache (Eppleston, Begg et al. 2014). MAP kann auch die Fermentation in Biogasanlagen überleben, was eine potenzielle Gefahr für einen Eintrag des Erregers in die Umwelt darstellt, da Gärreste oft als Düngemittel verwendet werden (Mazzone, Corneli et al. 2018). Ein besonders kritischer Punkt ist das potenzielle Überleben des Pasteurierungsprozesses von MAP, da dieser Prozess nicht nur

auf Rinderbetrieben eine orale Transmission von MAP auf Kälber verhindern soll, sondern vor allem auch für uns Menschen ein sicheres Lebensmittel erzeugen soll (Fechner, Dreymann et al. 2019; Knific, Ocepek et al. 2022). Da ein mögliches Gesundheitsrisiko durch MAP diskutiert wird, welches bisweilen allerdings noch nicht bestätigt werden konnte, ist eine Elimination von lebenden MAPs neben anderen pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln erstrebenswert (Knific, Ocepek et al. 2022; Agrawal, Borody et al. 2024).

2.1.2 Pathogenese und Immunreaktion

Die Paratuberkulose spielt vor allem bei domestizierten Wiederkäuern wie Rind, Schaf, Ziege und Büffel eine bedeutende Rolle (Fecteau 2018; Martucciello, Galletti et al. 2021; Beinhauerova and Slana 2023), kann aber auch Wildwiederkäuer wie Antilopen, Giraffen und Gnus betreffen (Hernandez-Reyes, Chavez-Gris et al. 2022). Vor allem Kälber bis zu einem Alter von sechs Monaten sind besonders anfällig für eine Infektion (Windsor and Whittington 2010). Die Übertragung von MAP erfolgt hauptsächlich durch eine fäkal-orale Transmission des Erregers (Field, McAloon et al. 2022), wobei mit MAP kontaminierte Milch oder Kolostrum die Hauptinfektionsquellen darstellen (Stabel, Bradner et al. 2014). Kälber können sich allerdings auch intrauterin oder aerogen über erregerehaltigen Stallstaub infizieren (Whittington and Windsor 2009; Eisenberg, Chuchaisangrat et al. 2013). Im Dünndarm wird der Erreger über die in den Peyer'schen Platten angesiedelten M-Zellen aufgenommen und in der Submukosa des Dünndarms freigesetzt (Momotani, Whipple et al. 1988; Alfituri, Blake et al. 2024). Dort werden MAPs in Makrophagen durch Phagozytose aufgenommen, in denen sie intrazellulär persistieren (Coussens 2001). In diesem Stadium der Infektion kann eine Elimination des Erregers grundsätzlich erfolgen (Sweeney 2011; Begg, Plain et al. 2018). Konnte der Erreger nicht beseitigt werden, ist der Wirt in der frühen Phase der Infektion dennoch dazu in der Lage, die Infektion durch eine Begrenzung der Proliferation von MAP innerhalb des Darms und angrenzenden Lymphgewebes zu kontrollieren (Stabel and Bannantine 2019). Die Mechanismen, die das intrazelluläre Überleben von MAP ermöglichen, sind noch nicht vollständig erforscht, man geht aber davon aus, dass MAP die Reifung und Ansäuerung des Phagosoms verhindert und eine Verschmelzung zum Phagolysosom blockiert (Hostetter, Steadham et al. 2003), wie es bereits für *Mycobacterium tuberculosis*

beschrieben wurde (Clemens and Horwitz 1995; Su, Weng et al. 2024). Die erste Immunantwort wird durch Th1-Lymphozyten vermittelt, die pro-inflammatorische Zytokine wie Interferon gamma (IFN- γ), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interleukin (IL)-2 produzieren und damit eine Aktivierung von Makrophagen bewirken (Coussens 2001). Durch die Rekrutierung von weiteren Makrophagen und Lymphozyten zum Infektionsort kommt es zu einer Ausprägung von Granulomen (Sweeney 2011). In diesem Stadium der Erkrankung, das oftmals mehrere Jahre andauert, zeigen die Tiere keine klinischen Symptome (Stabel and Bannantine 2019). Im progressiven Verlauf der Infektion kommt es schließlich bei einem Teil der Tiere zu einem Übergang von einer Th1-vermittelten zu einer Th2-vermittelten Immunantwort (Stabel and Bannantine 2019). Die Zusammenhänge des Übergangs sind bis dato noch unklar, wobei diskutiert wird, ob eine vermehrte Produktion von IL-10 eine Rolle spielen könnte, da dieses Zytokin die Th1-vermittelte Immunantwort inhibiert und eine Antikörperbildung stimuliert (de Almeida, Colvin et al. 2008; Stabel and Bannantine 2019). Die Phase, in der die Th2-medierte Immunantwort dominiert, ist von einer humoralen Immunantwort mit Bildung von MAP-spezifischen Antikörpern geprägt (Begg, Plain et al. 2018). Diese nun dominante humorale Immunantwort ist aber im Gegensatz zur Th1-Immunantwort nicht protektiv, was die Streuung des Erregers mit einer Ausbreitung der Infektion zur Folge hat, wodurch es zu einer Manifestation der klinischen Erkrankung mit massivem fäkalem Ausscheiden von MAP kommt (Sweeney 2011).

Dennoch geben eine differentielle Ausprägung von klinischen Symptomen und ein unterschiedliches Ausmaß an Erregerausscheidung Hinweise darauf, dass nicht alle Rinder im Rahmen einer Infektion mit MAP diese klassische Abfolge an Immunreaktionen aufzeigen (Magombedze, Eda et al. 2016; Kravitz, Pelzer et al. 2021). Dahingehend wurde unter anderem bereits bei experimentell mit MAP infizierten Kälbern gezeigt, dass eine niedrigere Produktion von IFN- γ mit histopathologischen Läsionen sowie kontinuierlichem Ausscheiden von MAP in Zusammenhang steht, während eine höhere Produktion von IFN- γ mit einer Elimination des Erregers assoziiert ist (Begg, Plain et al. 2018). Des Weiteren wird eine hohe Expression der immunhemmenden Rezeptoren „T cell immunoglobulin mucin Protein-3“ und „Programmed death receptor 1“ auf bovinen peripheren mononukleären Blutzellen (*engl.* peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) mit einem fortgeschrittenen klinischen Stadium der Paratuberkulose in Zusammenhang

gebracht (Sharma, Sharma et al. 2024). Allerdings sind die komplexen Wirt-Pathogen-Interaktionen, die zur Elimination von MAP beziehungsweise zur klinischen Manifestation der Paratuberkulose führen, bis dato unzureichend erforscht und erfordern weitere Aufklärung (Kravitz, Pelzer et al. 2021; Korbonits, Kleinwort et al. 2022).

2.1.3 Krankheitsverlauf

Whitlock und Buergelt haben 1996 den Krankheitsverlauf der Paratuberkulose in vier Phasen gegliedert: stille Infektion, subklinische Erkrankung, klinische Erkrankung und progressive klinische Erkrankung (Whitlock and Buergelt 1996).

Infizierte Tiere, die dem Stadium der stillen Infektion zugeordnet werden, zeigen keinerlei klinische Symptome und können aufgrund fehlender Antikörperbildung und zellvermittelten Immunität nicht durch gängige Diagnostikmethoden detektiert werden (Whitlock and Buergelt 1996). In dieser frühen Phase der Infektion ist es möglich, dass infizierte Tiere womöglich durch eine transiente Infektion oder durch passives Ausscheiden, bei dem der Erreger oral aufgenommen wird ohne den Wirt zu infizieren, MAP mit dem Kot ausscheiden (Begg, Plain et al. 2018).

Im weiteren Krankheitsverlauf folgt die Phase der subklinischen Erkrankung, in der die Tiere zwar noch keine klinischen Anzeichen einer Infektion entwickelt haben, aber durchaus bereits eine zellvermittelte Immunität oder MAP-spezifische Antikörper gebildet haben (Whitlock and Buergelt 1996). Subklinisch infizierte Rinder stellen das höchste Risiko einer Weiterverbreitung von MAP dar, da sie bereits in diesem Stadium, teils intermittierend, MAP über Kot und Milch ausscheiden können, aber mangels geeigneter Nachweisverfahren nicht zuverlässig detektiert werden können (Buergelt and Williams 2004; Field, McAloon et al. 2022). Infizierte Tiere befinden sich aufgrund einer Inkubationszeit von zwei bis zehn Jahren sehr lange in diesem Stadium der Paratuberkulose (Whitlock and Buergelt 1996).

Nach Ablauf der Inkubationszeit beginnt das Stadium der klinischen Erkrankung mit ersten klinischen Symptomen gekennzeichnet durch anfangs intermittierenden später kontinuierlichen Durchfall, Gewichtsverlust, der in einem Monat über 10 % des Körpergewichts betragen kann, und veränderten Blutparametern wie eine Reduktion des Totalproteins (Whitlock and Buergelt 1996; Begg, de Silva et al. 2010; Donat, Erhardt et al. 2014). In dieser Phase können die meisten erkrankten

Tiere mittels gängiger Nachweisverfahren wie Kotuntersuchungen und serologischer Diagnostik detektiert werden (Tiwari, VanLeeuwen et al. 2006).

In den darauffolgenden drei bis vier Monaten ist die klinische Erkrankung bereits so weit fortgeschritten, dass die Tiere das Endstadium – die fortgeschrittene klinische Erkrankung – erreicht haben (Whitlock and Buergelt 1996). Die Tiere sind kachektisch und lethargisch, und zeigen massiv wässrige Diarrhoe und durch Hypoproteinämie entstehende intermandibuläre Ödeme, bis sie letztendlich am Ausmaß der Erkrankung verenden (Whitlock and Buergelt 1996). Nicht viele Tiere erreichen dieses Stadium der Erkrankung, da die meisten bereits vorher aufgrund von reduzierter Milchleistung, Infertilität und Gewichtsverlust geschlachtet werden (Whitlock and Buergelt 1996; Griss, Knific et al. 2024). Diese wenigen Tiere, die das klinische Stadium der Paratuberkulose erreicht haben, bilden jedoch sprichwörtlich gesehen nur die „Spitze des Eisbergs“, da diese, wirklich sichtbaren Fälle der Erkrankung nur einen kleinen Teil des tatsächlichen Ausmaßes darstellen (Whitlock and Buergelt 1996). Für jedes Rind im Endstadium der Paratuberkulose – sichtbar als die „Spitze des Eisbergs“ – befinden sich unter der Oberfläche, dem nicht sichtbaren Ausmaß der Erkrankung, vier bis acht Rinder im subklinischen Stadium, von denen nur 15 % bis 25 % detektiert werden können, und zehn bis 14 Rinder in der Phase der stillen Infektion (Whitlock and Buergelt 1996).

Dennoch durchlaufen nicht alle Tiere diesen beschriebenen, klassischen Krankheitsverlauf der Paratuberkulose (Whittington and Sergeant 2001; Koets, Eda et al. 2015; Begg, Plain et al. 2018; Kravitz, Pelzer et al. 2021). Nur ein Teil der Rinder infiziert sich überhaupt nach einer Exposition mit MAP (Begg, Plain et al. 2018). Von denjenigen, die sich infiziert haben, zeigen lediglich 10 % im progressiven Verlauf der Paratuberkulose klinische Symptome, wohingegen 90 % asymptomatisch bleiben (Kravitz, Pelzer et al. 2021). Zudem kann der Erreger nach einer Infektion auch wieder erfolgreich eliminiert werden (Begg, Plain et al. 2018). Die den differentiellen Krankheitsverläufen nach einer Exposition mit MAP zugrundeliegenden Prozesse in der Immunantwort des Rindes sind jedoch weitgehend ungeklärt, weshalb umfassende Untersuchungen zu den Wirt-Pathogen-Interaktionen in Bezug auf verschiedene Verläufe nach einer Infektion mit MAP erforderlich sind.

Grundsätzlich stuft die Weltorganisation für Tiergesundheit (*engl.* World Organisation for Animal Health, WOA) die Paratuberkulose als eine nicht heilbare

Infektionskrankheit ein (WOAH 2024). Daher wird versucht, mit verschiedenen Bekämpfungsmaßnahmen die Erregerverbreitung einzudämmen und das Expositionsrisiko zu reduzieren, um das Ausmaß der wirtschaftlichen Verluste, die die Paratuberkulose mit sich zieht, zu minimieren (Griss, Knific et al. 2024).

2.1.4 Genetische Prädisposition

In älteren Studien wurde eine potenzielle Prädisposition von bestimmten Rinderrassen gegenüber der Paratuberkulose aufgezeigt (Manning and Collins 2001). Darunter verzeichneten Rassen wie Angus, Guernsey, Jersey, Holstein, Channel Island, Limousin und Shorthorn sowie Rassen der Art *Bos indicus* eine höhere Inzidenz (Chiodini, Van Kruiningen et al. 1984; Gasteiner, Wenzl et al. 1999; Manning and Collins 2001; Roussel, Libal et al. 2005). Allerdings ist dies kritisch zu betrachten, da diese Ergebnisse möglicherweise durch die vermehrte Haltung dieser Rinderrassen und Faktoren wie den geographischen Standort und Herdenmanagementmethoden beeinflusst wurden (Manning and Collins 2001; Kirkpatrick and Shook 2011).

In den letzten Jahren haben vermehrt genomweite Assoziationsstudien unter Berücksichtigung der Wirtsgenetik bei der Paratuberkulose an Popularität gewonnen (Alonso-Hearn, Badia-Bringue et al. 2022; Garcia, Plain et al. 2023). Durch die Genotypisierung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (*engl.* single nucleotide polymorphisms, SNPs) konnten Quantitative Trait Loci (QTLs) und Genkandidaten identifiziert werden (Alonso-Hearn, Badia-Bringue et al. 2022). Dabei sind unter anderem SNPs innerhalb von Toll-like-Rezeptoren (TLR) wie TLR1, TLR2 und TLR4 mit einer Anfälligkeit für eine Infektion mit MAP assoziiert (Kravitz, Pelzer et al. 2021). TLR erkennen sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*engl.* pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) auf der Oberfläche der MAPs und initiieren die Immunantwort des Wirts (Mauric Maljkovic, Vlahek et al. 2023). In einer *in vitro* Studie mit PBMCs, die mit MAPs ko-inkubiert wurden, zeigten MAP-infizierte Rinder eine niedrigere Abundanz von TLR2 im Vergleich zu resistenten Rindern, was auf eine erfolglose Immunantwort hindeutet (Korbonits, Kleinwort et al. 2022). Daneben konnten auch Mutationen im Haupthistokompatibilitätskomplex (*engl.* major histocompatibility complex, MHC)-Klasse-II mit einer Disposition gegenüber der Paratuberkulose in Zusammenhang gebracht werden (Garcia, Plain et al. 2023). MHC-Klasse-II spielt eine große Rolle

in der Antigenpräsentation, um eine IFN- γ -Produktion in T-Zellen zu induzieren, was wiederum wichtig für die Aktivierung von Makrophagen ist (Kravitz, Pelzer et al. 2021). Zusätzlich zählen auch Gene, die dem TNF-Rezeptor zugeordnet werden, zu den Kandidaten (Canive, Gonzalez-Recio et al. 2021). Diese sind für die Stimulation der Th1-vermittelten Immunantwort essentiell (Canive, Gonzalez-Recio et al. 2021).

Untersuchungen zu genetischen Prädispositionen für die Paratuberkulose sind sowohl für das Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktionen, als auch für die Kontrolle und Bekämpfung der Erkrankung von großer Bedeutung (Alonso-Hearn, Badia-Bringue et al. 2022). Die Heritabilität der Prädisposition wird mit Werten von 0,05 bis 0,23 niedrig bis moderat geschätzt (Küpper, Brandt et al. 2012; Novo, Parker Gaddis et al. 2024). Trotz zum Teil niedriger Heritabilität wird im Rahmen der Zucht eine genomische Selektion auf die Resistenz gegenüber der Paratuberkulose als eine Möglichkeit zur Verbesserung von derzeitigen Bekämpfungsmaßnahmen angeregt (Kravitz, Pelzer et al. 2021; Alonso-Hearn, Badia-Bringue et al. 2022). Eine Prädisposition für eine Infektion mit MAP wird allerdings durchaus durch weitere Komponenten, unter anderem Umwelteinflüsse, die eine Exposition gegenüber dem Erreger begünstigen, beeinflusst (Juste, Vazquez et al. 2018; Krieger, Eisenberg et al. 2023). Inwieweit eine genetische Prädisposition für die Paratuberkulose eine Rolle bei der Ausprägung einer Infektion mit MAP spielt, ist offen.

2.1.5 Diagnostik

Diagnostische Testverfahren lassen sich in direkte und indirekte Nachweisverfahren untergliedern (Field, Mee et al. 2022). Während direkte Nachweisverfahren den Erreger – MAP – selbst detektieren, basieren indirekte Nachweisverfahren auf der Immunantwort des Wirts, indem sie die humorale Immunantwort wie Antikörper gegen MAP oder eine zellgebundene Immunantwort identifizieren (Chaubey, Gupta et al. 2016; Field, Mee et al. 2022).

2.1.5.1 Direkte Nachweisverfahren

2.1.5.1.1 Kulturelle Anzucht

Die kulturelle Anzucht von MAP aus Kotproben gilt als Goldstandard für den Nachweis des Erregers (Dane, Stewart et al. 2023). MAP kann aus Kot-, Milch-, Blut-, Gewebe- und Umweltproben isoliert und angezüchtet werden (Chaubey, Gupta et al. 2016; Field, Mee et al. 2022). Laut WOAHA ist die bakterielle Kultivierung die einzige Methode für den Nachweis von MAP, die eine Spezifität von 100 % gewährleistet und somit keine falsch-positiven Ergebnisse liefert (WOAHA 2024). Für die Anzucht sind verschiedene feste Nährmedien wie Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM) und Flüssigmedien wie Middlebrook 7H9 zu verwenden (WOAHA 2024). Der Zusatz von Mycobactin J ist für das Wachstum von MAP essentiell (Dane, Stewart et al. 2023). Die lange Generationszeit von MAP macht die Anzucht des Erregers, die in Flüssigmedien bis zu 16 Wochen und auf festen Nährböden bis zu 20 Wochen andauern kann, zu einer besonderen Herausforderung (Dane, Stewart et al. 2023). Nach einer erfolgreichen Anzucht müssen die Kolonien mittels Polymerase-Kettenreaktion (*engl.* polymerase chain reaction, PCR) oder eines Tests, der die Abhängigkeit von Mycobactin J prüft, identifiziert werden (Dane, Stewart et al. 2023). Eine geeignete und gründliche Dekontamination der Proben ist für einen erfolgreichen Nachweis von MAP vor der Übertragung ins Medium wichtig, um eine Überwucherung der MAP-Kolonien durch andere Keime zu verhindern (Dane, Stewart et al. 2023). Hierfür ist Hexadecylpyridiniumchlorid am geeignetsten, da es für MAPs weniger schädlich ist (Dane, Stewart et al. 2023). Nichtsdestotrotz kann es aber auch durch diesen obligatorischen Dekontaminationsschritt zu einer Beeinträchtigung der Viabilität von MAPs kommen, was zu einer Reduktion der Sensitivität dieser diagnostischen Methode führt (Dane, Stewart et al. 2023; WOAHA 2024).

Je nach Stadium der Infektion unterscheidet sich die Sensitivität des Testverfahrens (Nielsen and Toft 2008). Während viele Tiere in einem frühen Stadium der Erkrankung nicht erkannt werden, ist die Sensitivität im progressiven Verlauf der Erkrankung höher (Nielsen and Toft 2008). Zudem korreliert die Sensitivität der bakteriellen Kultivierung von individuellen und gepoolten Kotproben sowie von Umweltproben mit der Prävalenz innerhalb einer Herde (Field, Mee et al. 2022).

2.1.5.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Es wurden bereits mehrere DNA-Sequenzen des MAP-Genoms wie IS900, f57 und ISMap02 für den Nachweis von MAP mittels PCR verwendet (Arango-Sabogal, Labrecque et al. 2024). Während die Insertionssequenzen IS900 in 16 bis 22 Kopien und ISMap02 in sechs Kopien im MAP-Genom vorkommt, ist die f57-Sequenz ein einzelkopiertes Gen (Poupart, Coene et al. 1993; Stabel and Bannantine 2005; Conde, Price-Carter et al. 2021). Die am häufigsten eingesetzte Sequenz IS900 zeigt eine sehr hohe Sensitivität, die durch die hohe Anzahl an vorkommenden Kopien ermöglicht wird, aber eine eingeschränkte Spezifität durch potenzielle Kreuzreaktionen mit anderen Arten von Mykobakterien (Englund, Bolske et al. 2002; Arango-Sabogal, Labrecque et al. 2024; Bissonnette, Brousseau et al. 2024). Die Sequenzen f57 und ISMap02 weisen im Vergleich dazu eine geringere Sensitivität auf, dafür aber eine durchaus höhere Spezifität, da diese Sequenzen nicht in anderen Mykobakterien identifiziert werden konnten (Poupart, Coene et al. 1993; Herthnek and Bolske 2006; Arango-Sabogal, Labrecque et al. 2024). Durch den Einsatz der Insertionssequenz IS900 und der Sequenz f57 in einer Multiplex-PCR kann jedoch lediglich eine Sensitivität von 50,3 % und eine Spezifität von 93,5 % erreicht werden (Jurado-Martos, Cardoso-Toset et al. 2023).

Die PCR hat im Vergleich zur kulturellen Anzucht von MAP eine deutlich schnellere Durchführung zum Vorteil, weist allerdings deutliche Limitationen in der Sensitivität und Spezifität auf (Clark, Koziczowski et al. 2008; Jurado-Martos, Cardoso-Toset et al. 2023). Zudem kann durch den Nachweis von MAP mittels PCR zwar die Anwesenheit des Erregers bestätigt werden, aber es können keine Rückschlüsse auf die Viabilität des Erregers gezogen werden (Cechova, Beinhauerova et al. 2021). Daher beschäftigen sich viele Studien mit einer Weiterentwicklung dieser Methode, indem sie unter anderem eine Kombination aus Palladium- oder Platinverbindungen und PCR nutzen, um eine Viabilitätsbestimmung von MAPs zu ermöglichen (Cechova, Beinhauerova et al. 2021; Cechova, Beinhauerova et al. 2022).

2.1.5.2 Indirekte Nachweisverfahren

2.1.5.2.1 Serologische Nachweisverfahren

Für die Detektion MAP-spezifischer Antikörper gibt es verschiedene Nachweisverfahren wie die Komplementbindungsreaktion, den Agar-Gel-Immundiffusionstest und der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (WOAH 2024).

Bei der Komplementbindungsreaktion werden die zu untersuchenden Serumproben mit MAP-Antigenen und einer definierten Menge an Komplement inkubiert (de Lisle, Seguin et al. 1980). Als Indikator werden antikörperbeladene Schaferythrozyten hinzugefügt (de Lisle, Seguin et al. 1980). Kommt es im Folgenden zu einer Hämolyse der Erythrozyten durch freies Komplement, hat sich aufgrund von fehlenden Antikörpern gegen MAP kein Antigen-Antikörper-Komplex gebildet (de Lisle, Seguin et al. 1980). Folglich fällt ein Testergebnis positiv aus, wenn die Hämolyse ausbleibt (de Lisle, Seguin et al. 1980).

Für den Agar-Gel-Immundiffusionstest wird Agarosegel auf einer Platte gegossen und in eine zentrale Vertiefung ein MAP-spezifisches Antigen hinzugefügt (WOAH 2024). In periphere Vertiefungen werden die zu untersuchenden Serumproben aufgetragen (WOAH 2024). Nach einem Inkubationsschritt können die Ergebnisse visuell beurteilt werden: hat sich eine Präzipitationslinie gebildet, kam es zu einer Reaktion zwischen MAP-spezifischen Antikörpern und dem Antigen, was folglich als ein positives Ergebnis zu betrachten ist (WOAH 2024).

Die Komplementbindungsreaktion und der Agar-Gel-Immundiffusionstest weisen für den Nachweis von Antikörpern gegen MAP eine deutlich geringere Sensitivität und Spezifität im Vergleich zum ELISA auf, weshalb diese Methoden für den Nachweis MAP-spezifischer Antikörper bei Rindern heutzutage nicht mehr empfohlen werden (Ridge, Morgan et al. 1991; Sockett, Conrad et al. 1992; WOAH 2024).

Der ELISA ist eine einfache, schnelle und kosteneffiziente Möglichkeit um Antikörper gegen MAP nachzuweisen und ist in Bezug auf die Paratuberkulose das am häufigsten eingesetzte serologische Nachweisverfahren (Chaubey, Gupta et al. 2016; Field, Mee et al. 2022). Der Nachweis kann aus Serum- oder Milchproben von Einzeltieren oder gesammelt auf Herdenebene erfolgen (Nielsen and Toft 2008; Field, Mee et al. 2022). Das zu untersuchende Probenmaterial wird mit einem Puffer, der *Mycobacterium phlei* enthält, verdünnt, um für das Erreichen einer

höheren Spezifität kreuzreagierende Antikörper zu entfernen (Bech-Nielsen, Jorgensen et al. 1992). Nach dem Auftragen des Untersuchungsmaterials auf mit MAP-Antigen beschichteten Platten, können nach Zugabe eines spezifischen Sekundärantikörpers mittels Farbreaktionen vorhandene Antikörper gegen MAP nachgewiesen werden (WOAH 2024). Die spektrophotometrisch bestimmte Wellenlänge der Farbe ist proportional zur Menge an enthaltenem Antikörper in der Probe (WOAH 2024).

Das ELISA-Testverfahren zeigt eine hohe Zuverlässigkeit bei der Detektion von MAP-spezifischen Antikörpern bei Rindern mit klinischen Anzeichen (Chaubey, Gupta et al. 2016). In frühen Phasen der Infektion ist die Sensitivität der Testmethode jedoch deutlich niedriger, da subklinisch infizierte Rinder aufgrund mangelnder Serokonversion nur unzureichend erkannt werden (Magombedze, Shiri et al. 2017). Nielsen et al. zeigte zwar, dass 95 % bis 98 % der MAP-ausscheidenden Rindern bereits Antikörper gebildet haben (Nielsen and Ersbøll 2006), dennoch wurde in einer anderen Studie beobachtet, dass Rinder auch ohne nachweisliche Bildung von spezifischen Antikörpern das Pathogen ausscheiden (Shin, Park et al. 2015), was mit einer hohen Gefahr der Erregerverbreitung einhergeht (Tuberquia-Lopez, Correa-Valencia et al. 2022). Zudem ist die Spezifität des ELISA-Testverfahrens bei einer hohen Prävalenz innerhalb der Herde reduziert, wodurch die Anzahl der falsch-positiv identifizierten Tiere steigt (Bates, Laven et al. 2020). Die Sensitivität des ELISAs ist proportional zur Menge an ausgeschiedenen MAPs (Espejo, Zagmutt et al. 2015). Für Rinder, die wenig Erreger ausscheiden, liegt sie bei 18,7 % und für Rinder, die eine große Menge an Erreger ausscheiden, bei 60,6 % (Espejo, Zagmutt et al. 2015). In kleinen Herden mit niedriger Prävalenz weist die Anwendung des ELISAs bei der serologischen Beurteilung auf Einzeltierebene aufgrund der vergleichsweise niedrigen Sensitivität Limitationen auf (Ottardi, Lechner et al. 2024). Auf Herdenebene kann das ELISA-Testverfahren zwar eine effiziente Methode für den Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern darstellen (Johnson, McLeod et al. 2022), dennoch werden bei der individuellen Testung aufgrund deutlicher Limitationen in der Sensitivität und Spezifität MAP-infizierte Rinder nicht zuverlässig erkannt und nicht-infizierte Rinder als falsch-positiv eingestuft (Nielsen and Toft 2008; Tuberquia-Lopez, Correa-Valencia et al. 2022). Daraus resultiert einerseits die Gefahr der Erregerverbreitung und andererseits ein hoher wirtschaftlicher

Schaden aufgrund des vorzeitigen Entfernens von gesunden Rindern, die als vermeintlich infiziert diagnostiziert wurden, aus der Herde (Verteramo Chiu, Tauer et al. 2018; Tubercuia-Lopez, Correa-Valencia et al. 2022).

2.1.5.2.2 Nachweis zellgebundener Immunantwort

Die zellgebundene Immunität ist die erste Immunantwort des Rindes auf eine Infektion mit MAP und kann vor einer Produktion von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Corneli, Di Paolo et al. 2021). Die initiale Immunantwort wird hauptsächlich durch Th1-Lymphozyten vermittelt und ist von einer Produktion von IFN- γ und weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen geprägt (Begg, de Silva et al. 2011). In einem *in vitro* Testverfahren kann nach Stimulation von sensibilisierten Lymphozyten infizierter Rinder mit mykobakteriellen, aufgereinigten Proteinderivaten (*engl.* purified protein derivate, PPD), wie bovines PPD aus *Mycobacterium bovis*, aviäres PPD aus dem *Mycobacterium avium*-Komplex und Johnin aus MAP, eine vermehrte Produktion von IFN- γ mittels ELISA gemessen werden (Kalis, Collins et al. 2003; Corneli, Di Paolo et al. 2021). Der Nachweis zellgebundener Immunantwort ist ein wichtiges Testverfahren für Paratuberkulose-freie Betriebe oder Herden mit niedriger Prävalenz, da infizierte Rinder schon sehr früh im Vergleich zu serologischen Nachweisverfahren vor dem Ausscheiden von MAPs erkannt werden können und somit eine Ausbreitung der Erkrankung innerhalb der Herde vermieden werden kann (Corneli, Di Paolo et al. 2021). In Herden mit einer hohen Prävalenz wird es allerdings nicht empfohlen, Rinder mit einem positiven Nachweis zellgebundener Immunität aus dem Betrieb zu entfernen, da diese Immunantwort wichtig für die Kontrolle der Infektion ist und diese Rinder möglicherweise resistent gegenüber der Paratuberkulose sind (Jungersen, Mikkelsen et al. 2012; Corneli, Di Paolo et al. 2021). Da die zum Einsatz kommenden PPDs außerdem eine Kreuzreaktion zu anderen mykobakteriellen Infektionen zeigen, ist die Spezifität des IFN- γ -Tests mit 67 % bis 94 % eingeschränkt (Jungersen, Huda et al. 2002; Kalis, Collins et al. 2003; WOA 2024). Zudem weist er eine geringe Sensitivität von 13 % bis 85 % auf (Nielsen and Toft 2008; WOA 2024).

Der auf der verzögerten Hypersensitivitätsreaktion basierende Hauttest ist ein weiteres Nachweisverfahren für die zellgebundene Immunantwort (WOA 2024). Dabei wird Johnin intradermal injiziert und die Veränderung der Hautdicke nach

72 Stunden bestimmt (WOAH 2024). Eine Zunahme der Hautdicke von mehr als 2 mm wird dabei als ein positives Testergebnis bewertet (WOAH 2024). Johnin zeigt jedoch eine Ähnlichkeit zu Antigenen in anderen Mykobakterien, was zu Kreuzreaktionen führen kann (Jain, Singh et al. 2020). Die Spezifität des Hauttests variiert je nach gesetztem Grenzwert der Hautdicke zwischen 89 % und 94 % (Kalis, Collins et al. 2003). Momentan wird das Testverfahren durch die Verwendung der rekombinanten, sekretorischen Proteine MAP2186c, MAP1693c, MAP3547c, MAP4308c und MAP2677c als Antigene weiterentwickelt (Jain, Singh et al. 2020). Diese versprechen im Vergleich zu traditionellem Johnin eine höhere Spezifität und Sensitivität (Jain, Singh et al. 2020).

2.1.6 Bekämpfungsmaßnahmen

Für die Paratuberkulose des Rindes gibt es in Deutschland eine Meldepflicht, jedoch keine nationale Verordnung zur Bekämpfung der Erkrankung (BMEL 2021). Ausschließlich im Bundesland Niedersachsen gilt seit 2017 die „Verordnung zum Schutz der Rinder gegen die Paratuberkulose“, die eine Untersuchungspflicht für über 24 Monate alte Zuchtrinder vorschreibt (Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2017). Dabei werden die zur Untersuchung herangezogenen Rinder im Abstand von zwölf Monaten anhand von Einzelblut- beziehungsweise Einzelmilchproben serologisch auf das Vorhandensein von MAP-spezifischen Antikörpern untersucht (Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2017). Alternativ kann eine serologische Untersuchung von zwei Bestandmilchproben der Sammelmilch im Abstand von drei bis neun Monaten erfolgen, wobei im Falle eines fraglichen oder positiven Ergebnisses Einzeltieruntersuchungen angeordnet werden (Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2017). Im Falle eines positiven Ergebnisses einer Einzeltierprobe wird eine Abstimmung mit einer Tierärztin oder einem Tierarzt zur Erstellung eines Maßnahmeplans zur Verbesserung der Hygiene veranlasst (Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2017). Des Weiteren dürfen über 24 Monate alte Zuchtrinder nur mit einem serologisch negativen MAP-Status in einen Betrieb eingestallt werden (Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und

Verbraucherschutz, 2017). In anderen Bundesländern ist die Bekämpfung der Paratuberkulose freiwillig.

Neben europäischen Ländern wie Norwegen und Schweden, in denen Bekämpfungsmaßnahmen gesetzlich verpflichtend sind, ist in anderen europäischen Ländern wie den Niederlanden und Belgien, und außereuropäischen Ländern wie Kanada und Australien die Teilnahme an Kontrollprogrammen freiwillig (Weber, Kelton et al. 2024).

Die Bekämpfungsmaßnahmen beinhalten eine oder mehrere der folgenden Strategien: Hygienemanagement, Merzen positiv getesteter Rinder, Impfung (Tuberquia-Lopez, Correa-Valencia et al. 2022).

2.1.6.1 Hygienemanagement

Hygienemanagementstrategien haben zum Ziel, die Transmission von MAP zu minimieren und die Prävalenz innerhalb der Herde zu senken (Whittington, Donat et al. 2019). Sie basieren auf Studien zu Risikofaktoren, die eine Übertragung von MAP begünstigen (Krieger, Eisenberg et al. 2023; Ottardi, Lechner et al. 2024). Dabei wird vor allem darauf geachtet die Exposition gegenüber der empfänglichen Altersgruppe möglichst gering zu halten (Tuberquia-Lopez, Correa-Valencia et al. 2022). Dies kann durch verschiedene Maßnahmen, wie der Separierung der Kälber von erwachsenen Rindern unmittelbar nach der Geburt, der Reinigung des Abkalbebereichs nach jeder Geburt und der Fütterung von Milchausstauscher anstelle von Milch erreicht werden (Klopfstein, Leyer et al. 2021). Zudem kann der Eintrag des Erregers durch den Zukauf von Rindern aus Paratuberkulose-unverdächtigen Betrieben verhindert werden (Krieger, Eisenberg et al. 2023). Die alleinige Durchführung von Hygienemanagementstrategien kann zu einer Reduzierung der Prävalenz innerhalb der Herde führen (Arango-Sabogal, Pare et al. 2017) und die kumulative Inzidenz, das heißt die Anzahl der Neuerkrankungen innerhalb eines Betriebs, verringern (Donat, Schmidt et al. 2016). Nichtsdestotrotz können Hygienemanagementstrategien auch nicht den gewünschten Effekt auf die Prävalenz innerhalb einer Herde erzielen, was auf eine inkonsequente Durchführung von Managementmaßnahmen zurückzuführen sein könnte (Klopfstein, Leyer et al. 2021). Hemmnisse für die Teilnahme an Bekämpfungsprogrammen oder deren Abbruch beruhen auf damit verbundenen

Kosten, Absenz von klinischen Symptomen und mangelnder Kenntnis über die Erkrankung (Imada, Roche et al. 2023).

2.1.6.2 Merzen positiv getesteter Rinder

Die Entfernung positiv getesteter Rinder, im englischen Sprachgebrauch als „test-and-cull“ bekannt, stellt eine wichtige Bekämpfungsmaßnahme dar, da infizierte Rinder potenziell MAP ausscheiden und damit eine Infektionsquelle für gesunde Tiere darstellen (Tuberquia-Lopez, Correa-Valencia et al. 2022). Jedoch zeigen Studien, dass eine alleinige Durchführung der „test-and-cull“-Strategie über mehrere Jahre nicht zu einer Reduktion der Prävalenz innerhalb einer Herde führte (Kudahl, Nielsen et al. 2008; Vass-Bognar, Khol et al. 2024). Dies kann der niedrigen Sensitivität der Nachweisverfahren geschuldet sein, wodurch nicht alle infizierten Rinder, vor allem in der frühen Phase der Infektion, zuverlässig identifiziert werden können (Camanes, Joly et al. 2018; Garvey 2020; Ottardi, Lechner et al. 2024). Eine Kombination aus der Entfernung positiv getesteter Rinder mit Hygienemanagementstrategien resultierte in einem größeren Erfolg in der Reduktion der Prävalenz innerhalb einer Herde als die alleinige Anwendung der „test-and-cull“-Strategie (Fox, Caldow et al. 2018; Donat, Einax et al. 2022; Vass-Bognar, Khol et al. 2024). Im Rahmen des freiwilligen Bekämpfungsprogramms der Paratuberkulose in Thüringen, das die zeitnahe Entfernung positiv getesteter Tiere sowie Hygienemanagementstrategien empfahl, konnte in einem Rinderbestand sogar eine Elimination von MAP innerhalb von zehn Jahren erreicht werden (Donat, Einax et al. 2024). Eine ungarischen Studie zeigte, dass die Art des angewendeten Nachweisverfahrens zur Identifizierung von MAP-infizierten Rindern für den Erfolg der Bekämpfung der Paratuberkulose ausschlaggebend ist (Vass-Bognar, Khol et al. 2024). So wurde eine weitaus größere Senkung der Prävalenz durch eine Kombination des ELISA-Testverfahrens mit einem direkten Nachweis von MAP in Kotproben mittels PCR im Vergleich zum alleinigen Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern im ELISA erzielt (Vass-Bognar, Khol et al. 2024). Dennoch ist die „test-and-cull“-Strategie aufgrund der potenziellen hohen Anzahl sowohl an falsch-negativen, als auch an falsch-positiven Testergebnissen als kritisch zu betrachten (Garcia and Shalloo 2015).

2.1.6.3 Vakzination

Die Immunisierung von Rindern gegen die Paratuberkulose stellt eine weitere wichtige Maßnahme zur Bekämpfung der Erkrankung dar (Tuberquia-Lopez, Correa-Valencia et al. 2022). Bereits 1926 wurde zum ersten Mal von einer Impfung gegen die bovine Paratuberkulose berichtet (Vallée and Rinjard 1926). Im darauffolgenden letzten Jahrhundert wurden verschiedene Lebend- und Totimpfstoffe zur Immunisierung von Rindern und Schafen gegen MAP entwickelt (Rosseels and Huygen 2008). Am weitesten verbreitet ist der Einsatz von inaktivierten Impfstoffen (Gupta, Singh et al. 2019). Eine Immunisierung zeigte eine Reduzierung der Kolonisation von Darmgewebe mit MAP, jedoch keinen vollständigen Schutz gegenüber einer Infektion (Sweeney, Whitlock et al. 2009; Bastida and Juste 2011). Trotzdem kann eine Impfung zu einer Reduzierung der Prävalenz von MAP-ausscheidenden Rindern führen (Juste, Alonso-Hearn et al. 2009). Die Vakzination als Bekämpfungsmaßnahme gegen die Paratuberkulose zeigte wirtschaftlich gesehen die effizienteste Strategie (Rasmussen, Barkema et al. 2021). Nichtsdestotrotz ist die Impfung auch mit negativen Effekten, wie granulomatöse Veränderungen an der Einstichstelle, verbunden, die zu einer Senkung des Schlachtpreises führten (Patton 2011). Außerdem zeigten gegen Paratuberkulose geimpfte Rinder eine Interferenz mit dem zum Nachweis von boviner Tuberkulose verwendeten Tuberkulintest, bei dem mittels intradermaler Injektion von PPD aus *Mycobacterium bovis* eine Zell-gebundene Immunantwort ausgelöst wird, was zu einer Einschränkung von nationalen Tuberkulose-Eradikationsprogrammen führte (Serrano, Elguezabal et al. 2017; McAloon, Roche et al. 2019). Eine Impfung von Rindern gegen die Paratuberkulose ist daher in vielen europäischen Ländern, unter anderem in Deutschland, verboten (Whittington, Donat et al. 2019). Aufgrund des unzureichenden Schutzes, der womöglich an der Auslösung einer ineffizienten Immunantwort liegt, und der negativen Begleiterscheinungen von vorhandenen Impfstoffen, werden aktuell neue Impfstoffe, vor allem Subunit-Vakzinen, entwickelt, die bereits zu einer protektiven Immunität gegen MAP bei Mäusen und einer Verhinderung des Ausscheidens von MAP in Ziegen führten (Haghkhah, Hemati et al. 2023; Shao, Cui et al. 2023). Auch Fusionsproteine aus MAP können eine protektive Immunität hervorrufen und führen im Gegensatz zu kommerziellen inaktivierten Impfstoffen nicht zu einer positiven

Reaktion im Tuberkulintest, was einen wichtigen Schritt für die Weiterentwicklung von Impfstoffen gegen die Paratuberkulose darstellt (Gupta, Wilson et al. 2022).

2.1.7 Wirtschaftliche Bedeutung

Schätzungen zur Folge betragen in Deutschland die jährlichen Verluste pro Kuh in einer positiv getesteten Herde 43,08 US-Dollar und die jährlichen nationalen Verluste 150,19 Millionen US-Dollar (Rasmussen, Barkema et al. 2021). Die Paratuberkulose führt unter anderem zu Einbußen in der Milchleistung, die je infizierte Kuh 452 kg Milch pro Laktation beträgt (Griss, Knific et al. 2024). Neben der Milchleistung beeinflusst die Erkrankung durch eine Senkung des Gehalts an Milchfett, -protein und Laktose auch die Milchqualität (Jurkovich, Bognar et al. 2016; Griss, Knific et al. 2024). Zudem werden infizierte Kühe in Bezug auf ihr Lebensalter früher geschlachtet als nicht-infizierte Kühe (Ozsvari, Harnos et al. 2020). Gleichzeitig zeigten MAP-infizierte Kühe einen niedrigeren Schlachtwert resultierend aus einem geringeren Schlachtgewicht im Vergleich zu nicht-infizierten Kühen (Kudahl and Nielsen 2009; Rasmussen, Barkema et al. 2021). Daneben ist die Paratuberkulose mit weiteren Erkrankungen wie Mastitis und Pneumonie assoziiert, die indirekt wiederum mit höheren Kosten verbunden sind (Raizman, Wells et al. 2007; Pritchard, Coffey et al. 2017; Rossi, Grohn et al. 2017). Neben diesen Konsequenzen, die einen direkten Einfluss auf die Produktionskosten haben, führen auch die durch Kontrollprogramme verbundenen Kosten wie Laborkosten, Ersetzung von vorzeitig geschlachteten positiven Rindern durch Paratuberkulose-unverdächtige Tiere und Aufwendungen zur Verbesserung des Hygienemanagements zu wirtschaftlichen Verlusten (Smith, Al-Mamun et al. 2017; Garvey 2020; Rasmussen, Barkema et al. 2022).

2.1.8 Zoonotisches Potential

Um die kausale Ursache von Infektionskrankheiten zu erörtern, können die Henle-Koch-Postulate aus dem 19. Jahrhundert herangezogen werden (Koch 1882; Loeffler 1884). Diese lauten folgendermaßen (Koch 1882; Loeffler 1884):

1. Der Erreger muss in jedem Falle der Erkrankung anwesend sein.
2. Der Erreger muss in Reinkultur anzüchtbar sein.
3. Durch eine Inokulation dieser Reinkultur muss die Erkrankung in einem gesunden, empfänglichen Patienten reproduzierbar sein.

4. Der Erreger muss aus diesem zweiten Wirt wiederum isoliert werden.

Im Rahmen der bovinen Paratuberkulose erfüllte MAP alle Henle-Koch-Postulate, weshalb MAP als die kausative Ursache für die Johnesche Krankheit bestimmt werden konnte (Harris and Barletta 2001). Auch bei Menschen, die an einer chronischen, granulomatösen Enteritis erkrankt waren, konnte MAP nachgewiesen werden (Bull, McMinn et al. 2003; Zarei-Kordshouli, Geramizadeh et al. 2019; Estevinho, Cabeda et al. 2023). Zudem gelang es bereits, MAP aus humanen Gewebeproben und Blut zu isolieren und anzuzüchten (Timms, Daskalopoulos et al. 2016; Estevinho, Cabeda et al. 2023; Agrawal, Borody et al. 2024). Damit kann sowohl das erste, als auch das zweite Postulat als erfüllt betrachtet werden. Die Erfüllung des dritten Postulats – die Reproduktion der Erkrankung – gestaltet sich jedoch als eine Herausforderung, da Infektionsexperimente aus ethischen und moralischen Gründen an Menschen nicht durchführbar sind. Die Problematik wurde durch die Verwendung von Tiermodellen umgangen, bei denen Ziegen mit aus Patienten mit chronischer, granulomatösen Enteritis isolierten Mykobakterien infiziert wurden und diese eine vergleichbare Entzündungsreaktionen im Darm aufwiesen (Chiodini, Van Kruiningen et al. 1984; Van Kruiningen, Chiodini et al. 1986). Der Erreger konnte dabei aus Gewebeproben auch wieder isoliert werden (Van Kruiningen, Chiodini et al. 1986). Durch die Erfüllung der Henle-Koch-Postulate ist bewiesen, dass sich Menschen grundsätzlich mit MAP infizieren können.

Seit mehreren Jahrzehnten wird MAP als eine potenzielle Ursache für die Ausprägung von Morbus Crohn diskutiert (Agrawal, Borody et al. 2024; Rayment, Rhodes et al. 2024). Die Heranziehung der Henle-Koch-Postulate als Kausalitätskriterien für Morbus Crohn ist jedoch äußerst kritisch zu beurteilen, da diese chronische Erkrankung zum einen Merkmale einer Autoimmunerkrankung aufweist und zum anderen durch multifaktorielle Ursachen hervorgerufen werden kann (Lowe, Yansouni et al. 2008; Rekvig 2024). Im Zusammenhang mit Morbus Crohn eignet sich eine Ursachenforschung anhand der Bradford-Hill-Kriterien für Kausalität (Uzoigwe, Khaita et al. 2007), die 1965 von Sir Austin Bradford Hill aufgestellt wurden (Hill 1965):

1. Effektstärke: Je stärker die Assoziation zwischen Exposition und Krankheit ist, desto wahrscheinlicher besteht ein kausaler Zusammenhang.

2. Konsistenz: Der Zusammenhang wurde von verschiedenen Personen, an verschiedenen Orten, unter verschiedenen Umständen und zu unterschiedlichen Zeiten beobachtet.
3. Spezifität: Eine Kausalität ist zu vermuten, wenn eine spezifische Population an einer spezifischen Krankheit leidet.
4. Zeitliche Beziehung: Die Ursache muss der Wirkung zeitlich vorausgehen.
5. Biologischer Gradient: Eine Dosis-Wirkung-Beziehung ist gegeben.
6. Plausibilität: Die Assoziation zwischen Ursache und Wirkung ist biologisch plausibel.
7. Kohärenz: Die Ursache-Wirkungs-Interpretation steht nicht im Gegensatz zum Wissen über die Krankheit.
8. Experiment: Der Kausalitätszusammenhang kann in Experimenten bestätigt werden.
9. Analogie: Der kausale Zusammenhang entspricht einem bereits beschriebenen Kausalitätszusammenhang.

Die Bradford-Hill-Kriterien können auf den aktuellen Stand der Wissenschaft angewendet werden, um einen Kausalitätszusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn zu erörtern. Eine Assoziation von Morbus Crohn mit MAP wurde bereits in mehreren Studien aufgezeigt (Bull, McMinin et al. 2003; Zarei-Kordshouli, Geramizadeh et al. 2019; Estevinho, Cabeda et al. 2023). Allerdings wurde MAP nicht bei allen Patienten, die an Morbus Crohn erkrankt waren, nachgewiesen (Zarei-Kordshouli, Geramizadeh et al. 2019), wodurch eine Effektstärke nicht eindeutig definiert werden kann und eine Konsistenz nicht gegeben ist. Auch das Kriterium „Spezifität“ kann nicht erfüllt werden, da MAP neben Morbus Crohn mit weiteren humanen Autoimmunerkrankungen unter anderem Diabetes Typ 1, Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis und Hashimoto Thyreoiditis assoziiert wurde (Ekundayo, Falade et al. 2022; Moghadam, Ghaemi et al. 2022; Asgari, Ghaemi et al. 2023; Asgari, Ghaemi et al. 2023). Eine zeitliche Beziehung, bei der die Exposition gegenüber MAP vor dem Auftreten von Morbus Crohn erfolgt sein muss, ist nach dem derzeitigen Wissensstand nicht eindeutig, da nicht geklärt ist, ob MAP bereits vor oder erst nach dem Ausbruch der Erkrankung anwesend ist (Jones, Farver et al. 2006). Zudem konnte kein Zusammenhang zwischen Menschen mit einem erhöhten Expositionsrisiko gegenüber MAP wie landwirtschaftlichem und tierärztlichem Personal und Morbus Crohn hergestellt

werden (Qual, Kaneene et al. 2010), wodurch ein biologischer Gradient anhand einer Dosis-Wirkung-Beziehung nicht festgestellt werden kann. Die Erfüllung des Kriteriums „Kohärenz“ ist nicht eindeutig gegeben, da MAP laut dem Stand der Wissenschaft zwar als Ätiologie für Morbus Crohn in Frage kommt, andererseits wird diese chronische Krankheit als eine multifaktorielle Erkrankung angesehen, deren Entwicklung unter anderem auch durch genetische Komponenten und immunologische Faktoren beeinflusst wird (Mintz and Lukin 2023; Diez-Martin, Hernandez-Suarez et al. 2024). Studien zum Effekt von anti-mykobakteriellen Therapien bei Morbus Crohn-Patienten führten einerseits zu einer Remission oder einer Verbesserung der Symptome (Graham, Naser et al. 2019; Agrawal, Hamblin et al. 2020), andererseits wurde auch gezeigt, dass durch den Einsatz von anti-mykobakteriellen Therapien keine Effekte bei der Behandlung von Morbus Crohn erzielt wurden (Afdhal, Long et al. 1991; Swift, Srivastava et al. 1994). Durch diese widersprüchlichen Ergebnisse kann auch das Kriterium „Experimente“ als nicht-erfüllt betrachtet werden. Letztlich kann aber anhand der bovinen Paratuberkulose, deren kausative Ursache MAP ist und die durch eine chronische Darmentzündung charakterisiert ist, die Morbus Crohn ähnelt (Mintz and Lukin 2023), eine Analogie zu Morbus Crohn hergestellt werden, welche eine Assoziation zwischen MAP und Morbus Crohn prinzipiell biologisch plausibel macht.

Zusammengefasst liefert die Bewertung der Bradford-Hill-Kriterien Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn bestehen könnte. Ein kausaler Zusammenhang kann aber nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft nicht bestätigt werden (Agrawal, Borody et al. 2024), was sich auch in den vielen unerfüllten Bradford-Hill-Kriterien widerspiegelt. Welche Rolle MAP bei der Entwicklung der multifaktoriellen Erkrankung Morbus Crohn spielt, ist bis dato unklar (Mintz and Lukin 2023; Diez-Martin, Hernandez-Suarez et al. 2024).

MAP konnte bereits in Lebensmitteln wie Fleisch, fermentierten Rohwürsten und pasteurisierter Milch nachgewiesen werden (Alonso-Hearn, Molina et al. 2009; Gerrard, Swift et al. 2018; Lorencova, Babak et al. 2019). Aufgrund des möglichen zoonotischen Potentials von MAP ist ein Eintrag in die Lebensmittelkette unter anderem durch Bekämpfungsmaßnahmen und der Identifikation von MAP-ausscheidenden Tieren zu verhindern (Dow and Alvarez 2022).

2.2 Bedeutung von Serum für die Diagnostik und Forschung

Blut zirkuliert als Transportmedium von verschiedensten kleinen Molekülen durch den gesamten Körper und kann physiologische und pathologische Prozesse im gesamten Organismus widerspiegeln (Zhu 2024). Blut kann in zelluläre und flüssige Bestandteile unterteilt werden (Zhu 2024). Wurde dem Blut ein gerinnungshemmendes Mittel, wie Ethylendiamintetraacetat (EDTA) oder Heparin hinzugefügt, wird der flüssige Bestandteil als Plasma bezeichnet (Zhu 2024). Dagegen ist Serum als der von Fibrinogen und anderen Gerinnungsfaktoren befreite, flüssige Blutbestandteil beschrieben (Zhu 2024). Serum ist ein einfach zu gewinnendes und kostengünstiges biologisches Probenmaterial (Zhang, Shu et al. 2024). In der medizinischen Diagnostik wird es für eine Vielzahl von biochemischen und immunologischen Tests verwendet (Plebani, Banfi et al. 2020; Lee, Jeon et al. 2024; Tieri, Morsella et al. 2024). Routinetests basieren hauptsächlich auf die sich im Blut befindlichen Proteine (Zhu 2024). Diese können in drei Gruppen kategorisiert werden (Zhu 2024). Die erste Gruppe besteht aus Proteinen, die eine funktionelle Rolle im Blut einnehmen, wie Serumalbumin, Apolipoproteine und das C-reaktive Protein und liegen in hohen Konzentrationen im Blut vor (Geyer, Holdt et al. 2017; Zhu 2024). Die zweite Gruppe setzt sich aus Proteinen zusammen, die aus dem Gewebe ins Blut abgegeben wurden, unter anderem Tumormarker und Leberenzyme wie Alanin-Aminotransferase und Aspartat-Aminotransferase (Zhu 2024). Die Gruppe mit den niedrigsten Proteinkonzentrationen besteht aus Signalmolekülen und Rezeptorliganden wie Hormone und Zytokine (Geyer, Holdt et al. 2017; Zhu 2024). Schon die kleinste von der Norm abweichende Konzentration eines Proteins gibt Hinweise auf einen pathologischen Prozess (Zhu 2024). So deutet beispielsweise eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins auf eine systemische Entzündung hin (Cheng, Wang et al. 2024). Eine Kombination aus verschiedenen Biomarkern ermöglicht eine zuverlässigere und spezifischere Diagnose (Englitz, Smycz-Kubanska et al. 2024). Zudem können im Serum spezifische Antikörper für eine Infektion nachgewiesen werden (Tieri, Morsella et al. 2024). So repräsentiert das Serum ein wichtiges Probenmaterial für den Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern bei an Paratuberkulose erkrankten Rindern (Tieri, Morsella et al. 2024). Somit stellt das Serum auch ein interessantes biologisches Material für die biomedizinische Forschung dar, um Assoziationen zwischen sowohl

physiologischen als auch pathologischen Prozessen und Veränderungen im Proteom und Metabolom herzustellen (Ghaffari, Daniel et al. 2024; Lisuzzo, Laghi et al. 2024; Pumpitakkul, Roytrakul et al. 2024). Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf der Entdeckung neuer Biomarker, um sowohl die Zuverlässigkeit und Möglichkeiten aktueller Diagnostikverfahren zu verbessern, als auch eine Prognose in Bezug auf den Krankheitsverlauf zu erhalten und einen Behandlungserfolg festzustellen (Zhu 2024).

2.3 Differentielle Proteomanalyse

Der Begriff Proteom wurde von Marc Wilkins in den 1990er Jahren analog zum Begriff Genom definiert und beschreibt die Gesamtheit aller Proteine, die von einem Genom exprimiert werden (Wilkins, Sanchez et al. 1996). Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom hochdynamisch und kann sich unter verschiedensten Bedingungen verändern (Wilkins, Sanchez et al. 1996). So kann aus einem Protein-codierenden Gen aufgrund von alternativem Spleißen und posttranslationalen Modifikationen eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen hervorgehen (Szelest and Giannopoulos 2024; Zhang, Wu et al. 2024). Anhand der differentiellen Proteomanalyse können durch die vergleichende Quantifizierung von Proteinen und deren posttranslationalen Modifikationen Abweichungen im Proteom zwischen verschiedenen Phänotypen, wie gesund und infiziert, bestimmt werden (Schiff, Walker et al. 2024). Diese können sowohl Aufschluss über physiologische und pathophysiologische Abläufe geben, als auch zur Identifikation von krankheitsbezogenen Biomarkern beitragen, um eine akkurate Diagnose, Prognose und Beurteilung eines Therapieerfolgs zu ermöglichen (Rozanova, Barkovits et al. 2021; Schiff, Walker et al. 2024).

Die Massenspektrometrie bietet ein modernes, hochempfindliches analytisches Verfahren für die differentielle Proteomanalyse (Mun, Bhat et al. 2024). Sie basiert auf der Separation von ionisierten Peptiden anhand des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) und der anschließenden Detektion dieser Ionen (Rozanova, Barkovits et al. 2021). Dafür werden die Proteine oder Peptide zunächst durch gängige Ionisationstechniken wie Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (*engl.* matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) oder Elektrospray-Ionisation (ESI) ionisiert (Rozanova, Barkovits et al. 2021). Nun können die Ionen in einem Massenspektrometer wie Quadrupole,

Orbitrap und time of flight (TOF) mittels unterschiedlicher Verfahren anhand des m/z aufgetrennt werden (Rozanova, Barkovits et al. 2021). Um eine höhere Spezifität zu erreichen, können auch mehrere Analysatoren in einem Massenspektrometer gekoppelt werden, was als Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bezeichnet wird (Rozanova, Barkovits et al. 2021; Shuken 2023). Dabei werden in einer ersten Messung (MS1) Vorläuferionen isoliert, die nach einer Fragmentierung durch Kollision ein zweites Mal gemessen werden (MS2) (Shuken 2023). Bei der datenabhängigen Erfassung (*engl.* data-dependent acquisition, DDA) werden nur die intensivsten Ionen aus MS1 für die MS2 ausgewählt (Shuken 2023). Dagegen werden bei der datenunabhängigen Erfassung (*engl.* data-independent acquisition, DIA) im Voraus Massenisolierungsfenster bestimmt und alle Vorläuferionen eines Fensters simultan fragmentiert und analysiert, was im Vergleich zur DDA eine akkuratere Identifikation und Quantifizierung der Proteine ermöglicht (Rozanova, Barkovits et al. 2021). Die erhaltenen Massenspektren können mit Proteinsequenzdatenbanken abgeglichen werden, um die Proteine schlussendlich zu identifizieren (Degroote, Schmalen et al. 2023).

Durch eine der Tandem-Massenspektrometrie vorausgeschalteten Flüssigkeitschromatographie (*engl.* liquid chromatography, LC), die LC-MS/MS, werden die Proteine beziehungsweise Peptide vor der massenspektrometrischen Analyse chromatographisch aufgetrennt, wodurch die Proteinanalyse von komplexen Proben verbessert werden kann (Choi, Hercules et al. 2001). Bei der Bottom-up-Proteomik wird vor der LC-MS/MS-Analyse ein enzymatischer Verdau der Proteine in Peptide beispielsweise durch Trypsin durchgeführt (Duong and Lee 2023). Die quantitative Massenspektrometrie kann label-basiert oder label-frei erfolgen (Shuken 2023). Im Gegensatz zur label-basierten Methode, die auf einer Markierung der Proben mittels stabiler Isotopen basiert, beruht die Quantifizierung bei der label-freien Massenspektrometrie auf der Intensität einzelner Peptide eines Proteins, wobei die Abundanz von Peptiden auf die Gesamtmenge an Peptiden normalisiert wird (Rozanova, Barkovits et al. 2021; Degroote, Schmalen et al. 2023). Die label-freie Messtechnik ist zwar potenziell weniger präzise als die label-basierte Methode, wird aber aufgrund ihrer Kosteneffizienz, dem geringeren Aufwand bei der Probenaufbereitung und der Möglichkeit, eine unlimitierte Anzahl an Proben zu vergleichen, vermehrt in der Massenspektrometrie eingesetzt (Rozanova, Barkovits et al. 2021).

2.4 Serumproteomik

Die Untersuchung des Serumproteoms ist von großer Bedeutung und großem Interesse, da es physiologische und pathophysiologische Abläufe eines Individuums widerspiegelt und das Serum selbst als biologisches Probenmaterial routinemäßig für zahlreiche diagnostische Zwecke verwendet wird (siehe Kapitel 2.2). Besonders im Rahmen der Erforschung neuer Biomarker für die Diagnostik von Erkrankungen, aber auch für den prognostischen Verlauf einer Krankheit und die Evaluierung von pharmazeutischen Therapien nimmt die Serumproteomik einen hohen Stellenwert in der aktuellen Forschung ein (Zhu 2024). Serum hat gegenüber Zellen eine hohe Stabilität zum Vorteil, die eine Lagerung über längere Zeiträume und damit bei Bedarf wiederholte Messungen ermöglicht (Grankvist, Gomez et al. 2019).

Technisch betrachtet können Serumproteomanalysen in zwei große Gruppen gegliedert werden: auf Affinität basierende Technologien und Massenspektrometrie (Zhu 2024). Heutzutage gängige Massenspektrometrierverfahren sind unter anderem MALDI-TOF und LC-MS/MS (Zhu 2024). Die den Verfahren zugrundeliegenden Technologien sind ausführlich in Kapitel 2.3 beschrieben. Für auf Affinität basierende Technologien ist das Vorhandensein von geeigneten Affinitätsreagenzien zwingend notwendig, wohingegen eine Massenspektrometrie ohne diese durchgeführt werden kann (Wang, Zhao et al. 2024). Traditionelle auf Affinität basierende Technologien sind ELISA und Western blotting, bei denen vor der Analyse allerdings bereits eine limitierte Anzahl an geeigneten, bekannten Kandidaten ausgewählt werden muss (Zhu 2024). Da hierbei nicht die Gesamtheit der Serumproteine, also das Serumproteom, analysiert werden kann, können diese Verfahren nur bedingt zu den Methoden der Serumproteomik gezählt werden. Um einen höheren Durchsatz zu erreichen, wurden bereits neue Technologien generiert (Zhu 2024). Eine moderne auf Antikörper basierende Technologie ist der Proximity extension assay (PEA), auch als Olink bezeichnet, der eine hohe Sensitivität und Spezifität bei der Proteomanalyse von humanen und murinen Proben aufweist (Wang, Zhao et al. 2024). Dieses Verfahren arbeitet mit dualen Antikörpern, also zwei verschiedenen Antikörpern, die gegen ein Protein gerichtet sind (Wang, Zhao et al. 2024). Wenn beide Antikörper an das Protein binden, stehen sie sich so nahe (proximity), dass die an den Antikörpern befestigten DNA-Oligonukleotide

hybridisieren und mittels DNA-Polymerase verlängert werden können (extension) (Wang, Zhao et al. 2024). Dadurch entstehen für jedes Protein einzigartige DNA-Sequenzen, die mittels PCR amplifiziert werden und anschließend durch next generation sequencing oder quantitative PCR (qPCR) ausgelesen werden können (Wang, Zhao et al. 2024). Dieses Verfahren ermöglicht es Proteine, die im zu untersuchenden Probenmaterial in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen, zu detektieren und die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen zu minimieren, wodurch eine hohe Sensitivität und Spezifität erreicht wird (Wang, Zhao et al. 2024). Eine weitere neue Technologie ist SomaScan (Zhu 2024). Diese Methode basiert auf spezifisch an Protein bindende einzelsträngigen DNAs, den sogenannten „SOMAmers“ (Wang, Zhao et al. 2024). Die „SOMAmers“ werden mittels Beads immobilisiert und binden an spezifische Proteine, welche daraufhin biotinyliert werden, woraufhin die „SOMAmer“-Protein-Komplexe von den Beads gelöst werden (Huang, Chen et al. 2021; Wang, Zhao et al. 2024). Durch die Zugabe von Avidin werden die biotinylierten Proteine gebunden und gleichzeitig werden die an die Proteine gekoppelten „SOMAmers“ aus dem Komplex befreit und mittels DNA-Technologien quantifiziert (Huang, Chen et al. 2021; Wang, Zhao et al. 2024). Momentan übertrifft die SomaScan-Technologie die Olink-Methode anhand der nachweisbaren Proteine (Wang, Zhao et al. 2024). Es ist jedoch zu erwähnen, dass beide Technologien bis dato nur für wenige Spezies spezifische Affinitätsreagenzien zur Verfügung stellen (laut jeweiliger Hersteller-Website, zuletzt aufgerufen am 02. August 2024; Olink (<https://olink.com>): Mensch und Maus; Somalogic (<https://somalogic.com>): Mensch, Maus, nichtmenschliche Primaten, Katze, Hund, Schwein und Ratte), weshalb diese neuartigen, affinitätsbasierenden Technologien nicht für die Analyse von bovinen Serumproteomen verwendet werden können. Im Gegensatz dazu ist die Massenspektrometrie nicht auf die zur Verfügung stehenden Affinitätsreagenzien beschränkt (Wang, Zhao et al. 2024), wodurch sie eine geeignete Methode für eine hochauflösende Proteomanalyse von bovinem Serum darstellt.

2.5 Biomarker in mykobakteriellen Infektionen

Biomarker spielen sowohl in der Diagnostik von Erkrankungen, als auch in der Prognose von Krankheitsverläufen und der Beurteilung des Behandlungserfolgs pharmazeutischer Therapien eine wichtige Rolle (Pumpitakkul, Roytrakul et al.

2024; Zhu 2024). Gerade bei mykobakteriellen Infektionen sind die derzeit verfügbaren Diagnostikverfahren unter anderem aufgrund ihrer eingeschränkten Sensitivität und Spezifität und der unterschiedlichen Ausprägungen der Erkrankungen nicht zuverlässig, weshalb die Identifizierung von gut geeigneten Biomarkern einen enormen Fortschritt im Hinblick auf deren Nachweis bedeuten würde (Zhuang, Yang et al. 2024).

2.5.1 Tuberkulose

Für die humane Tuberkulose, ausgelöst durch *Mycobacterium tuberculosis* – die tödlichste Infektionskrankheit der Welt mit jährlich 1,5 Millionen Toten – läuft die Suche nach der Identifikation von zuverlässigen Biomarkern seit Jahrzehnten auf Hochtouren (Yu, Jiang et al. 2023; Ogunlade, Tadesse et al. 2024). Dies gestaltet sich jedoch besonders herausfordernd, da bei der Tuberkulose, wie bei weiteren mykobakteriellen Infektionen, latente und aktive Infektionen vorliegen, die durch gängige diagnostische Verfahren, die sich aus der Anamnese, bildgebenden Verfahren, vor allem der Thorax-Röntgenuntersuchung, dem direkten Erregernachweis und immunologischen Nachweisverfahren wie dem Tuberkulin-Hauttest und dem IFN- γ -Release Assay, deren Prinzipien anhand der bovinen Paratuberkulose bereits in Kapitel 2.1.5.2.2 ausführlich beschrieben wurden, zusammensetzen, nicht unterschieden werden können (Kontsevaya, Cabibbe et al. 2024; Zhuang, Yang et al. 2024). Beim Rind erfolgt der Nachweis der Tuberkulose – ausgelöst durch *Mycobacterium bovis* – ante-mortem über zwei mögliche Testverfahren: dem intradermalen Hauttest und den IFN- γ -Release Assay (Buddle, de Lisle et al. 2015). Post-mortem wird die bovine Tuberkulose visuell anhand von pathologischen Veränderungen und durch einen direkten Erregernachweis diagnostiziert (Nunez-Garcia, Downs et al. 2018). Diese Nachweisverfahren weisen deutliche Einschränkungen in Bezug auf die Spezifität und vor allem auf die Sensitivität auf (Nunez-Garcia, Downs et al. 2018).

Durch Proteomanalysen wurde bereits eine Vielzahl an potenziellen Biomarkern identifiziert, die oftmals miteinander kombiniert hohe Sensitivitäten und Spezifitäten versprechen (Zhuang, Yang et al. 2024). Beispielsweise kann mit Hilfe eines Biomarker-Panels aus den sechs, mittels LC-MS/MS identifizierten, im Vergleich zu gesunden Patienten höher exprimierten Proteinen FETUB, FCGR3B, LRG1, SELL, CD14 und ADA2 eine pulmonare Tuberkulose in humanem Blut nachgewiesen

werden (Schiff, Walker et al. 2024). Auch bei Rindern wurden bereits potenziell geeignete Biomarker, unter anderem IL-8 und Pentaxin, die im Serum beziehungsweise Plasma im Falle einer Erkrankung erhöht waren, für den Nachweis der bovinen Tuberkulose identifiziert (Gao, Guo et al. 2019). Neben dem generellen Nachweis der Erkrankung existieren auch einzelne potenzielle Biomarker und Biomarker-Panel, die eine aktive Tuberkulose von einer latenten Tuberkulose differenzieren können (Delemarre, van Hoorn et al. 2021; Wang, Qu et al. 2022). Für die humanen Tuberkulose wurde unter anderem ein Biomarker-Panel etabliert, das sich aus den Proteinen CCL1, CXCL10 und VEGF und der Aktivität der Adenosin-Deaminase zusammensetzt, welche bei einer aktiven Form eine erhöhte Expression beziehungsweise Aktivität im Serum im Vergleich zu einer latenten Form aufwies (Delemarre, van Hoorn et al. 2021). In bovinen Serum wurde Kallikrein12, welches über Bradykininrezeptoren die im Rahmen der Tuberkulose an der Gewebeschädigung beteiligten Matrix-Metalloproteinasen 1 und 9 reguliert, als ein Biomarker für die Differenzierung einer aktiven Tuberkulose von einer latenten Tuberkulose identifiziert (Wang, Qu et al. 2022). Dabei zeigte Kallikrein12 bei einer aktiven Form eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zur latenten Form (Wang, Qu et al. 2022). Jedoch ist der Einsatz von bereits identifizierten Biomarkern in der klinischen Diagnostik aufgrund von fehlenden Validierungen und großangelegten Studien bisweilen eingeschränkt (Nogueira, Krishnan et al. 2022). Für die Entwicklung von zuverlässigen Diagnostikverfahren bieten Biomarker-Datenbanken eine gute Möglichkeit, verschiedenste Kandidaten zu sammeln und zu validieren, um einen effektiven Fortschritt in Richtung klinischer Anwendung zu ermöglichen (Yerlikaya, Broger et al. 2017).

2.5.2 Lepra

Bei der Lepra basiert die Diagnose auf den klinischen Symptomen und dem direkten beziehungsweise indirekten Erregernachweises (Lopes-Luz, Saavedra et al. 2023). Beim direkten Nachweisverfahren wird *Mycobacterium leprae* mikroskopisch in einem intradermalen Abstrich detektiert (Lopes-Luz, Saavedra et al. 2023). Für den indirekten Erregernachweis existieren serologische Testverfahren, bei denen spezifische Antikörper gegen das phenolische Glykolipid-I, einem Zellwandbestandteil von *Mycobacterium leprae*, nachgewiesen werden (Lopes-Luz, Saavedra et al. 2023). Durch dieses Nachweisverfahren können allerdings

Patienten mit paucibazillärer Lepra (\leq fünf Hautläsionen) im Gegensatz zu Patienten mit multibazillärer Lepra nicht zuverlässig identifiziert werden (Lopes-Luz, Saavedra et al. 2023). Diese nicht nachgewiesenen Lepra-Infektionen und jene ohne klinische Symptome stellen, wie bei der Tuberkulose und Paratuberkulose, ein besonderes Risiko für eine Transmission des Erregers auf Gesunde dar (van Hooij, Tjon Kon Fat et al. 2021). Zusätzlich kommt es aufgrund einer eingeschränkten Spezifität des Nachweisverfahrens wie bei anderen mykobakteriellen Infektionen zu falsch-positiven Ergebnissen, die mit gravierenden gesundheitlichen und sozialen Folgen für die Patienten einhergehen (Wagh, Mugudalabetta et al. 2018). Viele Studien haben in den vergangenen Jahren bereits eine Vielzahl an potenziellen Biomarkern für die Lepra-Erkrankung, unter anderem IL-1Ra und CXCL10, die im Falle einer Erkrankung eine erhöhte Expression im Blut aufwiesen, identifiziert (van Hooij, van den Eeden et al. 2019; Prakoeswa, Haningtyas et al. 2024). Dennoch bleibt auch für diese mykobakterielle Infektionskrankheit der Bedarf an weiteren potenziellen Biomarkern für einen zuverlässigen und frühen Nachweis der Infektion essentiell (Zhou, Shi et al. 2024).

2.5.3 Paratuberkulose

Die diagnostischen Nachweisverfahren der bovinen Paratuberkulose und deren Limitationen wurden in Kapitel 2.1.5 detailliert aufgezeigt. Neuere Studien beschäftigen sich mit Hilfe von Analysen des Serumproteoms mit der Identifizierung potenzieller Kandidaten für eine zuverlässige Diagnostik MAP-infizierter Tiere (Park, Park et al. 2021; Park, Park et al. 2022; Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Ein potenzieller Biomarker stellt dabei Alpha-2-Makroglobulin dar, welcher in einer Validierung mittels ELISA eine Sensitivität von 90,4 % und eine Spezifität von 100 % für die Detektion von MAP-infizierten Rindern erreicht (Park, Park et al. 2021). Alpha-2-Makroglobulin wird unter anderem von humanen Makrophagen sezerniert, ist ein Proteaseinhibitor und moduliert die Aktivität von Zytokinen wie TNF- α und IL-2 (White, Janoff et al. 1980; Cater, Wilson et al. 2019; Vandooren and Itoh 2021). Im Serum von MAP-infizierten Rindern zeigte Alpha-2-Makroglobulin eine erhöhte Expression, wobei vermutet wird, dass diese Erhöhung mit der Freisetzung von MAP-Serinproteasen und der hohen Konzentration an pro-inflammatorischen Zytokinen während einer MAP-Infektion im Zusammenhang steht (Park, Park et al. 2021).

In einer weiteren Studie wurde Fetuin als ein weiterer potenzieller Kandidat für MAP-ausscheidende Rinder detektiert, wobei Fetuin im Falle einer Infektion mit MAP im Vergleich zu gesunden Rindern eine niedrigere Abundanz aufwies (Park, Park et al. 2022). Fetuin reguliert bei Menschen den inflammatorischen Prozess, der durch eine Infektion induziert wird, indem es pro-inflammatorische Zytokine in Makrophagen moduliert (Wang and Sama 2012; Park, Park et al. 2022). In dieser Studie wurde der Infektionsstatus der Rinder anhand der Ergebnisse eines ELISAs für den Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern im Serum und einer qPCR für die Detektion von MAP in Kotproben festgelegt (Park, Park et al. 2022). In der Validierung mittels ELISA wies Fetuin beim Vergleich der gesunden Rinder, die in beiden Testverfahren negativ waren, mit MAP-infizierten Rindern, die MAP über den Kot ausschieden, aber bei denen im Serum keine MAP-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnte, eine Sensitivität von 92,6 % und eine Spezifität von 94,4 % auf (Park, Park et al. 2022). Werden jedoch alle MAP-infizierten Rinder, die in mindestens einem Nachweisverfahren ein positives Ergebnis erzielten, mit den gesunden Rindern verglichen, zeigten sich deutliche Limitationen in der Sensitivität (56,7 %) und Spezifität (93,1 %) (Park, Park et al. 2022), wodurch eine zuverlässige Detektion aller MAP-infizierten Rinder nicht gewährleistet werden kann.

Navarro Leon et al. führten an sechs, mittels Massenspektrometrie differentiell abundanten Proteinen, IGFBP2, ORM1, CFH, SERPINC1, KNG1 und LBP, eine Validierung mittels ELISA durch (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Dabei wiesen lediglich IGFBP2 (Sensitivität: 70,37 %; Spezifität: 73,08 %), ORM1 (Sensitivität: 57,4 %; Spezifität: 87,5 %) und CFH (Sensitivität: 26,41 %; Spezifität: 92,73 %) eine signifikant erhöhte Abundanz in MAP-infizierten Rindern im Vergleich zu nicht-infizierten Rindern, allerdings mit deutlichen Einschränkungen in der Sensitivität und Spezifität, auf (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Dies verdeutlicht, dass massenspektrometrisch identifizierte Kandidaten einen angemessenen Validierungsprozess durchlaufen müssen und Wechselwirkungen mit anderen Erkrankungen erkannt werden müssen, bevor sie als praxistauglich deklariert werden können (Navarro Leon, Munoz et al. 2024).

Die bisher identifizierten potenziellen Biomarker zeigen deutliche Einschränkungen hinsichtlich eines zuverlässigen Nachweises von MAP-infizierten Rindern (Park, Park et al. 2021; Park, Park et al. 2022; Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Die Identifizierung weiterer gut geeigneter Kandidaten zur Verbesserung der derzeit

verfügbaren diagnostischen Nachweisverfahren, die aufgrund geringer Sensitivität und Spezifität ein hohes Risiko der Erregerverbreitung durch vor allem subklinisch infizierte Rinder bergen, ist daher essentiell (Garvey 2020; Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Geeignete Biomarker hätten ein erhebliches Potential, eine hohe Zuverlässigkeit beim Nachweis von MAP-Infektionen zu erreichen, um eine effiziente Bekämpfung der Paratuberkulose zu ermöglichen (Alonso-Hearn, Ballesteros et al. 2023).

3 PUBLIKATION

Titel

Cathepsin S Is More Abundant in Serum of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Infected Dairy Cows

Autoren

Heidi C. Duda, Christine von Toerne, Lucia Korbonits, Andrea Didier, Armin M. Scholz, Erwin Märtlbauer, Stefanie M. Hauck, Cornelia A. Deeg

Journal

MDPI Metabolites

Status

Published.
Metabolites. 2024 Apr 11, 14(4), 215
<https://doi.org/10.3390/metabo14040215>

Article

Cathepsin S Is More Abundant in Serum of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Infected Dairy Cows

Heidi C. Duda ¹, Christine von Toerne ² , Lucia Korbonits ¹, Andrea Didier ³ , Armin M. Scholz ⁴ ,
Erwin Märtlbauer ³ , Stefanie M. Hauck ² and Cornelia A. Deeg ^{1,*} 

¹ Chair of Physiology, Department of Veterinary Sciences, Ludwig Maximilian University of Munich, D-82152 Martinsried, Germany

² Metabolomics and Proteomics Core, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health, D-85763 Neuherberg, Germany; stefanie.hauck@helmholtz-munich.de (S.M.H.)

³ Chair of Hygiene and Technology of Milk, Department of Veterinary Sciences, Ludwig Maximilian University of Munich, D-85764 Oberschleißheim, Germany; a.stockmaierdidier@lmu.de (A.D.)

⁴ Livestock Center of the Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich, D-85764 Oberschleißheim, Germany; armin.scholz@lvg.vetmed.uni-muenchen.de

* Correspondence: cornelia.deeg@lmu.de

Abstract: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of bovine paratuberculosis, a chronic granulomatous enteritis leading to economic losses and posing a risk to human health due to its zoonotic potential. The pathogen cannot reliably be detected by standard methods, and immunological procedures during the infection are not well understood. Therefore, the aim of our study was to explore host–pathogen interactions in MAP-infected dairy cows and to improve diagnostic tests. Serum proteomics analysis using quantitative label-free LC-MS/MS revealed 60 differentially abundant proteins in MAP-infected dairy cows compared to healthy controls from the same infected herd and 90 differentially abundant proteins in comparison to another control group from an uninfected herd. Pathway enrichment analysis provided new insights into the immune response to MAP and susceptibility to the infection. Furthermore, we found a higher abundance of Cathepsin S (CTSS) in the serum of MAP-infected dairy cows, which is involved in multiple enriched pathways associated with the immune system. Confirmed with Western blotting, we identified CTSS as a potential biomarker for bovine paratuberculosis. This study enabled a better understanding of procedures in the host–pathogen response to MAP and improved detection of paratuberculosis-diseased cattle.

Keywords: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; serum proteomics; quantitative label-free LC-MS/MS; immune system; host–pathogen response; Cathepsin S; bovine



Citation: Duda, H.C.; von Toerne, C.; Korbonits, L.; Didier, A.; Scholz, A.M.; Märtlbauer, E.; Hauck, S.M.; Deeg, C.A. Cathepsin S Is More Abundant in Serum of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Infected Dairy Cows. *Metabolites* **2024**, *14*, 215. <https://doi.org/10.3390/metabo14040215>

Academic Editor: Baichuan Deng

Received: 9 March 2024

Revised: 5 April 2024

Accepted: 9 April 2024

Published: 11 April 2024



Copyright: © 2024 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/>).

1. Introduction

Bovine paratuberculosis, also known as Johne’s disease, is a bacterial infectious disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), an intracellular pathogen [1,2]. Paratuberculosis manifests as a chronic granulomatous enteritis, leading to high economic losses due to reduced milk production, premature culling and decreased slaughter value [3–5]. Transmission primarily occurs fecal–orally, whereby calves are more susceptible to infection in the first few months of life [6,7]. During a long asymptomatic subclinical phase, infected cattle shed the pathogen continuously or intermittently, posing a high risk of spreading within the herd [8]. Additionally, MAP is highly resistant to environmental influences, with survival over several months in fecal excretions and soil [9].

The detection of MAP-infected cattle is problematic due to the unreliability of rapid testing methods [10]. Standard diagnostic tests for identifying infected cattle can be divided into indirect and direct pathogen detection methods [10]. The common serology-based test is the detection of MAP-specific antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) [10]. The reliable detection of MAP-infected cattle in ELISA is restricted due to its limited sensitivity and specificity, and the absent seroconversion in the subclinical phase leads to a high rate of undetected diseased cattle [10–12]. The direct pathogen detection occurs through polymerase chain reaction (PCR) or cultivation [10,11]. The PCR method is also characterized by limited sensitivity and specificity [10], whereas the cultivation as a gold standard method reveals a high specificity [11]. However, the method is time-consuming due to the slow growth of MAP, requiring cultivation for at least 8 weeks [13].

MAP has been found in various human foods, including raw and pasteurized milk [14,15], infant formula [16] and meat [17], raising concerns about its zoonotic potential. The involvement of MAP in human autoimmune diseases like Crohn's disease, type 1 diabetes and Hashimoto's thyroiditis is being discussed [18–22].

There are several different control and eradication strategies to reduce the risk of within-herd transmission, especially to cattle of susceptible age, and eliminate infected animals [23,24]. Vaccination against bovine paratuberculosis also reduces shedding of MAP and thereby decreases prevalence [25]. However, vaccination interferes with an intradermal diagnostic test of bovine tuberculosis; therefore, the vaccine is not available in most European countries [26,27]. The strategy of eliminating infected animals through testing and culling is also being pursued but only results in a limited reduction in seroprevalence [28]. To avoid MAP exposure to calves and achieve a lower prevalence of MAP infections in dairy herds, hygiene and management strategies, e.g., restricting calves' access to adult cattle and their feces, exist [29]. Nevertheless, the success of an eradication program based solely on hygiene and management strategies is limited [30].

Susceptibility and resistance to bovine paratuberculosis are associated with genetic variation in interferon gamma (IFN γ) and interleukin (IL) receptor 10, among other factors [31,32]. In a previous study, we detected two different immune phenotypes in cattle in Germany [33]. These phenotypes, characterized by different immune capacities, have previously been studied in detail with co-incubation of MAP and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from cows with negative MAP infection status and different immunophenotypes [34]. In the PBMCs of the control group, we showed a higher abundance of IL-12-mediated signaling pathways, while we observed a higher abundance of CCR4-NOT transcription complex, subunit 1 in immune deviant cows, which may promote infectious diseases by repressing MHC class II expression [34,35]. In another co-incubation study of MAP and the PBMCs of cows with different MAP infection statuses, we detected a defensive immune response of MAP-infected cows to MAP, realized by an increased abundance of the involved proteins toll-like receptor 2 and major histocompatibility complex (MHC) class II [36]. These findings underscore the complexity of the immune response to MAP and highlight the need for further investigation into factors that contribute to the persistence of MAP in cattle.

Serum proteomics is currently often used for the identification of potential disease biomarkers and the detection of immunological processes during specific diseases [37,38]. Among others, this method already revealed IL-8 and Pentaxin as potential biomarkers for bovine tuberculosis in the serum of cattle [39]. In our proteomics study, we analyzed the serum of naturally MAP-infected dairy cows and healthy controls from the same infected herd and additional controls from another uninfected herd using label-free LC-MS/MS. The primary aim of our study was to discover proteomic changes in the serum of dairy cows with different MAP infection statuses to better characterize the host–pathogen response of cattle, particularly to MAP. In addition to this, this study aimed to identify a serum biomarker for the reliable detection of MAP-infected cattle for the control of bovine paratuberculosis.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Detection of MAP Infection Status

In this study, samples from 16 dairy cows from a MAP-infected farm were used. Serum, milk and fecal samples were collected. Different standard methods for detecting MAP

were applied to categorize these cows into two groups based on their MAP infection status. Healthy controls ($n = 7$) showed no antibodies against MAP in ELISA with serum and milk samples (cattletype MAP Ab, Qiagen, Hilden, Germany; Indirect, IDVet, Grabels, France), and after cultivation of fecal samples on commercial Herrold's Egg Yolk Agars (HEYM agar, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) for 12 weeks, no bacterial growth could be observed. Cows with positive results ($n = 9$) were grouped as MAP-infected cows. For mass spectrometry analysis, the serum of seven MAP-infected cows and seven healthy controls were used. All animals were from the same farm and were kept under the same environmental conditions. For additional mass spectrometry analysis with a further control group, the serum of 21 dairy cows from an uninfected farm was examined. All cows from this farm showed negative results in ELISA with serum and milk samples. Additionally, no positive samples could ever be detected in the regularly tested fecal samples and sock swab samples from this farm. To verify differences in CTSS expression in a Western blot analysis, five dairy cows from another infected farm were examined. The MAP status of these cows was determined by cultivating fecal samples on HEYM agar for 12 weeks and conducting ELISA with serum samples. In detail, two cows were categorized as healthy controls, and three cows were categorized as MAP-infected. A comprehensive overview of the MAP infection status of the cows in each group and a schematic of the experimental design are provided in Supplementary Table S1. Sampling of whole blood by venipuncture and experimental protocols were approved by the local authority, the Government of Upper Bavaria, permit no. ROB-55.2-2532.Vet_03-17-106. No experimental animals were used in this study. All animals were kept for the purpose of milk production. Permission from the dairy farms to use the blood samples from their animals for study purposes was obtained.

2.2. Sample Digestion for Differential Proteome Analysis

The serum was proteolyzed with trypsin using the PreOmics iST Kit (PreOmics GmbH, Martinsried, Germany) according to the manufacturer's specifications. The resulting peptides were dried using SpeedVac and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until mass spectrometric analysis.

2.3. Mass Spectrometric Analysis and Label-Free Quantification

500 ng of peptides per sample was analyzed in data-independent (DIA) mode on a Q Exactive HF mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) coupled online to a RSLC (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc.) HPLC system. Samples were automatically injected and loaded onto a nano-trap column (300- μm inner diameter (ID) \times 5 mm, packed with Acclaim PepMap100 C18, 5 μm , 100 \AA ; LC Packings, Sunnyvale, CA, USA) before separation using reversed-phase chromatography (Acquity UPLC M-Class HSS T3 Column 75 μm ID \times 250 mm, 1.8 μm ; Waters, Eschborn, Germany) at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Peptides were eluted from the column at a flow rate of 250 nl/min using increasing concentrations of ACN in 0.1% formic acid from 3 to 40% over a 45 min gradient. The DIA method consisted of a survey scan from 300 to 1500 m/z at 120,000 resolution and an automatic gain control (AGC) target of $3\text{e}6$ or 120-millisecond maximum injection time. Fragmentation was carried out with higher energy collisional dissociation with a target of $3\text{e}6$ ions, determined with predictive AGC. With an AGC target of $3\text{e}6$ and automatic injection time, precursor peptides were isolated using 37 variable windows ranging from 300 to 1650 m/z at 30,000 resolution. Spectra were recorded in profile type with a normalized collision energy of 28.

DIA files were processed with Spectronaut (Version 18, Biognosys, Schlieren, Switzerland) as direct DIA analysis against the Ensembl cow database (Release 111, June 2023, 23,842 sequences) using BSG factory settings for Pulsar search. For DIA analysis, default settings were applied. For quantification, precursor filtering was set on Qvalue, the proteotypicity filter was on, and there was run wise imputing, protein LFQ method Quan2 algorithm, quantity MS level MS2, quantity type area, cross run normalization and mean top3 quantity. A ratio-based unpaired t -test was performed on the peptide level. The results were considered significant as Benjamini–Hochberg-corrected p -values at $q \leq 0.05$.

2.4. Data Analysis

Volcano plots were generated using GraphPad Prism Software (version 5.04, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A pathway enrichment analysis was conducted with open-source software ShinyGO (version 0.77, <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>, accessed on 13 December 2023). The p -value cutoff (FDR) was set to 0.05, and the best-matching species (cow) was used. The p -value for the enrichment analysis was calculated using hypergeometric distribution followed by FDR correction. A pathway analysis with open-source software Reactome (version 87, <https://reactome.org/>, accessed on 13 December 2023) was performed on human orthologues gene names. Over-representation of pathways was determined with hypergeometric distribution corrected for FDR using the Benjamini–Hochberg procedure.

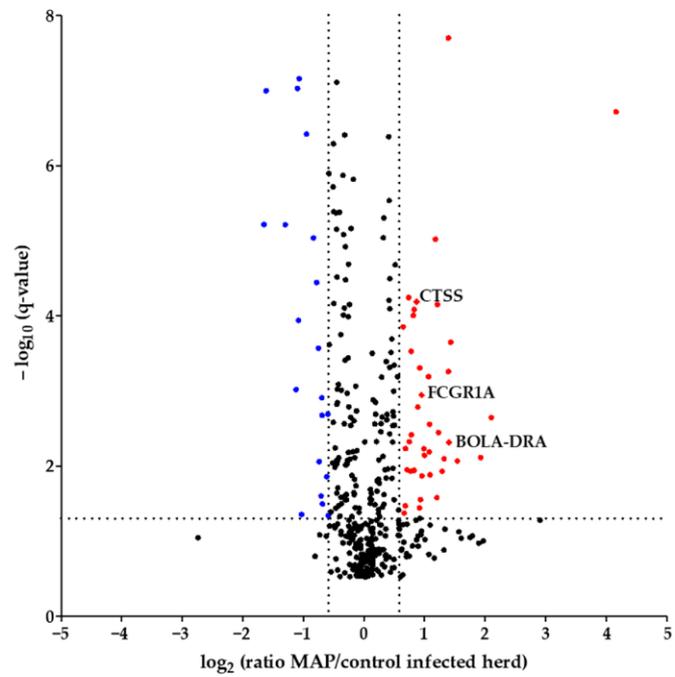
2.5. Western Blots

To 0.5 μ L serum 1 \times Laemmli-buffer (50 mM tris-HCl, 1% SDS (AppliChem, Darmstadt, Germany), 10% glycerol (SERVA, Heidelberg, Germany), 4 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), bromophenol blue (Sigma-Aldrich)) was added. Protein expression was analyzed separately for each biological replicate of controls ($n = 9$) and MAP-infected cows ($n = 12$), as well as for each technical replicate ($n = 2$). Proteins were separated with SDS-PAGE on 15% gels and blotted semi-dry onto PVDF membranes (GE Healthcare, Freiburg, Germany). To prevent unspecific binding, membranes were blocked with 4% PVP-T (Sigma-Aldrich). After washing, blots were incubated with a rabbit anti-bovine Cathepsin S polyclonal antibody (rabbit polyclonal, MyBioSource, San Diego, CA, USA; 1:600) at 4 °C overnight. After three washing steps with PBS-T (NaCl 136.9 mM (Sigma-Aldrich), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 8.1 mM (AppliChem), KH_2PO_4 1.4 mM (Sigma-Aldrich), KCl 2.6 mM (Sigma-Aldrich), 0.05% Tween 20 (AppliChem); pH 7.4), HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Fc) secondary antibody (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany; 1:10,000) preadsorbed with 5% heat-denatured bovine serum was used for incubation for one hour at room temperature. Following six washing steps, signals were detected with enhanced chemiluminescence on an Amersham Imager 680 (GE Healthcare). Quantification of Western blot signals was performed using ImageQuant TL v8.2.0 software (GE Healthcare). The Gaussian distribution was determined using the Kolmogorov–Smirnov test. Due to the non-normal distribution, statistics were performed using the Mann–Whitney test. The result was considered significant at $p \leq 0.05$. Data were processed, analyzed and visualized with GraphPad Prism software (version 5.04, GraphPad Software).

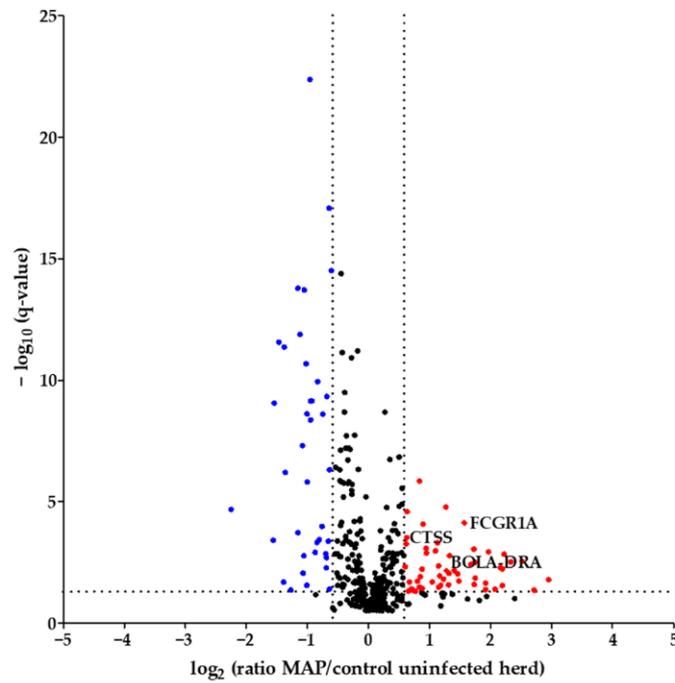
3. Results

3.1. Serum Proteomics Reveals Differentially Abundant Proteins in Serum of MAP-Infected Dairy Cows When Compared to Two Healthy Control Groups from Farms with Divergent MAP Infection Status

Using quantitative mass spectrometric analysis, we identified a total of 394 proteins in bovine serum. Of these, 60 proteins were significantly ($q \leq 0.05$) differently abundant between MAP-infected dairy cows ($n = 7$) and healthy controls ($n = 7$) from the same dairy farm. In detail, 20 proteins were more abundant in the control group, while 40 proteins showed increased abundance in MAP-infected cows (Figure 1a). Furthermore, an additional investigation was carried out with another control group comprising 21 cows from an uninfected herd. This revealed significant differential expression of 90 proteins ($q \leq 0.05$). Of these, 38 proteins were upregulated in the control group, representing healthy cows from the uninfected herd, while 52 proteins showed upregulation in the MAP-infected cows (Figure 1b).



(a)



(b)

Figure 1. Volcano plot of all 394 identified proteins. (a) Comparing MAP-infected cows with healthy controls from the same dairy farm, 40 proteins showed significantly ($q \leq 0.05$) higher abundance (fold change > 1.5 , red dots), while 20 proteins showed significantly lower abundance (fold change < 0.6 , blue dots). (b) Fifty-two proteins were significantly ($q \leq 0.05$) more abundant in MAP-infected cows compared to healthy controls from another dairy farm with MAP-uninfected status (fold change > 1.5 ,

red dots), and 38 proteins were more abundant in the control group (fold change < 0.6 , blue dots). Significantly ($q \leq 0.05$) more abundant proteins with strong associations to immune system pathways are displayed with their bovine gene names: Cathepsin S (CTSS), major histocompatibility complex, class II, DR alpha (BOLA-DRA) and Fc fragment of IgG, high-affinity Ia, receptor (FCGR1A).

Considering the proteins with higher abundance in MAP-infected dairy cows, 40 proteins were more abundant compared to healthy controls from the same infected farm, whereas 52 proteins showed higher abundance in comparison to healthy controls from another uninfected herd. Of these, 22 proteins overlapped when compared to both healthy control groups (Figure 2). The overlapping proteins included immunologically functional proteins such as “Cathepsin S” (CTSS), “major histocompatibility complex, class II, DR alpha” (BOLA-DRA) and “Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor” (FCGR1A) (Figure 1a,b).

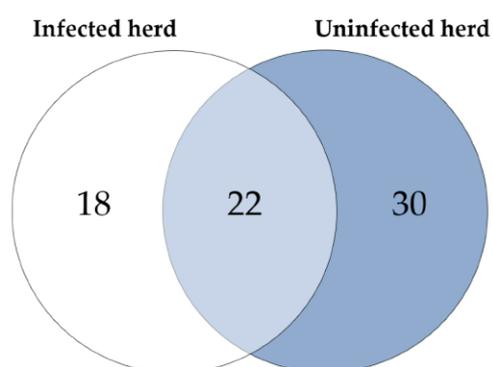


Figure 2. Significantly ($q \leq 0.05$) more abundant proteins in MAP-infected cows: 40 proteins were more abundant compared to healthy controls from the same infected herd (indicated by white and light blue) and 52 compared to healthy controls from another uninfected herd (light blue and dark blue). Of these, 22 proteins overlapped when compared to both control groups (light blue).

3.2. Proteins with Significantly Higher Abundance in MAP-Infected Cows Associate with Immune System Pathways

To gain deeper insights into the functional effects of the differentially abundant proteins, we conducted a pathway enrichment analysis of all proteins with significantly ($q \leq 0.05$) higher abundance (ratio MAP/control > 1.5) in MAP-infected cows compared to both healthy control groups using ShinyGO. This analysis revealed an enrichment of proteins in pathways associated with bacterial infections, such as “Tuberculosis” (compared to controls from the infected herd) (Figure 3a), “*Staphylococcus aureus* infection” (compared to both control groups) (Figure 3a,b) and “*Salmonella* infection” (compared to controls from the uninfected herd) (Figure 3b). Additional enrichment was observed in pathways belonging to the immune system such as “Phagosome” (compared to both control groups) (Figure 3a,b) and “Antigen processing and presentation” (compared to controls from the uninfected herd) (Figure 3b). There also was an enrichment of the pathways “Pentose phosphate pathway” (compared to controls from the infected herd) (Figure 3a) and “Apoptosis” (compared to both control groups) (Figure 3a,b).

Further pathway analysis using Reactome confirmed an association with immune system pathways, showing enrichment in all three major subdomains: “Adaptive Immune System”, “Innate Immune System” and “Cytokine Signaling Immune System” of Reactome superpathway “Immune System” compared to both control groups (Figure 4). Specifically, we identified over-representation in pathways “MHC class II antigen presentation”, “Endosomal/Vacuolar pathway”, “Neutrophil degranulation”, “Gene and protein expression by JAK-STAT signaling after Interleukin-12” and “Interferon Signaling” with “Interferon gamma signaling” (Figure 4a,b). Pathways in MAP-infected cows that were enriched only in comparison to healthy controls from the same infected herd were “Butyrophilin (BTN) family interactions”, “Antigen activates B Cell Receptor (BCR) leading to generation of

second messengers”, “CD22 mediated BCR regulation”, “Fcγ receptor (FCGR) dependent phagocytosis” with “Role of phospholipids in phagocytosis”, “FCGR activation” and “Regulation of actin dynamic for phagocytic cup formation”, “Transfer of LPS from LBP carrier to CD14” and “Classical antibody-mediated complement activation” (Figure 4a). In contrast, compared to healthy controls from another uninfected herd, the pathways “PKR-mediated signaling” and “Regulation of Complement cascade” were enriched in MAP-infected cows. (Figure 4b).

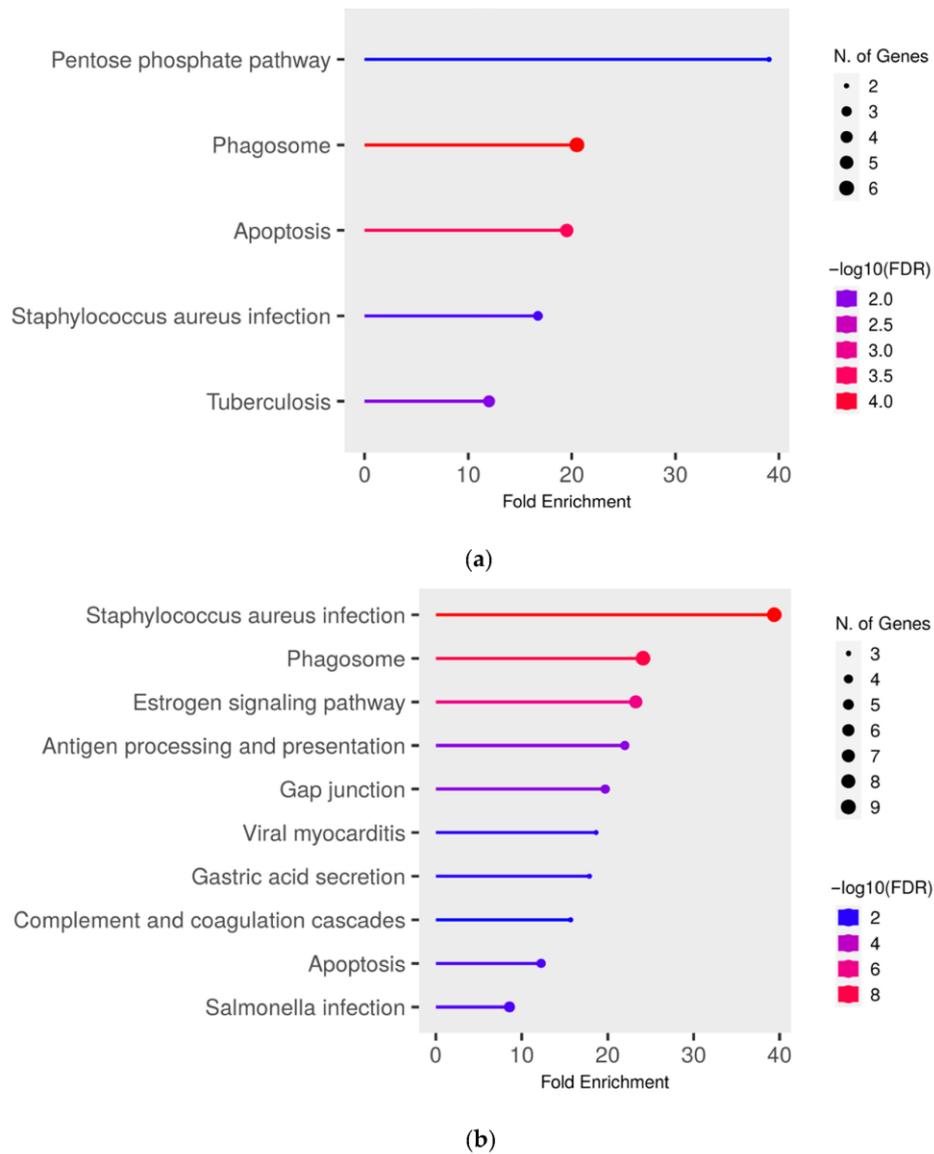
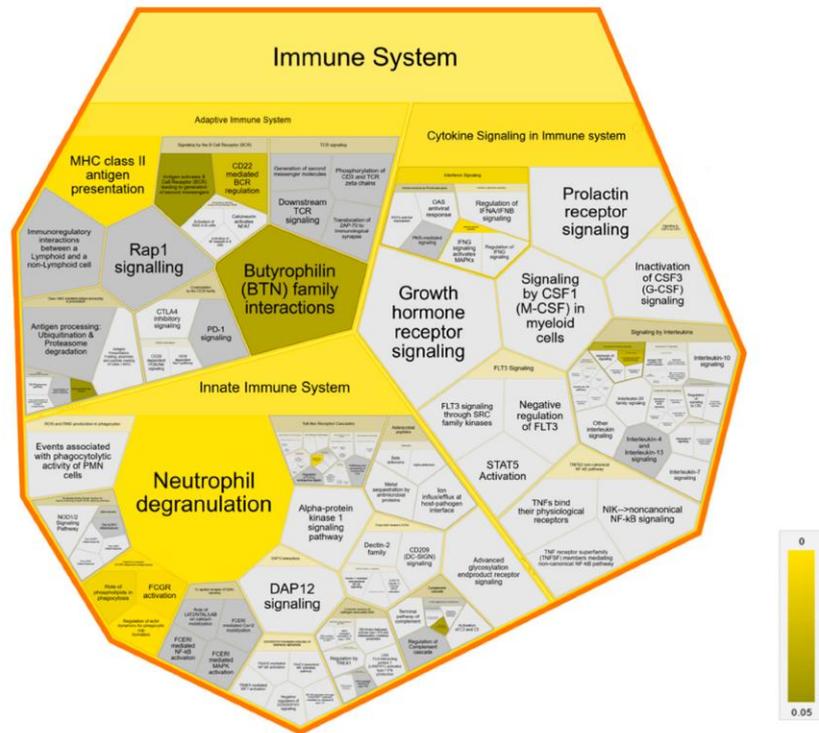
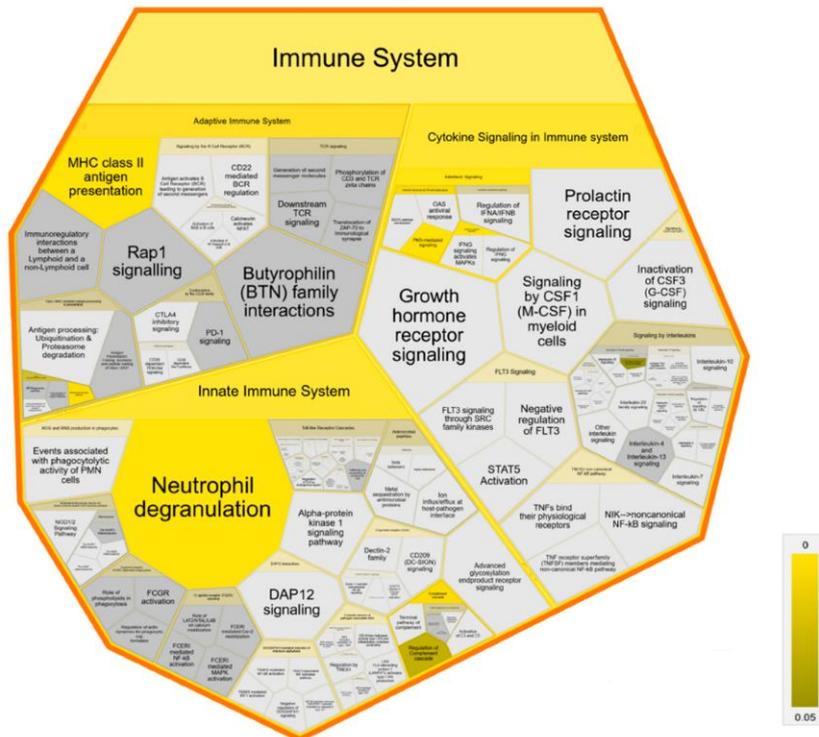


Figure 3. Pathway enrichment analysis of significantly ($q \leq 0.05$) higher abundant proteins in MAP-infected cows compared to (a) healthy controls from the same infected herd and (b) healthy controls from another uninfected herd. Functional enrichment displays the ten most significant categories of all available gene sets. Hierarchical clustering was conducted using ShinyGO v0.77. The y-axis lists the assigned pathways in order of the enrichment of fold change ratio (FCR). The x-axis shows the FDR values for the enrichment of the respective pathways. The color chart shows fold enrichment for each pathway, with the size of dots corresponding to the number of genes associated with each pathway. Pathway enrichment analysis was conducted with bovine gene names.



(a)



(b)

Figure 4. Voronoi diagram illustrating Reactome analysis results of enriched pathways in MAP-infected

dairy cows compared to (a) healthy controls from the same infected herd and (b) healthy controls from another uninfected herd. The enlarged polygon of Reactome superpathway “Immune System” is shown. Pathway enrichment analysis was conducted with human orthologue gene names of proteins with significantly ($q \leq 0.05$) higher abundance in MAP-infected dairy cows (ratio MAP/control > 1.5). Color intensity represents the p -value ($p \leq 0.05$) of the statistical test for over-representation, as illustrated by the color bar. Polygons colored in dark grey visualize pathways without significant over-representation ($p > 0.05$), while light grey areas represent pathways without related proteins.

3.3. CTSS Involved in Pathways with Strong Association to the Immune System

To delve deeper into the detected pathways, we examined the significantly upregulated proteins ($q \leq 0.05$, ratio MAP/control > 1.5) in MAP-infected cows and the enriched pathways in which they were involved. We found that CTSS was participating in multiple pathways belonging to both the adaptive immune system, such as “MHC class II antigen presentation”, and the innate immune system, such as “Neutrophil degranulation” (Table 1). Additionally, CTSS was involved in the disease pathway “Tuberculosis” and programmed cell death pathway “Apoptosis”. The function of CTSS in multiple enriched pathways was observed in comparison to both control groups. All enriched proteins associated with the respective pathway and the total number of genes in each pathway are listed in Table 1.

Table 1. Significantly ($q \leq 0.05$) abundant proteins involved in significantly ($p \leq 0.05$) enriched pathways in the serum of MAP-infected dairy cows compared to healthy controls from the same infected herd and also to another uninfected herd. Superordinate pathways consisting of one or more individual pathways were excluded.

Comparison Group	Enriched Pathway	Pathway Genes Total	Proteins
Healthy controls (Infected herd)	Pentose phosphate pathway	28	GPI, ALDOA
	Phagosome	160	ACTG1, FCGR1A, HLA-DRA, CTSS, TUBA4A, SFTPD
	Apoptosis	140	ACTG1, CTSC, SEPTIN4, CTSS, TUBA4A
	<i>Staphylococcus aureus</i> infection	98	FCGR1A, HLA-DRA, KRT25
	Tuberculosis	182	FCGR1A, HLA-DRA, LBP, CTSS
	Neutrophil degranulation	478	GPI, CRISP3, HP, ALDOA, PGLYRP1, PRDX6, CTSS, CTSC
	MHC class II antigen presentation	137	HLA-DRA, TUBA4A, CTSS, CTSC
	Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation	158	IGKC, FCGR1A, IGKV2-30, ACTG1
	Interferon gamma signaling	177	HLA-DRA, FCGR1A
	FCGR activation	103	IGKC, FCGR1A, IGKV2-30
	Role of phospholipids in phagocytosis	129	IGKC, FCGR1A, IGKV2-30
	Transfer of LPS from LBP carrier to CD14	3	LBP
	CD22 mediated BCR regulation	72	IGKC, IGKV2-30
	Gene and protein expression by JAK-STAT signaling after Interleukin-12	73	LCP1
	Butyrophilin (BTN) family interactions	12	PPL
	Classical antibody-mediated complement activation	97	IGKC, IGKV2-30
	Antigen activates B Cell Receptor (BCR) leading to generation of second messengers	103	IGKC, IGKV2-30
	Endosomal/Vacuolar pathway	15	CTSS

Table 1. Cont.

Comparison Group	Enriched Pathway	Pathway Genes Total	Proteins
Uninfected herd	<i>Staphylococcus aureus</i> infection	98	KRT17, KRT14, FCGR1A, HLA-DRA, MASP1, KRT10, KRT25, KRT24
	Phagosome	160	ACTG1, TUBB, FCGR1A, HLA-DRA, CTSS, TUBB1, HLA-G, TUBA4A, SFTPD
	Estrogen signaling pathway	129	ADCY6, KRT17, KRT14, KRT10, HSPA1A, KRT25, KRT24
	Antigen processing and presentation	78	HLA-DRA, CTSS, HLA-G, HSPA1A
	Gap junction	87	ADCY6, TUBB, TUBB1, TUBA4A
	Viral myocarditis	69	ACTG1, HLA-DRA, HLA-G
	Gastric acid secretion	72	ADCY6, ACTG1, CA2
	Complement and coagulation cascades	82	PROCR, MASP1
	Apoptosis	140	ACTG1, CTSC, CTSS, TUBA4A
	<i>Salmonella</i> infection	250	TXN, ACTG1, TUBB, TUBB1, TUBA4A
	Neutrophil degranulation	478	SERPINA3, SERPINB1, TUBB5, CRISP3, COTL1, HBB, LYZ, PRDX6, CTSS, CTSC, HSPA1A
	MHC class II antigen presentation	137	TUBB5, TUBB1, HLA-DRA, TUBA4A, CTSS, CTSC
	Interferon gamma signaling	177	HLA-DRA, FCGR1A, HLA-G
	PKR-mediated signaling	88	TUBB5, TUBB1, TUBA4A, HSPA1A
	Endosomal/Vacuolar pathway	15	HLA-G, CTSS
	Regulation of Complement cascade	139	CFH, MASP1
	Gene and protein expression by JAK-STAT signaling after Interleukin-12 stimulation	73	LCP1

Column 1 (control group) indicates the control group to which the comparison was made. Column 2 (enriched pathway) contains the names of enriched pathways in ShinyGO analysis or in Reactome analysis. Column 3 (pathway genes total) displays the total number of genes in each pathway. Column 4 (proteins) shows the proteins in human orthologues gene names clustering to the enriched pathways.

3.4. Detection of Increased Abundance of CTSS in Serum of MAP-Infected Dairy Cows Using LC-MS/MS and Western Blotting

In the serum of MAP-infected dairy cows, we observed a 1.8 higher abundance of CTSS ($q = 0.0001$) compared to healthy controls from the same infected herd and a 1.5-fold increase in CTSS ($q = 0.0005$) compared to healthy controls from another uninfected herd using LC-MS/MS analysis. Confirmation of the observed elevated abundance of CTSS using Western blotting revealed a 3.4-fold enrichment of CTSS ($p = 0.008$) in the serum of MAP-infected dairy cows compared to healthy controls (Figure 5).

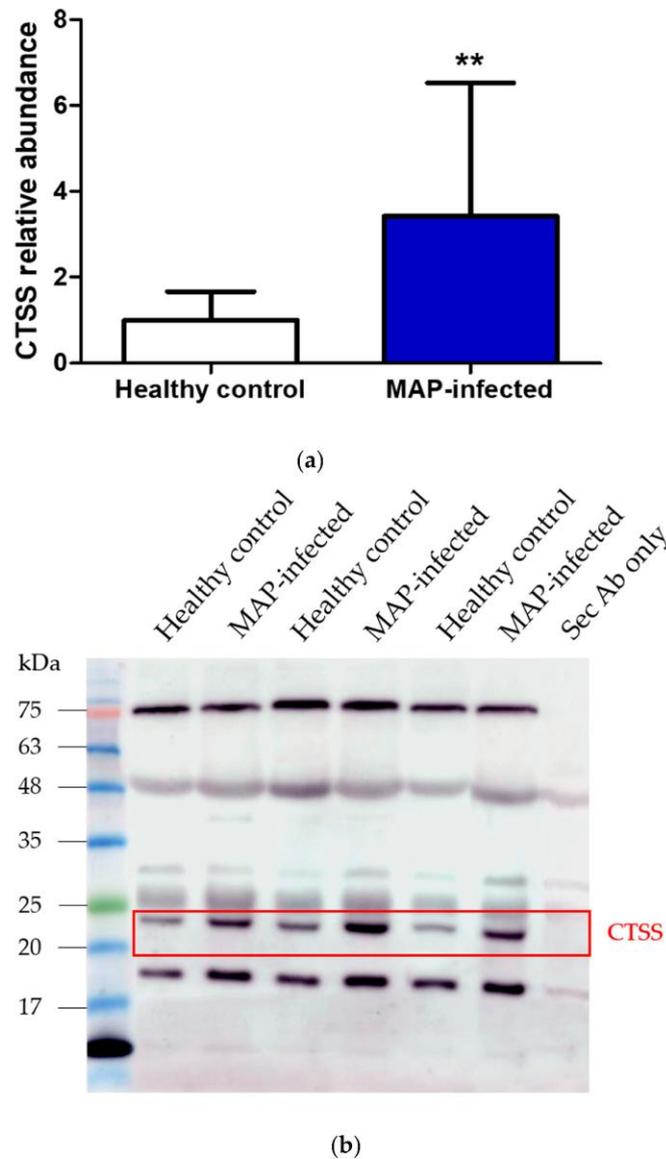


Figure 5. Elevated CTSS abundance was verified and quantified with Western blotting. (a) CTSS expression was significantly (** $p \leq 0.01$) increased in serum of MAP-infected dairy cows ($n = 12$, blue column) compared to healthy controls ($n = 9$, white column, set to factor 1). (b) Representative Western blot showed higher abundance of CTSS in serum of MAP-infected dairy cows compared to healthy controls.

4. Discussion

Paratuberculosis is a severe and incurable disease that affects cattle and other ruminants, leading to significant economic losses [4,40,41]. Moreover, due to the spreading of MAP and its potential entry into the food chain, it poses a risk to human health [22]. Therefore, in accordance with the One Health approach, there is a pressing need to deepen our understanding of the immune response of cattle to MAP and to improve diagnostic methods for reliable disease detection. Serum is a commonly used biological material for diagnostic procedures and offers valuable insights into immune response through the examination of metabolites and proteins [42].

In this study, we identified differently abundant proteins in the serum of MAP-infected dairy cows and controls from herds with divergent MAP infection status. We assumed that the control group from the infected herd had been exposed to MAP but had remained uninfected, whereas the control group from the uninfected herd had never had contact with the pathogen. This allowed us to discern differences in host–pathogen interactions and detect immune reactions essential for the successful elimination of MAP.

The pathway enrichment analysis revealed an association of significantly higher abundant proteins with immune system-related pathways. Notably, the pathway “Fcγ receptor (FCGR) dependent phagocytosis” and all its subordinated pathways “Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation”, “FCGR activation” and “Role of phospholipids in phagocytosis” were enriched in MAP-infected cows compared to healthy controls from the infected herd (Figure 3a). None of these pathways were enriched in comparison to the control group from the uninfected herd (Figure 3b). These findings suggest a potential influence of the “Fcγ receptor (FCGR) dependent phagocytosis” pathway on susceptibility to bovine paratuberculosis.

Since MAP enters the organism through phagocytosis by macrophages, the inhibition of this pathway might hinder MAP persistence within the organism. This may be a crucial insight because the exact mechanisms enabling MAP survival within host cells remain elusive. The agent is suspected of persisting inside the phagosomes within these cells, as has already been proven for *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) [43,44]. The exact mechanisms enabling MAP survival are unknown, but it is assumed that MAP prevents maturation and acidification of the phagosome and blocks phagolysosome fusion, as shown for Mtb [43–45]. Consequently, the phagocytosis of MAP is a critical factor of infection.

The functional enrichment of “FCGR dependent phagocytosis” in MAP-infected cows compared to healthy cows from the infected herd showed that inhibition of this pathway might contribute to overcoming the persistence of MAP in the organism. In this enriched pathway group, the higher abundant protein FCGR1A, also known as CD64, in MAP-infected cows compared to both control groups (Figure 1), was described in several studies of *Mycobacteriaceae*-induced diseases [46–49]. In cattle, FCGR1A is expressed in leukocytes, especially in macrophages [50]. Soluble FCGR1A was detected in human serum [51]. We are the first to describe FCGR1A in bovine serum.

The function of FCGR1A in cattle has not been fully researched. However, in humans, it is involved in various immune effects, such as phagocytosis, production of reactive oxygen species, cytokine expression and antigen presentation [52]. Studies have demonstrated an increase in FCGR1A expression in the transcriptome of ileocaecal lymph nodes in sheep diseased with paratuberculosis [46]. So far, the significance of the increase in FCGR1A in bovine paratuberculosis is unknown. A study with tissue samples of cows with bovine tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* (Mb) showed the involvement of FCGR1A in the immune response against Mb [47]. In the peripheral blood of human children with intrathoracic tuberculosis induced by Mtb, FCGR1A levels correlated with the extent of the disease [48]. An increase in high-affinity FCGR1 expression could be induced with IFN γ in humans [53]. Based on an increased level of IFN γ in paratuberculosis-diseased cattle [54], we suspected an IFN γ -induced expression of FCGR1A in cattle and the extracellular shedding of soluble CD64.

Due to an improved control of Mtb in FCGR1-knockout mice [49] and a decrease in FCGR1A concentrations after anti-tuberculosis treatment in humans [48], we hypothesized that soluble FCGR1A had a negative impact on the immune response to MAP and facilitated their intracellular survival by interacting with soluble immune complexes and blocking Fc-dependent immune reactions [55]. Another soluble isoform of FCGR, soluble FCGR2b, inhibited antibody production in murine spleen cells [56], which could be transferred to soluble CD64, resulting in an additional impairment of adaptive immune response.

The effects of soluble FCGR1A in immune response, especially against MAP, should be explored more closely. Above all, new insights into its impact on susceptibility to bovine paratuberculosis could arise. However, in terms of its suitability as a specific biomarker

for *Mycobacteriaceae*-induced diseases, especially bovine paratuberculosis, FCGR1A is not suitable due to its characterization as a diagnostic biomarker of infection and sepsis in humans [57,58].

Enriched pathway analysis provided an over-representation of “neutrophil degranulation” in MAP-infected cows compared to both healthy control groups (Figure 4a,b). The role of neutrophils in bovine paratuberculosis is still unknown. Neutrophils are highly effective cells of the innate immune system and kill microorganisms through various functions, including phagocytosis, degranulation, production of reactive oxygen species (ROS) and neutrophil extracellular trap (NET) release [59]. An increased migration of neutrophils in lesions at the early stages of the infection with MAP was shown in experimentally infected calves [60]. In a gene ontology analysis of long non-coding RNA target genes in macrophages of cattle with paratuberculosis, an enrichment of biological processes associated with neutrophils was found [61].

After analyzing the proteins involved in the enriched pathway “neutrophil degranulation” including peroxiredoxin 6 (PRDX6), cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP3) and Cathepsin C (CTSC) (Table 1), it is evident that they cover various neutrophil functions. During neutrophil activation in humans, PRDX6 translocates to the plasma membrane and increases the production of ROS [62]. CRISP3 was found in granules of human neutrophils, which could suggest an antimicrobial role of CRISP3 in innate immune responses [63]. Furthermore, human CTSC is essential for optimal NET formation [64]. In a strong innate response to MAP, caprine neutrophils use all their effector functions—phagocytosis, chemotaxis, degranulation and NET release [65]. Oral vaccination against MAP in a rabbit infection model stimulated the phagocytosis rate of neutrophils and additionally increased NET release against MAP and non-related pathogens [66].

The involvement of neutrophils and their effector functions in early and advanced stages of bovine paratuberculosis is confirmed by these findings and the over-represented neutrophil degranulation in our pathway enrichment analysis. We put forward the hypothesis that the immune system of MAP-infected cattle attempts to combat the disease through increased activation of neutrophils, but the immunological functions of neutrophils are not effective in the host defense against MAP. MAP can escape the NETs by degrading NETs through an extracellular DNase, which promotes the colonization of MAP and the formation of granulomas in mice [67]. Additionally, bovine neutrophils are effective in killing and defending against MAP, but in the presence of macrophages, the killing rate worsens, and levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8 are lower, leading to fewer pathological injuries [68].

These studies support our hypothesis and even describe a worsening of the disease due to neutrophil effector functions. Further research should analyze the mechanism of the host–pathogen immune response of neutrophils against MAP and their possible influence on the degradation of bovine paratuberculosis.

In our proteomics study, we detected a higher abundance of CTSS in the serum of MAP-infected dairy cows compared to both healthy control groups (Figure 1a,b). Pathway enrichment analysis revealed the involvement of CTSS in multiple enriched pathways. The involvement of CTSS in enriched pathways was observed in comparison to both healthy control groups (Table 1), leading us to select CTSS as a candidate for a biomarker in paratuberculosis-infected cattle. CTSS is a lysosomal cysteine peptidase, primarily found in immune cells, including professional antigen-presenting cells, B-cells, dendritic cells and macrophages. It plays a role in extracellular matrix remodeling and regulates MHC class II antigen presentation [69]. Thereby, CTSS proteolyzed the MHC class II-associated chaperone invariant chain Ii and produced class II invariant chain peptide (CLIP) [70,71]. The CLIP fragment is exchanged for antigenic peptide fragments, and the peptide-loaded MHC class II is transported to the plasma membrane where it will be recognized by CD4⁺ T cells [70,71].

In an in vitro study with human macrophages, infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin (BCG) induced the inhibition of CTSS with IL-10 and consequently

reduced MHC class II antigen presentation [72]. In contrast, the infection with a BCG strain that secreted active human CTSS led to an increased MHC class II mycobacterial antigen presentation on the surface of macrophages [73], which shows that BCG does not directly inhibit MHC class II presentation, but its expression is dependent on CTSS. In contrast to infection with lower pathogen vaccine strain BCG, we detected a higher abundance of CTSS in MAP-infected dairy cows (Figure 1a,b). We infer that the expression of CTSS could correlate with the pathogenicity of *Mycobacteriaceae*.

In addition to a higher abundance of CTSS, we could detect a higher abundance of bovine MHC class II (BOLA-DRA), which indicates a correlation of CTSS with expression of MHC class II antigen presentation. IL-10 expression by bovine macrophages was also reported in an in vitro infection assay with MAP, where neutralization of IL-10 resulted in an elevated killing rate of MAP, increased expression of tumor necrosis factor alpha, IL-8, IL-12 and MHC class II, higher rate of phagosome acidification and apoptotic cells [74]. This led to the hypothesis that IL-10 also inhibited the expression of CTSS in bovine macrophages, causing an inferior antigen presentation at the plasma membrane, phagosome acidification and apoptosis rate, where CTSS could be assigned to the corresponding pathways (Table 1). Interestingly, the pathway “MHC class II antigen presentation”, also associated with CTSS and BOLA-DRA, was enriched in the serum of MAP-infected cows compared to both healthy control groups (Table 1).

In vitro, MAP-infected bovine macrophages showed downregulation of MHC class II expression, which appears to be a strategy of MAP to secure their survival by inhibiting efficient mycobacterial antigen presentation to T cells [75]. In our previous in vitro study with PBMCs co-incubated with MAP, we observed a higher abundance of MHC class II complex proteins in MAP-resistant cows compared to persistently MAP-infected cattle [36], which describes an association of the expression of MHC class II with resistance to MAP. In our serum proteome analysis, we detected a higher abundance of BOLA-DRA in the serum of MAP-infected cows compared to both healthy control groups (Figure 1a,b).

The macrophages of mice infected with Mtb or BCG shedded MHC class II in plasma membrane-derived microvesicles and exosomes in an ATP-dependent manner [76]. Both organelles were able to present peptide-MHC class II complexes to T cells [76]. This study reveals an alternative process of an effective antigen presentation in mycobacterial infections. We hypothesize that in cattle infected with MAP, MHC class II is expressed at a lower level on the plasma membrane of antigen-presenting cells but is instead released in high amounts into the extracellular space for an alternative MAP-antigen presenting mechanism. Additional in vitro studies are necessary for characterizing the function of exosomes and microvesicles in mycobacterial antigen presentation in cows.

For the first time, we described a higher abundance of CTSS in serum in association with bovine paratuberculosis. We cannot yet explain why CTSS was secreted to a higher degree in the extracellular space in paratuberculosis-diseased cattle, but there could be a context of MHC class II in exosomes and microvesicles and the possible alternative mechanism of antigen presentation. So far, the mechanism of secretion and the function of extracellular CTSS in bovine host immune response to MAP are still unknown and need further investigation.

In our pathway enrichment analysis, CTSS, BOLA-DRA and FCGR1A revealed a strong association with immune system pathways, whereby we chose them as potential candidates. In relation to clinical practice, the comparison between MAP-infected dairy cows and healthy controls from the same infected herd was more relevant. In this group comparison, CTSS showed the highest q -value of all these three proteins. Therefore, we chose CTSS, which provides the best conditions for a potential biomarker for bovine paratuberculosis to be validated.

In our Western blot analysis, we loaded samples based on volume to validate our findings in a context relevant to potential practical applications. Although we performed normalization based on equal total protein content in our proteomics assay, we still observed a significantly higher abundance of CTSS in the serum of MAP-infected dairy cows using

Western blotting (Figure 5a,b). We detected CTSS at a lower molecular weight, as expected, in recombinant CTSS expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). However, the molecular weight of naturally occurring proteins can be altered due to post-translational modifications [77], that do not occur in *E. coli*-expressed proteins [78]. The mature enzymatically active form of human CTSS has 24 kDa, lower than that of inactive CTSS [79]. Therefore, we hypothesized an enzymatic activity of CTSS secreted into the extracellular space.

Verification of CTSS using Western blotting promotes the practical utilization of extracellular CTSS as a potential biomarker for bovine paratuberculosis, including the development of a simple lateral flow assay. Nevertheless, there could be potential limitations in the use of CTSS as a biomarker regarding interindividual variability in MAP-infected dairy cows observed with Western blotting (Figure 5a) and the potential association of extracellular CTSS with other diseases. Therefore, it is essential to examine the expression of the protein in relation to the stage of the disease and its association with other mycobacterial- and non-mycobacterial-induced diseases in further investigations. So far, it is very rare that a biomarker cannot also be associated with other diseases [80].

Serum is an easily obtainable biological sample and reveals a high amount of information on the pathophysiological conditions in diseased animals [38]. However, the analysis of the serum proteome is challenged and limited due to the wide dynamic range of the proteins in it [38]. Compared to mass spectrometry, the proximity extension assay (PEA) as a novel technology has revealed a more sensitively targeted immunoassay [81]. However, due to the restricted offering of target products, PEA is not yet applicable for the analysis of bovine samples. Nevertheless, we will actively monitor advancements in technology and explore other emerging methodologies for their potential application in the analysis of bovine samples. As new technologies develop and become more accessible, we aim to reassess their suitability for the identification of better disease biomarkers.

Our quantified mass spectrometry analysis identified a total of 394 proteins in bovine serum, of which 70 were significantly differently abundant in the serum of MAP-infected dairy cows compared to healthy controls. A further study only revealed a significantly divergent abundance of eight proteins in the plasma of MAP-infected cattle [82]. In this study, differentially expressed proteins in a 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis were analyzed with mass spectrometry [82]. This methodic procedure differed strongly from our enhanced label-free analyses and had, therefore, led to a limited number of identified proteins. Another serum proteomics study already detected 669 quantified proteins in bovine serum, of which only nine proteins showed significantly different abundances in MAP-infected cattle compared to the control group [83]. One of these nine proteins, fetuin B, also showed a significantly different abundance in our study. Due to the association of these already detected biomarkers with other diseases [84–88], there is still a need for suitable biomarkers of bovine paratuberculosis.

In clinical medicine, no single laboratory parameter should be used for the diagnosis of a disease without considering clinical parameters. However, a specific biomarker can contribute to an improvement in diagnostic tests. To ensure this, a cohort study with all already detected potential biomarkers for bovine paratuberculosis in serum or plasma needs to be conducted. It would also be interesting to research their correlation with other parameters, including disease stage and antibody levels. In addition to CTSS, our serum proteomics analysis revealed 69 other potential biomarkers that could also be further investigated, since it was shown that for some diseases they can be described through biomarker panels, not only one biomarker [89]. For the development of a suitable panel, our candidates identified in this study are available in PRIDE [90].

5. Conclusions

Our differential serum proteomics study reveals valuable new insights into the molecular mechanisms underlying host–pathogen interactions in MAP-infected cattle. Identifying CTSS as a potential biomarker provides a promising avenue for developing more effective

diagnostic tools for bovine paratuberculosis, thereby contributing to efforts to combat bovine paratuberculosis.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo14040215/s1>, Table S1: Schematic of the experimental design.

Author Contributions: Conceptualization, S.M.H. and C.A.D.; methodology, H.C.D., C.v.T., L.K., A.D., S.M.H. and C.A.D.; formal analysis, H.C.D., C.v.T. and S.M.H.; investigation, H.C.D., C.v.T., L.K., S.M.H. and C.A.D.; resources, A.M.S.; writing—original draft preparation, H.C.D.; writing—review and editing, C.v.T., A.M.S., S.M.H. and C.A.D.; visualization, H.C.D.; supervision, C.A.D.; project administration, C.A.D.; funding acquisition, E.M. and 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, the Government of Upper Bavaria, Munich (permit no. ROB-55.2-2532.Vet_03-17-106).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The mass spectrometry proteomics data presented in this study have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [90] partner repository (<https://www.ebi.ac.uk/pride>, accessed on 21 December 2023) with the dataset identifier PXD048042.

Acknowledgments: The authors thank Amelie Fleischer for the critical discussion and Lydia Hoffmann for excellent technical support. The graphical abstract was created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of this study, the collection, analyses, or interpretation of data, the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Richards Vincent, P.; Nigsch, A.; Pavinski Bitar, P.; Sun, Q.; Stuber, T.; Ceres, K.; Smith Rebecca, L.; Robbe Austerman, S.; Schukken, Y.; Grohn Yrjo, T.; et al. Evolutionary Genomic and Bacterial Genome-Wide Association Study of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and Dairy Cattle Johne's Disease Phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87*, e02570-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rees, W.D.; Lorenzo-Leal, A.C.; Steiner, T.S.; Bach, H. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis Infects and Replicates within Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Microorganisms* **2020**, *8*, 994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Buergelt, C.D.; Hall, C.; McEntee, K.; Duncan, J.R. Pathological Evaluation of Paratuberculosis in Naturally Infected Cattle. *Vet. Pathol.* **1978**, *15*, 196–207. [[CrossRef](#)]
4. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mohammed, T.; Mamo, G.; Zewude, A.; Sirak, A.; Gumi, B.; Ameni, G. Prevalence of paratuberculosis in cattle based on gross and microscopic lesions in Ethiopia. *BMC Vet. Res.* **2023**, *19*, 203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sweeney, R.W. Transmission of Paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **1996**, *12*, 305–312. [[CrossRef](#)]
7. Windsor, P.A.; Whittington, R.J. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.* **2010**, *184*, 37–44. [[CrossRef](#)]
8. Nielsen, S.S. Transitions in diagnostic tests used for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infections in cattle. *Vet. Microbiol.* **2008**, *132*, 274–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Whittington Richard, J.; Marshall, D.J.; Nicholls Paul, J.; Marsh Ian, B.; Reddacliff Leslie, A. Survival and Dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2989–3004. [[CrossRef](#)]
10. Field, N.L.; Mee, J.F.; McAloon, C.G. Characteristics (sensitivity and specificity) of herd-level diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle—A systematic review. *Vet. J.* **2022**, *279*, 105786. [[CrossRef](#)]
11. Nielsen, S.S.; Toft, N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.* **2008**, *129*, 217–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Magombedze, G.; Shiri, T.; Eda, S.; Stabel, J.R. Inferring biomarkers for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection and disease progression in cattle using experimental data. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44765. [[CrossRef](#)]
13. Schwalm, A.K.; Obiegala, A.; Pfeffer, M.; Sting, R. Enhanced sensitivity and fast turnaround time in laboratory diagnosis for bovine paratuberculosis in faecal samples. *J. Microbiol. Methods* **2018**, *152*, 39–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gerrard, Z.E.; Swift, B.M.C.; Botsaris, G.; Davidson, R.S.; Hutchings, M.R.; Huxley, J.N.; Rees, C.E.D. Survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in retail pasteurised milk. *Food Microbiol.* **2018**, *74*, 57–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Shankar, H.; Singh, S.V.; Singh, P.K.; Singh, A.V.; Sohal, J.S.; Greenstein, R.J. Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR, and PCR-REA methods. *Int. J. Infect. Dis.* **2010**, *14*, e121–e126. [[CrossRef](#)]
16. Botsaris, G.; Swift, B.M.C.; Slana, I.; Liapi, M.; Christodoulou, M.; Hatzitofi, M.; Christodoulou, V.; Rees, C.E.D. Detection of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in powdered infant formula by phage-PCR and confirmed by culture. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *216*, 91–94. [[CrossRef](#)]
17. Okura, H.; Toft, N.; Pozzato, N.; Tondo, A.; Nielsen, S.S. Apparent Prevalence of Beef Carcasses Contaminated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Sampled from Danish Slaughter Cattle. *Vet. Med. Int.* **2011**, *2011*, 152687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Noli, M.; Meloni, G.; Manca, P.; Cossu, D.; Palermo, M.; Sechi, L.A. HERV-W and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Are at Play in Pediatric Patients at Onset of Type 1 Diabetes. *Pathogens* **2021**, *10*, 1135. [[CrossRef](#)]
19. Moghadam, M.; Ghaemi, E.A.; Akbari, H.; Razavi Nikoo, H.; Zamani, S. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and Hashimoto's thyroiditis: Is MAP the trigger? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 972929.
20. Estevinho, M.M.; Cabeda, J.; Santiago, M.; Machado, E.; Silva, R.; Duro, M.; Pita, I.; Morais, R.; Macedo, G.; Bull, T.J.; et al. Viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Colonizes Peripheral Blood of Inflammatory Bowel Disease Patients. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1520.
21. Espescht, I.F.; Bastos, D.S.S.; Fonseca Junior, A.; Cardoso, S.A.; Ferrari, M.L.A.; Moreira, M.A.S. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and Crohn's disease: Characterization of the interaction with different aspects of the disease. *Braz. J. Microbiol.* **2023**, *54*, 1239–1249. [[CrossRef](#)]
22. Dow, C.T.; Alvarez, B.L. *Mycobacterium paratuberculosis* zoonosis is a One Health emergency. *EcoHealth* **2022**, *19*, 164–174. [[CrossRef](#)]
23. 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. [[CrossRef](#)]
24. Matthews, C.; Cotter, P.A.-O.; O'Mahony, J. MAP, Johne's disease and the microbiome; current knowledge and future considerations. *Anim. Microbiome* **2021**, *3*, 34. [[CrossRef](#)]
25. Phanse, Y.; Wu, C.-W.; Venturino, A.J.; Hansen, C.; Nelson, K.; Broderick, S.R.; Steinberg, H.; Talaat, A.M. A Protective Vaccine against Johne's Disease in Cattle. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Köhler, H.; Gyra, H.; Zimmer, K.; Dräger, K.G.; Burkert, B.; Lemser, B.; Hausleithner, D.; Cußler, K.; Klawonn, W.; Heß, R.G. Immune Reactions in Cattle after Immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* Vaccine and Implications for the Diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* Infections. *J. Vet. Med. Ser. B* **2001**, *48*, 185–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Garrido, J.M.; Vazquez, P.; Molina, E.; Plazaola, J.M.; Sevilla, I.A.; Geijo, M.V.; Alonso-Hearn, M.; Juste, R.A. Paratuberculosis Vaccination Causes Only Limited Cross-Reactivity in the Skin Test for Diagnosis of Bovine Tuberculosis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. 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. [[CrossRef](#)]
29. Arango-Sabogal, J.C.; Paré, J.; Labrecque, O.; Côté, G.; Roy, J.P.; Buczinski, S.; Wellemans, V.; Fecteau, G. Incidence of fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cows before and after the enrolment in the Québec voluntary program. *Prev. Vet. Med.* **2017**, *148*, 94–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Mazzone, P.; Di Paolo, A.; Petrucci, L.; Torricelli, M.; Corneli, S.; Sebastiani, C.; Ciullo, M.; Sebastianelli, M.; Costarelli, S.; Scoccia, E.; et al. Evaluation of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Associated with Genetic Resistance to Bovine Paratuberculosis in *Marchigiana* Beef Cattle, an Italian Native Breed. *Animals* **2023**, *13*, 587. [[CrossRef](#)]
32. Gopi, B.; Vir Singh, R.; Kumar, S.; Kumar, S.; Chauhan, A.; Sonwane, A.; Kumar, A.; Bharati, J.; Vir Singh, S. Effect of selected single nucleotide polymorphisms in SLC11A1, ANKRA2, IFNG and PGLYRP1 genes on host susceptibility to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in Indian cattle. *Vet. Res. Commun.* **2022**, *46*, 209–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kleinwort, K.J.H.; Hauck, S.M.; Degroote, R.L.; 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. [[CrossRef](#)]
35. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. 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.
37. Dayon, L.; Cominetti, O.; Affolter, M. Proteomics of human biological fluids for biomarker discoveries: Technical advances and recent applications. *Expert Rev. Proteom.* **2022**, *19*, 131–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Ray, S.; Reddy, P.J.; Jain, R.; Gollapalli, K.; Moiyadi, A.; Srivastava, S. Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum: Advances and challenges ahead. *Proteomics* **2011**, *11*, 2139–2161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Gao, X.; Guo, X.; Li, M.; Jia, H.; Lin, W.; Fang, L.; Jiang, Y.; Zhu, H.; Zhang, Z.; Ding, J.; et al. Interleukin 8 and Pentaxin (C-Reactive Protein) as Potential New Biomarkers of Bovine Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e00274-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Fecteau, M.-E.; Whitlock, R.H. Treatment and Chemoprophylaxis for Paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2011**, *27*, 547–557. [[CrossRef](#)]
41. Machackova, M.; Svastova, P.; Lamka, J.; Parmova, I.; Liska, V.; Smolik, J.; Fischer, O.A.; Pavlik, I. Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999–2001). *Vet. Microbiol.* **2004**, *101*, 225–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Rössler, T.; Berezhnoy, G.; Singh, Y.; Cannet, C.; Reinsperger, T.; Schäfer, H.; Spraul, M.; Kneilling, M.; Merle, U.; Trautwein, C. Quantitative Serum NMR Spectroscopy Stratifies COVID-19 Patients and Sheds Light on Interfaces of Host Metabolism and the Immune Response with Cytokines and Clinical Parameters. *Metabolites* **2022**, *12*, 1277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hostetter, J.; Steadham, E.; Haynes, J.; Bailey, T.; Cheville, N. Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2003**, *26*, 269–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Clemens, D.L.; Horwitz, M.A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J. Exp. Med.* **1995**, *181*, 257–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Belhaouane, I.; Pochet, A.; Chatagnon, J.; Hoffmann, E.; Queval, C.J.; Deboosère, N.; Boidin-Wichlacz, C.; Majlessi, L.; Sencio, V.; Heumel, S.; et al. Tirap controls *Mycobacterium tuberculosis* phagosomal acidification. *PLoS Pathog.* **2023**, *19*, e1011192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Gossner, A.; Watkins, C.; Chianini, F.; Hopkins, J. Pathways and Genes Associated with Immune Dysfunction in Sheep Paratuberculosis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. González-Ruiz, S.; Strillacci, M.G.; Durán-Aguilar, M.; Cantó-Alarcón, G.J.; Herrera-Rodríguez, S.E.; Bagnato, A.; Guzmán, L.F.; Milián-Suazo, F.; Román-Ponce, S.I. Genome-Wide Association Study in Mexican Holstein Cattle Reveals Novel Quantitative Trait Loci Regions and Confirms Mapped Loci for Resistance to Bovine Tuberculosis. *Animals* **2019**, *9*, 636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Jenum, S.; Bakken, R.; Dhanasekaran, S.; Mukherjee, A.; Lodha, R.; Singh, S.; Singh, V.; Haks, M.C.; Ottenhoff, T.H.M.; Kabra, S.K.; et al. BLR1 and FCGR1A transcripts in peripheral blood associate with the extent of intrathoracic tuberculosis in children and predict treatment outcome. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Ahmed, M.; Thirunavukkarasu, S.; Rosa, B.A.; Thomas, K.A.; Das, S.; Rangel-Moreno, J.; Lu, L.; Mehra, S.; Mbandi, S.K.; Thackray, L.B.; et al. Immune correlates of tuberculosis disease and risk translate across species. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eaay0233. [[CrossRef](#)]
50. Noble, A.; Paudyal, B.; Schwartz, J.C.; Mwangi, W.; Munir, D.; Tchilian, E.; Hammond, J.A.; Graham, S.P. Distinct effector functions mediated by Fc regions of bovine IgG subclasses and their interaction with Fc gamma receptors. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1286903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Mearelli, F.; Barbati, G.; Moras, C.; Ronco, C.; Biolo, G. Soluble FcγRIA expressed on monocytes (sCD64): A new serum biomarker of acute kidney injury in patients with suspected infection at emergency department admission. *Cytokine* **2021**, *148*, 155661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Bournazos, S.; Wang Taia, T.; Ravetch Jeffrey, V. The Role and Function of Fcγ Receptors on Myeloid Cells. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *4*, 405–427. [[CrossRef](#)]
53. Schiff, D.E.; Rae, J.; Martin, T.R.; Davis, B.H.; Curnutte, J.T. Increased Phagocyte FcγRI Expression and Improved Fcγ-Receptor-Mediated Phagocytosis After In Vivo Recombinant Human Interferon-γ Treatment of Normal Human Subjects. *Blood* **1997**, *90*, 3187–3194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Dudemaine, P.L.; Fecteau, G.; Lessard, M.; Labrecque, O.; Roy, J.P.; Bissonnette, N. Increased blood-circulating interferon-γ, interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 3382–3393. [[CrossRef](#)]
55. Galon, J.; Paulet, P.; Galinha, A.; Lores, P.; Bonnerot, C.; Jami, J.; Fridman, W.-H.; Sautes, C. Soluble Fcγ Receptors: Interaction with Ligands and Biological Consequences. *Int. Rev. Immunol.* **1997**, *16*, 87–111. [[CrossRef](#)]
56. Varin, N.; Sautès, C.; Galinha, A.; Even, J.; Hogarth, P.M.; Fridman, W.H. Recombinant soluble receptors for the Fcγ portion inhibit antibody production in vitro. *Eur. J. Immunol.* **1989**, *19*, 2263–2268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Zhang, Q.; Hu, Y.; Wei, P.; Shi, L.; Shi, L.; Li, J.; Zhao, Y.; Chen, Y.; Zhang, X.; Ye, F.; et al. Identification of hub genes for adult patients with sepsis via RNA sequencing. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 5128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Farias, M.G.; de Lucena, N.P.; Bó, S.D.; de Castro, S.M. Neutrophil CD64 expression as an important diagnostic marker of infection and sepsis in hospital patients. *J. Immunol. Methods* **2014**, *414*, 65–68. [[CrossRef](#)]
59. Liew, P.X.; Kubes, P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 1223–1248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Khare, S.; Nunes, J.S.; Figueiredo, J.F.; Lawhon, S.D.; Rossetti, C.A.; Gull, T.; Rice-Ficht, A.C.; Adams, L.G. Early Phase Morphological Lesions and Transcriptional Responses of Bovine Ileum Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* **2009**, *46*, 717–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Marete, A.; Ariel, O.; Ibeagha-Awemu, E.; Bissonnette, N. Identification of Long Non-coding RNA Isolated from Naturally Infected Macrophages and Associated with Bovine Johne's Disease in Canadian Holstein Using a Combination of Neural Networks and Logistic Regression. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 639053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ambruso, D.R.; Ellison, M.A.; Thurman, G.W.; Leto, T.L. Peroxiredoxin 6 translocates to the plasma membrane during neutrophil activation and is required for optimal NADPH oxidase activity. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 306–315. [[CrossRef](#)]

63. Udby, L.; Calafat, J.; Sørensen, O.E.; Borregaard, N.; Kjeldsen, L. Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils. *J. Leukoc. Biol.* **2002**, *72*, 462–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Sanchez Klose, F.P.; Björnsdóttir, H.; Dahlstrand Rudin, A.; Persson, T.; Khamzeh, A.; Sundqvist, M.; Thorbert-Mros, S.; Dieckmann, R.; Christenson, K.; Bylund, J. A rare CTSC mutation in Papillon-Lefèvre Syndrome results in abolished serine protease activity and reduced NET formation but otherwise normal neutrophil function. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0261724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Criado, M.; Pérez, V.; Artech-Villasol, N.; Elguezabal, N.; Molina, E.; Benavides, J.; Gutiérrez-Expósito, D. Evaluation of the innate immune response of caprine neutrophils against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in vitro. *Vet. Res.* **2023**, *54*, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ladero-Auñón, I.; Molina, E.; Oyanguren, M.; Barriales, D.; Fuertes, M.; Sevilla, I.A.; Luo, L.; Arrazuria, R.; De Buck, J.; Anguita, J.; et al. Oral vaccination stimulates neutrophil functionality and exerts protection in a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection model. *NPJ Vaccines* **2021**, *6*, 102. [[CrossRef](#)]
67. Zang, X.; Dang, G.; Cai, Z.; Shao, M.; Tang, Y.; Cao, J.; Cui, Z.; Liu, S. Extracellular DNase MAP3916c attacks the neutrophil extracellular traps and is needed for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* virulence. *Vet. Microbiol.* **2022**, *273*, 109529. [[CrossRef](#)]
68. Ladero-Auñón, I.; Molina, E.; Holder, A.; Kolakowski, J.; Harris, H.; Urkitza, A.; Anguita, J.; Werling, D.; Elguezabal, N. Bovine Neutrophils Release Extracellular Traps and Cooperate with Macrophages in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* clearance In Vitro. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 645304. [[CrossRef](#)]
69. Smyth, P.; Sasiwachirangkul, J.; Williams, R.; Scott, C.J. Cathepsin S (CTSS) activity in health and disease—A treasure trove of untapped clinical potential. *Mol. Asp. Med.* **2022**, *88*, 101106. [[CrossRef](#)]
70. Riese, R.J.; Wolf, P.R.; Brömme, D.; Natkin, L.R.; Villadangos, J.A.; Ploegh, H.L.; Chapman, H.A. Essential Role for Cathepsin S in MHC Class II-Associated Invariant Chain Processing and Peptide Loading. *Immunity* **1996**, *4*, 357–366. [[CrossRef](#)]
71. Bania, J.; Gatti, E.; Lelouard, H.; David, A.; Cappello, F.; Weber, E.; Camosseto, V.; Pierre, P. Human cathepsin S, but not cathepsin L, degrades efficiently MHC class II-associated invariant chain in nonprofessional APCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6664–6669. [[CrossRef](#)]
72. Sendide, K.; Deghmane, A.-E.; Pechkovsky, D.; Av-Gay, Y.; Talal, A.; Hmama, Z. *Mycobacterium bovis* BCG Attenuates Surface Expression of Mature Class II Molecules through IL-10-Dependent Inhibition of Cathepsin S1. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 5324–5332. [[CrossRef](#)]
73. Soualhine, H.; Deghmane, A.-E.; Sun, J.; Mak, K.; Talal, A.; Av-Gay, Y.; Hmama, Z. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Secreting Active Cathepsin S Stimulates Expression of Mature MHC Class II Molecules and Antigen Presentation in Human Macrophages1. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 5137–5145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Weiss, D.J.; Evanson, O.A.; de Souza, C.; Abrahamsen, M.S. A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* **2005**, *66*, 721–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Weiss Douglas, J.; Evanson Oral, A.; McClenahan David, J.; Abrahamsen Mitchell, S.; Walcheck Bruce, 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. [[CrossRef](#)]
76. Ramachandra, L.; Qu, Y.; Wang, Y.; Lewis Colleen, J.; Cobb Brian, A.; Takatsu, K.; Boom, W.H.; Dubyak George, R.; Harding Clifford, V. *Mycobacterium tuberculosis* Synergizes with ATP To Induce Release of Microvesicles and Exosomes Containing Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Capable of Antigen Presentation. *Infect. Immun.* **2010**, *78*, 5116–5125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Schubert, M.; Walczak, M.J.; Aebi, M.; Wider, G. Posttranslational Modifications of Intact Proteins Detected by NMR Spectroscopy: Application to Glycosylation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7096–7100. [[CrossRef](#)]
78. Kleiner-Grote, G.R.M.; Risse, J.M.; Friehs, K. Secretion of recombinant proteins from *E. coli*. *Eng. Life Sci.* **2018**, *18*, 532–550. [[CrossRef](#)]
79. Wiederanders, B.; Brömme, D.; Kirschke, H.; von Figura, K.; Schmidt, B.; Peters, C. Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. Cloning and expression of a cDNA coding for human cathepsin S. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13708–13713. [[CrossRef](#)]
80. Pierrakos, C.; Vincent, J.-L. Sepsis biomarkers: A review. *Crit. Care* **2010**, *14*, R15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Petrer, A.; von Toerne, C.; Behler, J.; Huth, C.; Thorand, B.; Hilgendorff, A.; Hauck, S.M. Multiplatform Approach for Plasma Proteomics: Complementarity of Olink Proximity Extension Assay Technology to Mass Spectrometry-Based Protein Profiling. *J. Proteome Res.* **2021**, *20*, 751–762. [[CrossRef](#)]
82. You, Q.; Verschoor, C.P.; Pant, S.D.; Macri, J.; Kirby, G.M.; Karrow, N.A. Proteomic analysis of plasma from Holstein cows testing positive for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2012**, *148*, 243–251. [[CrossRef](#)]
83. Navarro León, A.I.; Muñoz, M.; Iglesias, N.; Blanco-Vázquez, C.; Balseiro, A.; Milhano Santos, F.; Ciordia, S.; Corrales, F.J.; Iglesias, T.; Casais, R. Proteomic Serum Profiling of Holstein Friesian Cows with Different Pathological Forms of Bovine *Paratuberculosis* Reveals Changes in the Acute-Phase Response and Lipid Metabolism. *J. Proteome Res.* **2023**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Eckersall, P.D.; Young, F.J.; McComb, C.; Hogarth, C.J.; Safi, S.; Fitzpatrick, J.L.; Nolan, A.M.; Weber, A.; McDonald, T. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet. Rec.* **2001**, *148*, 35–41. [[CrossRef](#)]

85. Bean, L.D.; Wing, J.J.; Harris, R.E.; Smart, S.M.; Raman, S.V.; Milks, M.W. Transferrin predicts trimethylamine-N-oxide levels and is a potential biomarker of cardiovascular disease. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2022**, *22*, 209. [[CrossRef](#)]
86. Zhang, Y.-G.; Niu, J.-T.; Wu, H.-W.; Si, X.-L.; Zhang, S.-J.; Li, D.-H.; Bian, T.-T.; Li, Y.-F.; Yan, X.-K. Actin-Binding Proteins as Potential Biomarkers for Chronic Inflammation-Induced Cancer Diagnosis and Therapy. *Anal. Cell. Pathol.* **2021**, *2021*, 6692811. [[CrossRef](#)]
87. Xu, H.; Cui, H.; Weng, S.; Zhang, Y.; Wang, L.; Xing, Z.; Han, X.; Liu, Z. Crosstalk of cell death pathways unveils an autophagy-related gene AOC3 as a critical prognostic marker in colorectal cancer. *Commun. Biol.* **2024**, *7*, 296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Clempson, A.M.; Pollott, G.E.; Brickell, J.S.; Wathes, D.C. Associations Between Bovine IGF1 Polymorphisms with Fertility, Milk Production, and Metabolic Status in UK Dairy Cows. *Anim. Biotechnol.* **2012**, *23*, 101–113. [[CrossRef](#)]
89. Zeni, L.; Norden, A.G.W.; Prandi, E.; Canepa, C.; Burling, K.; Simpson, K.; Felappi, B.; Plebani, A.; Cancarini, G.; Ferraro, P.M.; et al. Exploration of a panel of urine biomarkers of kidney disease in two paediatric cohorts with Type 1 diabetes mellitus of differing duration. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2022**, *14*, 71. [[CrossRef](#)]
90. 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. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Duda, H. C., C. von Toerne, L. Korbonits, A. Didier, A. M. Scholz, E. Märtlbauer, S. M. Hauck and C. A. Deeg (2024). "Cathepsin S Is More Abundant in Serum of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-Infected Dairy Cows." *Metabolites* 14(4), 215. <https://doi.org/10.3390/metabo14040215>

Supplementary Material

Table S1: Schematic of the experimental design

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo14040215/s1>

Farm	Cow number	MAP infection status	Serum proteomics	Western blot assay
Farm 1 (infected farm)	cow 1	negative in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 2	negative in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 3	negative in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 4	negative in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 5	negative in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 6	negative in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 7	negative in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 8	positive in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 9	positive in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 10	positive in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 11	positive in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 12	positive in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 13	positive in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 14	positive in ELISA (milk and serum) and fecal culture	✓	✓
	cow 15	positive in ELISA (milk and serum) and fecal culture	-	✓
	cow 16	positive in ELISA (milk and serum) and fecal culture	-	✓
Farm 2 (uninfected farm; regularly tested fecal samples and sock swab samples)	cow 17	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 18	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 19	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 20	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 21	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 22	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 23	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 24	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 25	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 26	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 27	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 28	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 29	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 30	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 31	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 32	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 33	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 34	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 35	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 36	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
	cow 37	negative in ELISA (milk and serum)	✓	-
Farm 3 (infected farm)	cow 38	negative in ELISA (serum) and fecal culture	-	✓
	cow 39	negative in ELISA (serum) and fecal culture	-	✓
	cow 40	positive in ELISA (serum) and fecal culture	-	✓
	cow 41	positive in ELISA (serum) and fecal culture	-	✓
	cow 42	positive in ELISA (serum) and fecal culture	-	✓

4 DISKUSSION

Die Paratuberkulose ist eine schwere, unheilbare Infektionskrankheit, die Rinder und andere Haus- und Wildwiederkäuer betrifft (Ottardi, Lechner et al. 2024; WOA 2024). Die Erkrankung hat aufgrund des zoonotischen Potentials ihres zugrundeliegenden Erregers, MAP, neben hohen wirtschaftlichen Folgen eine beträchtliche Relevanz im Kontext des One Health Ansatzes, der auf eine Verbesserung der globalen Gesundheit durch ein gesamtheitliches Betrachten des Zusammenspiels zwischen Mensch, Tier und Umwelt abzielt (Dow and Alvarez 2022; Griss, Knific et al. 2024). Daher ist es zwingend notwendig, den Erreger durch geeignete Maßnahmen zu bekämpfen und einen Eintrag in die Lebensmittelkette zu verhindern. Da die derzeit zur Verfügung stehenden Nachweisverfahren aufgrund unzureichender Sensitivität und Spezifität vor allem subklinisch MAP-infizierte Rinder nicht zuverlässig detektieren (Tuberquia-Lopez, Correa-Valencia et al. 2022), ist eine Identifizierung geeigneter Biomarker von großer Bedeutung. Gleichzeitig ist eine Aufklärung der komplexen Wirt-Pathogen-Interaktionen für eine effektive Bekämpfung der Paratuberkulose essentiell, um erfolgsversprechende Präventionsmaßnahmen und Strategien für eine zielgerichtete Intervention im Wirt etablieren zu können. Um diese beiden Ziele – die Entdeckung und Validierung neuer Biomarker sowie die Etablierung effizienter Bekämpfungsmaßnahmen – zu verfolgen, wurde das Serumproteom von Milchkühen von drei verschiedenen Phänotypen differentiell untersucht (Publikation). Hierfür wurden zwei verschiedene Betriebe herangezogen, die eine ähnliche Herdengröße und vergleichbare Haltungssysteme aufwiesen. Bei der Auswahl der Kühe wurde stets auf ein einheitliches Altersspektrum und auf eine vergleichbare Zusammensetzung der Rinderrassen geachtet. Die erste Gruppe setzte sich aus gesunden Kühen eines Paratuberkulose-freien Betriebs zusammen. Der Paratuberkulose-Status dieses Betriebs wurde anhand von regelmäßigen Einzeltierkotproben und Umweltproben anhand von Sockentupfern bestimmt, wobei alle gewonnenen Proben stets ein negatives Ergebnis in der kulturellen Anzucht auf HEYM-Agar erzielten. Zudem wurden anhand des ELISA-Testverfahren keine MAP-spezifischen Antikörper in Serumproben und Einzeltiermilchproben detektiert (Publikation). Für die anderen beiden Gruppen wurde ein Rinderbetrieb herangezogen, in dem MAP nachgewiesen wurde. Nach einem umfangreichen Paratuberkulose-Screening

mittels kultureller Anzucht von MAP aus Einzeltierkotproben sowie des Nachweises MAP-spezifischer Antikörper in Serumproben und Einzeltiermilchproben anhand der ELISA-Testmethode wurden die Milchkühe des infizierten Betriebs in nicht-infizierte, gesunde Kühe und infizierte Kühe unterteilt (Publikation). Kühe mit ausschließlich negativen Testergebnissen wurden als gesunde, nicht-infizierte Kühe kategorisiert, wohingegen die infizierten Kühe positive Testergebnisse aufwiesen. Kühe mit nicht eindeutig zuordbaren Ergebnissen wurden von der Studie ausgeschlossen. Da die infizierten Kühe zwar subklinisch erkrankt waren, aber in jedem Fall MAP über den Kot ausschieden, ist davon auszugehen, dass die gesunden, nicht-infizierten Kühe dieses Betriebs dem Erreger auf jeden Fall ausgesetzt waren, sich jedoch – soweit nachweisbar – nicht infiziert hatten. Zu beachten ist hier jedoch, dass eine Infektion aufgrund der unzureichenden Sensitivität der Nachweisverfahren, vor allem im Anfangsstadium der Infektion, nie mit einer hundertprozentigen Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Die Kombination der Anzucht von MAP aus Kotproben mit dem Nachweis MAP-spezifischer Antikörper in Serum und Milch bietet jedoch eine hohe Verlässlichkeit der Eingruppierung der untersuchten Kühe. Dennoch kann hierbei eine intermittierende Erregerausscheidung zu falsch-negativen Testergebnissen führen. Auch Kühe im Anfangsstadium der Infektion könnten aufgrund fehlender Serokonversion nicht detektiert worden sein. Die mögliche Fehlzusammenhang von nicht nachweisbar MAP-infizierten Kühen zu den nicht-infizierten Kühen des infizierten Betriebs kann daher als eine Limitation dieser Arbeit angesehen werden. Um diese potenzielle Problematik zu umgehen, wurden Kühe aus einem Paratuberkulose-freien Bestand herangezogen, dessen negativer Paratuberkulose-Status durch die regelmäßige Analyse von Einzeltierkot- und Umweltproben gewährleistet werden konnte. Zudem zeigten die Kühe des Paratuberkulose-freien Betriebs in keinem Fall MAP-spezifische Antikörper in Serumproben und Einzeltiermilchproben im ELISA (Publikation). Die gesunden Kühe beider Kontrollgruppen – die des infizierten Betriebs und die des Paratuberkulose-freien Betriebs – wurden in dieser Arbeit als gesunde, nicht-infizierte Kühe betrachtet (Publikation). Der Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen bestand darin, dass die nicht-infizierten Kühe der infizierten Herde bereits mit MAP in Kontakt gekommen waren, während die gesunden Kühe des Paratuberkulose-freien Betriebs noch nie mit dem Erreger in Kontakt gekommen waren. Dadurch war es möglich, Unterschiede in Wirt-

Pathogen-Interaktionen und Immunreaktionen zu ermitteln, die für eine erfolgreiche Eliminierung des Erregers essentiell sind.

In der Analyse des bovinen Serumproteoms mittels label-freier LC-MS/MS konnten 394 Proteine identifiziert werden. Von diesen Proteinen zeigten 60 Proteine signifikante Abundanzunterschiede zwischen MAP-infizierten und gesunden, nicht-infizierten Kühen derselben infizierten Herde (Figure 1a, Publikation). Im Vergleich zwischen MAP-infizierten Rindern und gesunden Kontrollkühen eines Paratuberkulose-freien Bestandes waren 90 Proteine signifikant differentiell abundant (Figure 1b, Publikation). Damit konnten für alle drei Vergleichsgruppen unterschiedliche Serumproteinprofile ermittelt werden. Dadurch konnten durch die Betrachtung der differentiell abundanten Proteine Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Wirt-Pathogen-Interaktionen gezogen werden. Differentiell abundante Proteine wie Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (FCGR1A), MHC-Klasse-II, Cathepsin S (CTSS), Cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP3) und Cathepsin C (CTSC) zeigten dabei eine starke Assoziation zu immunologischen Funktionen wie Fc-gamma-Rezeptor (FCGR)-abhängige Phagozytose, verschiedene neutrophile Effektorfunktionen und MHC-Klasse-II-Antigenpräsentation (Publikation).

In dieser Serumproteomik wurde vor der Analyse bewusst keine Depletion von hochabundanten Proteinen durchgeführt. Im Serum liegen wenige Proteine wie Serumalbumin, Immunglobuline, Transferrin und Apolipoproteine in sehr hohen Konzentrationen vor und machen 90 % des gesamten Proteingehalts aus, während die für eine Krankheit spezifischen Biomarker in der Regel in niedrigen Konzentrationen vorkommen (Bellei, Bergamini et al. 2011; Hu, Yang et al. 2024). Durch diesen großen dynamischen Bereich von Proteinkonzentrationen tritt bei der massenspektrometrischen Analyse durch die Anwesenheit der hochabundanten Proteine eine Ionensuppression auf, wodurch Proteine, die in niedrigen Konzentrationen vorliegen, nicht adäquat detektiert werden können (Hands, Sayers et al. 2020). Um diese Wechselwirkungen zu vermeiden, werden häufig ein oder mehrere hochabundante Proteine aus dem Serum entfernt (Lu, Wang et al. 2021; Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Dabei kommen spezifische Liganden oder Antikörper zum Einsatz, die ein bestimmtes oder mehrere hochabundante Proteine binden (Lee, Osman et al. 2019). Wird das Serum nun durch eine mit diesen Liganden oder Antikörpern beschichteten Säule geleitet, verbleiben die zu

depletierenden Proteine in dieser, während die anderen Proteine die Säule passieren (Lee, Osman et al. 2019). Eine Depletion birgt jedoch das Risiko, dass zusätzlich zu den bestimmten dominanten Proteinen auch niedrigabundante, die von Interesse sind, unbeabsichtigt entfernt werden (Jahanban-Esfahlan and Amarowicz 2024). Da hochabundante Serumproteine wie Albumin als Transportträger für verschiedene Moleküle fungieren, kann eine Depletion von Proteinen, die in hohen Konzentrationen im Serum vorliegen, durchaus zu einem Verlust von niedrigabundanten Peptiden und Proteinen führen, die an diese gebunden sind (Bellei, Bergamini et al. 2011). Gleichzeitig kommt es zu unspezifischen Bindungen von Nicht-Zielproteinen an die Liganden, die für eine Depletion von hochabundanten Proteinen aus dem Serum zum Einsatz kommen, wodurch wiederum potenzielle Kandidaten verloren gehen (Tiambeng, Roberts et al. 2020). Die Depletion von hochabundanten Proteinen im humanen Plasma führte unter anderem zur ungewollten Entfernung von Zytokinen (Granger, Siddiqui et al. 2005; Lee, Osman et al. 2019). Ein weiterer großer Nachteil der Depletion von hochabundanten Proteinen aus bovinem Serum ist, dass die zur Verfügung stehenden, kommerziellen Depletion-Kits in der Regel humanspezifisch sind und bei bovinem Probenmaterial nicht die gewünschte Effizienz erreichen (Marco-Ramell and Bassols 2010). Aufgrund dieser aufgezeigten Limitationen der Depletion hochabundanter Proteine, untersuchten wir in unserer Proteomanalyse das Serum nicht-depletiert, um einen ungewollten Verlust von interessanten Proteinen und Peptiden zu vermeiden, jedoch mit dem Risiko niedrigabundante Proteine und Peptide nicht adäquat mittels Massenspektrometrie zu detektieren. Dies lässt sich aber durch eine Reduzierung der Ionensuppression durch moderne, hochauflösende Technologien der Massenspektrometrie, wie die an eine Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelte DIA-Tandem-Massenspektrometrie, welche wir für unsere Analyse verwendeten, vermindern (Kraut, Louwagie et al. 2019; Pietrowska, Wlosowicz et al. 2019). Zudem konnten wir durch den Verzicht auf eine Depletion hochabundanter Proteine unser Ziel verfolgen, differentiell abundante Proteine im unbehandelten Serum zu identifizieren, wodurch eine Praxistauglichkeit potenzieller Biomarker gewährleistet werden kann, da bovines Serum in der Regel in seiner natürlichen, unbehandelten Form für klinische Untersuchungen verwendet wird, um beispielsweise eine Ketose mittels der bereits etablierten Biomarker β -Hydroxybutyrat und nicht-veresterte

Fettsäuren zu diagnostizieren (Tremblay, Kammer et al. 2018; Luke, Morton et al. 2024).

Wie zu erwarten identifizierten wir eine niedrigere Gesamtanzahl an Proteinen, nämlich 394, als in einer vergleichbaren Studie zur Proteomik von an Paratuberkulose erkrankten Rindern im Vergleich zu gesunden Rindern infizierter Betriebe, bei der 669 Proteine im depletierten Serum detektiert wurden (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Navarro Leon et al. führten vor der massenspektrometrischen Analyse mittels LC-MS/MS eine Depletion von 14 hochabundanten Proteinen (Albumin, Alpha-1-Antitrypsin, Haptoglobin, Fibrinogen, Alpha-1-Acid Glykoprotein, Alpha-2-Makroglobulin, Transferrin, Komplement C3 und verschiedene Apolipoproteine sowie Immunglobuline) aus dem Serum mittels Antikörper-basierter Affinitätschromatographie durch, bei der aviäre IgY-Antikörper gegen diese hochabundanten Proteine, allerdings humanspezifisch, verwendet wurden (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Die höhere Zahl an identifizierten Proteinen in der Studie von Navarro Leon et al. im Vergleich zu unserer Serumproteomik kann an der Depletion von hochabundanten Proteinen liegen, wodurch offenbar eine größere Anzahl an niedrigabundanten Proteinen detektiert werden konnte. Diese Annahme würde zunächst darauf hindeuten, dass für die Analyse des Serumproteoms bei der Probenaufbereitung eine Depletion vorteilhaft ist. Allerdings konnten wir in unserer Proteomanalyse 60 signifikant differentiell abundante Proteine beim Vergleich von MAP-infizierten Rindern mit gesunden, nicht-infizierten Kühen desselben Bestandes bestimmen (Figure 1a, Publikation) – demselben Vergleichsszenario wie bei Navarro Leon et al, wohingegen in deren Untersuchung nur neun Proteine signifikante Abundanzunterschiede aufwiesen (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Dieses Resultat kann mit den bereits aufgezeigten Limitationen der vorangegangenen Depletion hochabundanter Proteine im Zusammenhang stehen, wodurch es vor allem durch die fehlende Spezifität eingesetzter Antikörper zu bovinen Proteinen zu einer ineffizienten Entfernung dieser Proteine und einem gleichzeitigen Verlust von interessanten, niedrigabundanten Kandidaten gekommen sein könnte. Da vor allem differentiell abundante Proteine entscheidend für die Aufklärung der komplexen Pathogen-Wirt-Interaktionen bei einer Infektion mit MAP sind und potenzielle Biomarker für die Paratuberkulose darstellen, übertreffen unsere Ergebnisse die der Studie von Navarro Leon et al. Daraus lässt sich schließen, dass die von uns angewandten

Methoden denen dieser Vergleichsstudie überlegen sind. Ein weiterer Unterschied zu unserer Serumproteomik, bei der die MAP-Infektion anhand des kulturellen Nachweises des Erregers sowie des Vorhandenseins von MAP-spezifischen Antikörpern bestimmt wurde, besteht darin, dass Navarro Leon et al. für die Einteilung von MAP-infizierten Kühe andere Kriterien heranzogen (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Alle MAP-infizierten Rinder in dieser Studie zeigten ein positives Ergebnis in der Ziehl-Neelsen-Färbung von Darmgewebe, in der säurefeste Bakterien, zu denen MAPs zugeordnet werden, angefärbt werden können (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Anhand der histopathologisch bestimmten Ausprägung der Läsionen im Darm wurden diese in „fokal“ und „diffus“ unterteilt (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Bei infizierten Rindern mit einer fokalen Ausprägung konnten weder MAP-spezifische Antikörper im Serum noch MAPs in der kulturellen Anzucht von Kotproben nachgewiesen werden (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Zudem waren zwar bei allen MAP-infizierten Rindern mit diffusen Läsionen MAP-spezifische Antikörper vorhanden, dennoch zeigte lediglich eines der vier Rinder ein positives Ergebnis in der kulturellen Anzucht von Kotproben (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Dies deutet darauf hin, dass im Gegensatz zu den von uns bestimmten MAP-infizierten Kühen kein deutlich ausgeprägtes Entzündungsgeschehen mit kontinuierlicher Erregerausscheidung vorhanden war, wodurch das Serumproteom von MAP-infizierten Kühen nur geringe signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollkühen aufwies.

Drei dieser neun Proteine, Vitamin-D-bindendes Protein, Komplementkomponente 6 und Fetuin B, die in der Proteomanalyse von Navarro Leon et al. signifikante Abundanzunterschiede aufwiesen (Navarro Leon, Munoz et al. 2024), konnten wir in unserer Serumproteomik identifizieren (Publikation). Sowohl das Vitamin-D-bindende Protein als auch die Komplementkomponente 6 wiesen in unserer Analyse des Serumproteoms keine signifikante differentielle Abundanz zwischen den untersuchten Gruppen auf (Publikation). Das Vitamin-D-bindende Protein wird bei Menschen in der Leber synthetisiert und ist für den Transport von Vitamin D und dessen Metaboliten im Blut zuständig, wobei es zudem unter anderem durch eine Erhöhung der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und eine Aktivierung von Makrophagen immunregulatorisch wirkt (Pop, Sirbe et al. 2022). Beim Menschen ist die Komplementkomponente 6 ein Teil des Membranangriffkomplexes, welcher die Zellmembran von Fremdzellen perforiert,

wodurch diese lysiert werden (Ma, Chen et al. 2021). Bei Navarro Leon et al. zeigten ausschließlich MAP-infizierte Rinder mit diffusen Läsionen eine erhöhte Abundanz der beiden Proteine (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Dennoch ist hier zu erwähnen, dass die Rinder dieser Gruppe zwar MAP-spezifische Antikörper bildeten, aber nur in 25 % der Fälle MAP mit dem Kot ausschieden (Navarro Leon, Munoz et al. 2024), wohingegen die von uns bestimmten MAP-infizierten Rinder zu 100 % der Fälle den Erreger fäkal ausschieden (Publikation). Dies könnte darauf hindeuten, dass sowohl das Vitamin-D-bindende Protein als auch die Komplementkomponente 6 nur eine erhöhte Abundanz aufweisen, wenn bereits MAP-spezifische Antikörper gebildet wurden, der Erreger aber noch nicht kontinuierlich mit dem Kot ausgeschieden wird. Welche Bedeutung die beiden Proteine hierbei haben, ist unklar. Basierend auf diesen Ergebnissen wäre der Nachweis einer MAP-Infektion nur bei einem Teil der infizierten Rinder möglich, weshalb diese beiden Proteine nicht als Biomarker für die bovine Paratuberkulose geeignet sind. Es wäre dennoch interessant, diese beiden Kandidaten in Serumproben von Rindern mit verschiedenen Krankheitsstadien der Paratuberkulose weiter zu untersuchen.

In unserer Serumproteomik konnten wir eine erhöhte Abundanz von Fetuin B in MAP-infizierten Kühen im Vergleich zu gesunden Kühen eines Paratuberkulose-freien Bestandes aufzeigen (Publikation). Welche Rolle eine erhöhte Abundanz von Fetuin B in MAP-infizierten Tieren spielt, ist bis jetzt noch nicht geklärt. Eine erhöhte Abundanz von Fetuin B wurde bereits im Plasmaproteom von Menschen mit einer pulmonaren Tuberkulose detektiert (Schiff, Walker et al. 2024). Auch beim Menschen ist die pathologische Rolle von Fetuin B während der Tuberkulose weitestgehend unbekannt. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass Fetuin B aufgrund seiner Korrelation mit der Verschlechterung der Lungenfunktion bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen mit einer destruktiven Lungenpathologie assoziiert ist (Schiff, Walker et al. 2024). Fetuin B könnte daher auch mit den histopathologischen Läsionen im Darmgewebe von an Paratuberkulose erkrankten Rindern im Zusammenhang stehen. Bei Mäusen wurde gezeigt, dass Fetuin B in der Leber synthetisiert wird und für die Fertilisation eine wichtige Rolle spielt, indem es die Aushärtung der Zona pellucida der Eizelle verhindert, um eine Befruchtungsfähigkeit der Eizelle zu gewährleisten (Dietzel, Wessling et al. 2013). In Hinblick auf die Fruchtbarkeit MAP-infizierter Milchkühe ist

bereits bekannt, dass eine Infektion zu einer reduzierten Fertilität führt (Ozsvari, Harnos et al. 2020). Ob eine erhöhte Abundanz von Fetuin B im Serum von MAP-infizierten Kühen im Zusammenhang mit einer reduzierten Fertilität steht, ist jedoch unklar und kann durch eine Messung der Proteinlevel von Fetuin B im Serum von Kühen bei gleichzeitiger Auswertung der Reproduktionsdaten wie Zwischenkalbezeit und Besamungsindex untersucht werden. Weiterhin wurde an Mäusen gezeigt, dass Fetuin B eine Dysregulation des Glukosemetabolismus induzierte, indem es eine Glukose-Intoleranz auslöste (Meex, Hoy et al. 2015). Möglicherweise induziert MAP eine vermehrte Synthese von Fetuin B in der Leber, welches resultierend aus einer Dysregulation des Glukosemetabolismus zu einer erhöhten Glukosekonzentration im Blut führt, womit das Wachstum des Erregers gefördert werden könnte. Diese Hypothese muss in weiteren Studien untersucht werden. Dabei können Fetuin B Knockout-Tiere zum Einsatz kommen, indem das Wachstum von MAP im Vergleich zu Wildtypen untersucht wird.

Beim Vergleich der MAP-infizierten Kühe mit den gesunden, nicht-infizierten Kühen desselben Betriebs, die eine wichtige Kontrollgruppe darstellen, da sie denselben Umweltbedingungen wie den MAP-infizierten Kühen ausgesetzt waren, konnten wir keine signifikanten Abundanzunterschiede von Fetuin B nachweisen (Publikation), wohingegen Navarro Leon et al. in diesem Vergleich eine erhöhte Abundanz von Fetuin B bestimmen konnten (Navarro Leon, Munoz et al. 2024). Da in dieser Studie im Gegensatz zu den von uns herangezogenen Rindern nur eines der MAP-infizierten Rinder den Erreger mit dem Kot ausschied, ist die MAP-Exposition gesunder, nicht-infizierter Rinder eher als gering einzuschätzen. Dadurch kann es sein, dass in den von Navarro Leon et al. untersuchten Herden, nicht-infizierte Rinder gar nicht mit MAP in Kontakt kamen und potenziell eher mit denen unseres Paratuberkulose-freien Betriebs vergleichbar sind. Denn im Vergleich zu diesen Rindern konnten wir durchaus eine erhöhte Abundanz von Fetuin B im Serum von MAP-infizierten Kühen nachweisen (Publikation). Unsere Ergebnisse zeigen, dass Fetuin B für eine Differenzierung von MAP-infizierten und nicht-infizierten Kühen ungeeignet ist. Sie deuten aber auch darauf hin, dass lediglich der Kontakt mit dem Erreger und nicht eine Infektion mit MAP zu einer erhöhten Abundanz von Fetuin B führt. Daher könnte Fetuin B als ein potenzieller Biomarker für das generelle Vorhandensein von MAP in einem Bestand herangezogen werden, jedoch nicht um eine Infektion nachzuweisen. Ob nicht die Infektion selbst, sondern bereits ein

Kontakt mit MAP zu einer erhöhten Abundanz von Fetuin B im Serum führt, kann durch die Inokulation von inaktivierten MAPs erfolgen, woraufhin zu verschiedenen Zeitpunkten die Abundanz von Fetuin B im Serum bestimmt werden kann.

In unserer Proteomanalyse der im flüssigen Bestandteil des Blutes vorliegenden Proteine wurde Serum als Biofluid verwendet. Im Serum liegen die flüssigen Bestandteile des Blutes von Fibrinogen und anderen Gerinnungsfaktoren getrennt vor, wohingegen im Plasma aufgrund der Inhibierung der Gerinnung durch ein zugegebenes Antikoagulans diese Faktoren im flüssigen Bestandteil gelöst sind (Zhu 2024). Als Antikoagulanzen werden vor allem Heparin oder EDTA verwendet (Zhu 2024). Die Verwendung von Serum wurde in unserer Studie bewusst gewählt, da anhand von humanem Plasma bereits bewiesen wurde, dass verschiedene Antikoagulanzen die Abundanz von Proteinen unterschiedlich beeinflussen (Halvey, Farutin et al. 2021). Dabei wurde sowohl Heparin-Plasma als auch EDTA-Plasma von gesunden Patienten entnommen und anschließend nach einer Depletion hochabundanter Proteine massenspektrometrisch analysiert, wobei unter anderem Lactotransferrin und die Carboanhydrase 1 eine differentielle Abundanz aufwiesen (Halvey, Farutin et al. 2021). Eine differentielle Abundanz kann durch die vermehrte proteolytische Aktivität von Heparin-Plasma im Vergleich zu EDTA-Plasma entstehen (Jambunathan and Galande 2014), weshalb für die Proteomanalyse die Verwendung von EDTA als Antikoagulans laut der Human Proteome Organization am geeignetsten ist (Lan, Nunez Galindo et al. 2018). Bei der Untersuchung des Effekts von Antikoagulanzen auf 162 immunologisch wirksame Proteine, unter anderem verschiedene Interleukine, CTSS und TNF- α , konnte anhand eines Multiplex-Immunoassays mit humanen Blutproben gezeigt werden, dass nur 18 % der Proteine eine ähnliche Expression im Vergleich von EDTA-Plasma mit Heparin-Plasma aufwiesen (Scholman, Giovannone et al. 2018). Es ist bereits bewiesen, dass EDTA eine zelluläre Stressreaktion durch eine Hypokalzämie auslöst, die aufgrund der Chelatbildung mit Kalzium zustande kommt (Scholman, Giovannone et al. 2018). Dadurch sind erhöhte Level unter anderem von IL-1RA und TNF- α messbar (Scholman, Giovannone et al. 2018), weshalb in dieser Hinsicht das Heparin-Plasma dem EDTA-Plasma vorzuziehen ist. Weiterhin zeigte diese Studie, dass im Plasma nur 36 % (EDTA-Plasma) beziehungsweise 37 % (Heparin-Plasma) der untersuchten Proteine eine ähnliche Expression im Vergleich zu Serum aufwiesen (Scholman, Giovannone et al. 2018). Dies zeigt,

dass die Zugabe von Antikoagulanzen das Proteom signifikant verändert, wobei zusätzlich Unterschiede zwischen den verschiedenen Antikoagulanzen auftreten. Dadurch kann Serum als bevorzugtes Probenmaterial betrachtet werden, da das Proteom hier biologisch natürlich vorliegt und nicht durch künstlich zugefügte Antikoagulanzen verändert wurde. Ein weiterer Grund für die Bevorzugung von Serum gegenüber Plasma war, dass Serum in einer massenspektrometrischen Analyse eine leichte Verbesserung der qualitativen Reproduzierbarkeit im Vergleich zu EDTA-Plasma und Heparin-Plasma aufwies (Lan, Nunez Galindo et al. 2018), wodurch eine konsistente Identifizierung der Proteine bei der Verwendung von Serum eher gewährleistet ist. Zusätzlich wird bei der Gewinnung von Serum die Gerinnung nicht inhibiert, wodurch Thrombozyten aktiviert werden und vermehrt Proteine wie Transformin growth factor β freisetzen (Nambu, Nishiumi et al. 2020; Karolczak and Watala 2021), welche es ermöglichen den Gerinnungsprozess zu charakterisieren. Die Verwendung von Serum weist allerdings auch Nachteile gegenüber Plasma auf. So wurden in einer Studie, die die Gesamtzahl an identifizierten Proteinen im humanen Serum mit denen im humanen Plasma miteinander verglich, im Serum 4,3 % weniger Proteine als im Plasma identifiziert (Lan, Nunez Galindo et al. 2018). Diese Unterschiede resultieren hauptsächlich aus den Gerinnungsfaktoren (Lan, Nunez Galindo et al. 2018). Im Gegensatz zu Plasma werden bei der Gewinnung von Serum aufgrund der Aktivierung der Gerinnung einerseits Fibrinogen und weitere Gerinnungsfaktoren entfernt, andererseits können auch interessante Proteine verloren gehen, die physikalisch in den entstandenen Blutgerinnseln eingeschlossen werden (Bruzek, Betensky et al. 2023). Die Verwendung von Plasma ermöglicht somit eine Untersuchung aller Proteine des flüssigen Bestandteiles von Blut. Aufgrund dieser Limitation unserer Proteomanalyse wäre eine zusätzliche Untersuchung des Plasmaproteoms von MAP-infizierten Kühen durchaus interessant. Anschließend könnten die Proteinprofile von Serum und Plasma gemeinsam betrachtet werden, um ein umfassenderes Verständnis der immunologischen Vorgänge während der Paratuberkulose zu erhalten.

Das Plasmaproteom von MAP-infizierten Kühen wurde bereits in einer früheren Studie untersucht (You, Verschoor et al. 2012). Dabei wurden sechs hochregulierte und zwei herunterregulierte Proteine mit einem signifikanten Unterschied detektiert (You, Verschoor et al. 2012). Sechs dieser acht Proteine, Transferrin, Amine

oxidase copper containing 3, Thrombin, Komplementkomponente C1r Subkomponente, Komplementkomponente C3 sowie das Koagulationsfaktor XIII B-Polypeptid, wurden in unserer Serumproteomanalyse identifiziert (Publikation). Allerdings konnten für diese Proteine keine signifikanten Abundanzunterschiede gefunden werden. Die Unterschiede in den ermittelten Expressionsmustern der Proteine können verschiedene Ursachen haben. Zum einen wurden auch hier vor der Analyse des Proteinprofils hochabundante Proteine aus dem Plasma depletiert (You, Verschoor et al. 2012), wodurch es zu einer Umverteilung von Proteinkonzentrationen und dem unbeabsichtigten Verlust von zusätzlichen Proteinen und Peptiden kommen kann. Zum anderen wurde der Infektionsstatus der Kühe in dieser Untersuchung allein durch den Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern in Milch und Plasma mittels ELISA ermittelt (You, Verschoor et al. 2012), während der Infektionsstatus in dieser Arbeit zusätzlich durch eine kulturelle Anzucht von MAP aus Kotproben bestimmt wurde (Publikation). Dadurch konnten die Einschränkungen der Sensitivität und Spezifität des ELISA-Testverfahrens reduziert werden, wodurch der MAP-Infektionsstatus in unserer Studie durch eine höhere Zuverlässigkeit bestimmt wurde und eine falsche Zuordnung zu einer Gruppe mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden konnte. Bei dieser Plasmaproteomik basierte die quantitative Analyse im Gegensatz zu der von uns verwendeten Gel-freien Methode auf fluoreszenzgefärbten 2D-Gelen, bei der lediglich Proteine, die eine signifikant differentielle Spot-Intensität aufwiesen, mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden (You, Verschoor et al. 2012). Die Gel-basierte Methode hat neben einem hohen Arbeitsaufwand auch technische Limitationen (Baggerman, Vierstraete et al. 2005). So können mittels der 2D-Gelelektrophorese lediglich 30 % bis 50 % des gesamten Proteoms einer Probe dargestellt werden (Baggerman, Vierstraete et al. 2005). Vor allem niedrigabundante Proteine und jene, die durch ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften nicht aufgetrennt werden können, werden nicht detektiert, was in einen hohen Verlust an interessanten Proteinen resultiert (Baggerman, Vierstraete et al. 2005). Die Weiterentwicklung der gel-basierten Methode, die Flüssigkeitschromatographie, bei der Peptide einfach und akkurat aufgetrennt werden können, stellt eine moderne Alternative dar. Weiterhin wurde in dieser Studie zur quantitativen Analyse des Plasmaproteoms auf eine label-basierte Technik zurückgegriffen (You, Verschoor et al. 2012), während wir die

Quantifizierung der Proteine label-frei durchführten (Publikation). Bei der label-freien Messmethode werden die Proteine durch den Label-Prozess nicht strukturell und funktionell verändert und sind somit in ihrer biologischen Natürlichkeit messbar (Rozanova, Barkovits et al. 2021), weshalb die label-freie Messtechnik oftmals bevorzugt für eine Quantifizierung der Proteine herangezogen wird. Infolge der zahlreichen Weiterentwicklungen und Verbesserungen der Messtechniken wäre es daher sinnvoll, auch das Plasmaproteom von MAP-infizierten Kühen erneut mithilfe einer modernen, weiterentwickelten Technologie wie der label-freien differentiellen Proteomanalyse zu analysieren. Dabei sollte der Infektionsstatus der Kühe neben dem Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern auch anhand des direkten Erregernachweises in der kulturellen Anzucht aus Kotproben erfolgen, um eine adäquate Zuordnung zur jeweiligen Vergleichsgruppe zu ermöglichen.

Um eine molekulare Funktion der massenspektrometrisch identifizierten Proteine und funktionelle Zusammenhänge aufzuzeigen, wurden im Rahmen dieser Arbeit sogenannte Pathway-Enrichment-Analysen mit Hilfe von zwei frei verfügbaren Online-Datenbanken, ShinyGO (Version 0.77, <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) und Reactome (Version 87, <https://reactome.org/>), durchgeführt (Publikation). Bei diesen Analysen werden die Proteine bioinformatisch mit Signalweg-Datenbanken abgeglichen, um eine Überrepräsentation von Proteinen in einem bestimmten Reaktionsweg zu ermitteln (Zhao and Rhee 2023; Buzzao, Castresana-Aguirre et al. 2024). Dadurch konnte ein Zusammenhang zwischen den mit Hilfe von Massenspektrometrie generierten, molekularen Daten und biologisch relevanten Prozessen hergestellt werden. In dieser Studie wurden alle Proteine, die eine signifikante 1,5-fache Erhöhung der Abundanz im Serum von MAP-infizierten Kühen aufwiesen, durch den Abgleich mit den Datenbanken ShinyGO und Reactome ausgewertet (Publikation). Bei der Auswertung mit der Datenbank ShinyGO wurden die bovinen Genbezeichnungen verwendet, so dass die Software automatisch die am besten passende Spezies, nämlich „cow“, für die Analyse auswählte (Publikation). So wurden die Daten zwar rinderspezifisch analysiert, allerdings mit dem Nachteil, dass die Analyse mit bovinen Gennamen weniger effizient ist als eine Analyse mit humanen und murinen Gennamen, da die Verfügbarkeit von annotierten Pfaden aufgrund einer unzureichenden Verknüpfung genomischer und proteomischer Daten mit biologischen Signalwegen beim Rind begrenzt ist. Im Gegensatz dazu basierte die Analyse mithilfe der Datenbank

Reactome auf den humanen, orthologen Genbezeichnungen (Publikation), da einerseits viele bovine Genbezeichnungen von vornherein von der Datenbank nicht erkannt wurden und andererseits somit eine höhere Effizienz der Analyse erreicht werden konnte. Da beim Menschen im Vergleich zum Rind durch die deutlich höhere Anzahl an publizierten wissenschaftlichen Studien bereits wesentlich mehr Proteine und Gene mit bestimmten Signalwegen in Verbindung gebracht wurden, können Genbezeichnungen überhaupt erst einem Pfad zugeordnet werden beziehungsweise ist die Anzahl der annotierten Pfade für eine Genbezeichnung weitaus größer. Ein Nachteil bei der Verwendung von humanen Orthologen ist allerdings, dass einerseits speziesspezifische Unterschiede nicht entdeckt werden, was als Limitation dieser Studie angesehen werden kann, und andererseits die alleinige Betrachtung der Ergebnisse von Pathway-Enrichment-Analysen aufgrund bereits bekannter Zusammenhänge zwischen bestimmten Proteinen und Signalwegen nicht unbedingt zu neuen Erkenntnissen führt. Aus diesem Grund wurden in unserer Analyse des Serumproteoms von MAP-infizierten Rindern neben der Betrachtung von überrepräsentativen Pfaden auch die Funktion einzelner Proteine und ihre Bedeutung bei einer MAP-Infektion erörtert.

Die Ergebnisse der Pathway-Enrichment-Analysen zeigten eine deutliche Assoziation von signifikant erhöht abundanten Proteinen im Serum von MAP-infizierten Rindern im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen mit Signalwegen, die dem Immunsystem zugeordnet werden (Figure 3 und 4, Publikation). Die bioinformatische Auswertung mit der Datenbank ShinyGO zeigte eine Überrepräsentation des Pfades „Phagosome“ bei MAP-infizierten Rindern im Vergleich zu gesunden, nicht-infizierten Kühen desselben Betriebs und des Paratuberkulose-freien Betriebs (Figure 3, Publikation). Bei einer Infektion mit MAP wird der Erreger von Makrophagen durch Phagozytose aufgenommen und persistiert intrazellulär (McQueen and Groves 2022). Die genauen Mechanismen, die das Überleben des Erregers in der Zelle ermöglichen, sind noch nicht vollständig geklärt. Es ist bereits bewiesen, dass MAP die Ansäuerung des Phagosoms inhibiert (Kuehnel, Goethe et al. 2001). Inwiefern MAP die Reifung des Phagosoms zum Phagolysosom verhindert, ist weiterhin offen. Ein mit dem Pfad „Phagosome“ assoziiertes Protein ist FCGR1A (Tabelle 1, Publikation). In unserer Serumproteomik detektierten wir eine signifikant erhöhte Abundanz von FCGR1A, auch bekannt als CD64, im Serum von MAP-infizierten Kühen im Vergleich zu

gesunden, nicht-infizierten Kühen desselben infizierten Betriebs und eines Paratuberkulose-freien Betriebs (Figure 1, Publikation). Nach unserem Wissensstand (PubMed Recherche vom 23.08.2024) konnten wir im Serum von Rindern erstmals eine erhöhte Abundanz von FCGR1A im Zusammenhang mit der bovinen Paratuberkulose nachweisen. In Studien mit humanem Serum wurde FCGR1A noch nicht im Zusammenhang mit der Tuberkulose beschrieben, jedoch mit anderen Erkrankungen, unter anderem periprothetischer Gelenkinfektion und akutem Nierenversagen (Mearrelli, Barbati et al. 2021; Yalamanchili, Rockov et al. 2023). Bei Rindern wird FCGR1A auf Leukozyten, vor allem auf Makrophagen exprimiert (Noble, Paudyal et al. 2023). Die funktionellen Eigenschaften von bovinem FCGR1A sind allerdings noch nicht vollständig erforscht. Beim Menschen ist wissenschaftlich bestätigt, dass durch die Bindung des Fc-Teils von Immunglobulin G (IgG) an das hochaffine FCGR1A verschiedene immunologische Effektorfunktionen, unter anderem Phagozytose, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*engl.* reactive oxygen species, ROS), oder die Expression von Zytokinen und Antikörperpräsentation ausgelöst werden (Bournazos, Wang Taia et al. 2016). Im Transkriptom boviner Speicheldrüsen konnte bereits in einer früheren Studie ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von FCGR1A und der bovinen Paratuberkulose hergestellt werden (Mallikarjunappa, Adnane et al. 2019). Dabei wurde eine Hochregulierung von FCGR1A im Transkriptom der Speicheldrüsen von Kühen gezeigt, die experimentell mit MAP infiziert wurden, wodurch eine erhöhte Aufnahme von MAP durch die Wirtszelle angenommen wurde (Mallikarjunappa, Adnane et al. 2019). Bei an Paratuberkulose erkrankten Schafen wurde eine erhöhte Expression von FCGR1A im Transkriptom von ileocäcalen Lymphknoten festgestellt, wobei die Bedeutung dieser erhöhten Abundanz von FCGR1A weiterhin unklar ist (Gossner, Watkins et al. 2017). Somit steht die in dieser Arbeit detektierte erhöhte Abundanz von FCGR1A in MAP-infizierten Kühen im Einklang mit früheren Studien, in denen eine MAP-Infektion bereits mit einer vermehrten Expression von FCGR1A assoziiert wurde. Welche Bedeutung die Überrepräsentation dieses Rezeptors bei der Immunantwort des Wirts im Rahmen der Paratuberkulose hat, ist bis dato noch nicht bekannt. Denkbar wäre, dass MAP die Expression von FCGR1A induziert, um durch Phagozytose vermehrt in die Zelle aufgenommen zu werden. Innerhalb der Zelle können MAPs dem Immunsystem des Wirts ausweichen und persistieren. In diesem Zusammenhang könnte durch

eine erhöhte Expression von FCGR1A das Überleben des Erregers gefördert werden.

Neben der Paratuberkulose wurde FCGR1A bereits mit einer weiteren mykobakteriellen Infektionskrankheit bei Rindern, der Tuberkulose, in Zusammenhang gebracht (Gonzalez-Ruiz, Strillacci et al. 2019). In einer genomweiten Assoziationsstudie wurden Quantitative Trait Loci Regions (QTLRs) identifiziert, die bei Rindern mit einer Resistenz gegen beziehungsweise Prädisposition für die bovine Tuberkulose in Zusammenhang stehen (Gonzalez-Ruiz, Strillacci et al. 2019). Einer dieser QTLRs beinhaltete FCGR1A (Gonzalez-Ruiz, Strillacci et al. 2019), das bereits in Studien beim Menschen als potenzieller Biomarker für die Tuberkulose identifiziert wurde (Jenum, Bakken et al. 2016; Ansari, Singh et al. 2024). Nach der RNA-Extraktion aus dem peripherem Vollblut von Kindern, die an einer durch *Mycobacterium tuberculosis* ausgelösten intrathorakalen Tuberkulose litten, zeigte sich eine Korrelation des Expressionslevels von FCGR1A mit dem Schweregrad der Erkrankung (Jenum, Bakken et al. 2016). Dieses Ergebnis könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass durch eine erhöhte Expression von FCGR1A vermehrt MAPs durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen werden könnten. Dadurch wird die Erregerlast im Organismus erhöht, was wiederum resultierend aus einer verstärkten Ausprägung der Inflammation zu einem schwereren Verlauf der Paratuberkulose führt. Ob durch eine erhöhte Expression von FCGR1A die Phagozytoserate steigt, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Zudem muss untersucht werden, inwiefern der Mechanismus der Internalisierung von MAP über FCGR1A erfolgt. Der Ablauf der Phagozytose kann anhand einer Fluoreszenzfärbung von MAPs und FCGR1A in einer Live-Zell-Bildgebung untersucht werden. Anschließend kann eine Korrelation der Expression von FCGR1A mit der Menge an phagozytierten MAPs in den Zellen bestimmt werden.

Überträgt man die Korrelation des Expressionslevels von FCGR1A mit dem Schweregrad der Erkrankung nun auf eine MAP-Infektion bei Rindern, könnte mithilfe dieses Markers möglicherweise das Stadium im Krankheitsverlauf der Paratuberkulose ermittelt werden. Da die Menge der Erregerausscheidung mit dem Fortschreiten der Erkrankung zunimmt (McAloon, Roche et al. 2019), könnte durch die Bestimmung des Expressionslevels von FCGR1A auch das Ausmaß der Erregerausscheidung bestimmt werden, wodurch nicht alle, sondern primär Rinder,

die maßgebend an einem hohen Infektionsdruck beteiligt sind, nach dem Prinzip der „test-and-cull“-Strategie aus der Herde entfernt werden könnten, um die wirtschaftlichen Schäden durch vorzeitiges Schlachten in Grenzen zu halten. Die Korrelation von FCGR1A mit dem Fortschreiten der Paratuberkulose und der Erregerausscheidung muss in einem weiterführenden Assay untersucht werden, bei dem die Abundanz von FCGR1A im Serum von Kühen, die sich in unterschiedlichen Erkrankungsstadien der Paratuberkulose befinden, untersucht wird.

Bei Menschen wurde eine erhöhte Expression von hochaffinem FCGR1 durch eine Behandlung mit IFN- γ an der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und Monozyten induziert (Schiff, Rae et al. 1997). Zudem wurde durch IFN- γ auch die FCGR-abhängige Phagozytose verstärkt (Schiff, Rae et al. 1997). Da an Paratuberkulose erkrankte Rinder vermehrt IFN- γ produzieren (Dudemaine, Fecteau et al. 2014), könnte IFN- γ die Expression von FCGR1A bei Rindern induzieren und für die extrazelluläre Freisetzung von löslichem FCGR1A verantwortlich sein. Von welchen Zellen FCGR1A dabei freigesetzt wird, ist unklar. Da eine erhöhte Expression von FCGR1A in Assoziation mit der Tuberkulose nicht nur auf humanen Monozyten, die sich nach dem Austritt aus dem Blut zu Makrophagen differenzieren und den Mykobakterien nach deren Phagozytose ein Überleben innerhalb des Organismus ermöglichen, sondern auch auf der Oberfläche von humanen neutrophilen Granulozyten nachgewiesen wurde (Nancy Hilda and Das 2018; Typiak, Trzonkowski et al. 2023), wäre es denkbar, dass entweder Monozyten oder neutrophile Granulozyten, oder sogar beide Zellarten vermehrt FCGR1A in den extrazellulären Raum freisetzen. Weiterführend kann nach der Charakterisierung des Expressionsmusters von FCGR1A auf bovinen peripheren Blutleukozyten die zellartspezifische Freisetzung von FCGR1A anhand eines *in vitro* Ko-Inkubations-Assays von peripheren Blutleukozyten mit MAP ermittelt werden.

Lösliche FCGRs interagieren sowohl mit freiem IgG als auch mit IgG-Immunkomplexen und können somit eine Fc-abhängige Immunreaktion blockieren (Galon, Paulet et al. 1997; Nimmerjahn and Ravetch 2008). Die Bindung von IgG an FCGRs führte unter anderem bei Mäusen zu einer erhöhten Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α aus Makrophagen (Loefering and Lennartz 2002). Durch die Interaktion von löslichen FCGRs mit IgG und IgG-Immunkomplexen kommt es zu einer verminderten Bindung von IgG an FCGRs

auf der Zelloberfläche, wodurch eine durch diese Bindung ausgelöste Immunreaktion schwächer ausfällt. Die höhere Abundanz von löslichem FCGR1A im Serum von MAP-infizierten Kühen könnte daher eine effektive Immunantwort dieser Wirte wie die Freisetzung von Zytokinen verhindern. FCGR1-knockout Mäuse zeigten eine verbesserte Kontrolle von *Mycobacterium tuberculosis* im Vergleich zu Kontrollmäusen (Ahmed, Thirunavukkarasu et al. 2020), was darauf hindeutet, dass eine erhöhte Abundanz von FCGR1A nicht zu einer effizienten Bekämpfung von *Mycobacterium tuberculosis* beiträgt und die Immunantwort des Wirts sogar negativ beeinflusst. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen von Mykobakterien induzierten Mechanismus, der die Immunantwort des Wirts verstärkt und somit eine effiziente Internalisierung in die Zellen erreicht, in denen die Mykobakterien letztendlich geschützt vor dem Immunsystem des Wirts persistieren. In einem nächsten Schritt sollte daher die Rolle von FCGR1A bei der Immunantwort des Wirts auf eine Infektion mit MAP untersucht werden.

Im Folgenden werden nun die mittels Pathway-Enrichment-Analysen ermittelten Signalwege, an denen FCGR1A beteiligt ist, betrachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Pfad „Fcgamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis“ und alle Pfade, die diesem untergeordnet sind, nämlich „Role of phospholipids in phagocytosis“, „FCGR activation“ und „Regulation of actin dynamic for phagocytic cup formation“, eine Überrepräsentation in MAP-infizierten Kühen nur im Vergleich zu gesunden, nicht-infizierten Kühen desselben infizierten Bestandes zeigten (Figure 4a, Publikation). Keiner dieser Pfade zeigte eine Anreicherung im Vergleich zu den gesunden Kontrollen des Paratuberkulose-freien Betriebs (Figure 4b, Publikation). Die Bedeutung der Überrepräsentation des Pfads „Fcgamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis“ und aller diesem Pfad untergeordneten Pfade ist noch nicht geklärt. Da diese Anreicherung ausschließlich im Vergleich zu den gesunden, nicht-infizierten Kühen auftrat, die trotz einer Exposition mit MAP nicht infiziert wurden, kann geschlossen werden, dass die „Fcgamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis“ mit einer Anfälligkeit für beziehungsweise einer Resistenz gegenüber der Paratuberkulose assoziiert ist. Basierend auf diesen Ergebnissen stellen wir die Hypothese auf, dass durch eine Herunterregulierung der FCGR-abhängigen Phagozytose eine Aufnahme von MAP in die Makrophagen verhindert werden kann und dem Erreger auf diese Weise keine Möglichkeit gegeben wird im Organismus zu persistieren. Dadurch könnte erklärt werden,

warum es trotz einer Aufnahme des Erregers nicht zu einer Infektion kommt. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der FCGR-abhängigen Phagozytose und einer Anfälligkeit für eine MAP-Infektion herzustellen, müssen zukünftig die Effekte der an diesen Signalwegen beteiligten Proteinen, unter anderem FCGR1A und Actin, gamma 1 (ACTG1) (Table 1, Publikation), auf einen Kontakt mit MAP untersucht werden. Dabei sollten MAP-infizierte Rinder sowie Rinder, die trotz einer Exposition mit MAP nicht infiziert wurden, herangezogen werden. Nach einer *in vitro* Ko-Inkubation von peripheren Blutleukozyten mit MAP, kann eine Expression der an der FCGR-abhängigen Phagozytose beteiligten Proteine mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung bestimmt werden.

Weiterhin wurde in unserer Serumproteomik eine erhöhte Abundanz der Proteine CRISP3 und CTSC bei MAP-infizierten Kühen festgestellt (Table 1, Publikation). CRISP3 wurde in Granula von humanen neutrophilen Granulozyten entdeckt und spielt vermutlich eine antimikrobielle Rolle in der Immunantwort des angeborenen Immunsystems (Udby, Calafat et al. 2002; Linder, Mizoguchi et al. 2023). Im Gegensatz dazu induziert CTSC beim Menschen die Bildung und Freisetzung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) aus neutrophilen Granulozyten, die aus einem Netzwerk extrazellulärer Fasern bestehen, das die DNA von neutrophilen Granulozyten enthält (Yu, Fu et al. 2024). Die Funktion neutrophiler Granulozyten bei mykobakteriellen Infektionen, insbesondere bei der bovinen Paratuberkulose, ist bislang unklar. Bereits in einem *in vitro* Ko-Inkubations-Assay mit MAP wurde gezeigt, dass caprine neutrophile Granulozyten in der Immunantwort gegen MAP alle Effektorfunktionen – Phagozytose, Chemotaxis, Degranulation und NETs – aktivieren (Criado, Perez et al. 2023). Des Weiteren wurde in einer Studie an Kälbern, die experimentell mit MAP infiziert wurden, bereits in der Anfangsphase der Infektion eine erhöhte Migration neutrophiler Granulozyten zu den histologisch bestimmten Läsionen im Ileum sowie eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten in der Lamina propria, den Krypten und im Lumen des Ileums beobachtet (Khare, Nunes et al. 2009). Diese Ergebnisse sowie die von uns detektierte erhöhte Abundanz von CRISP3 und CTSC im Serum von MAP-infizierten Kühen deuten auf eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten während einer Infektion mit MAP hin.

Inwiefern und ob die Effektorfunktionen aktivierter boviner neutrophiler Granulozyten MAP abtöten, ist unklar. In einer *in vitro* Studie mit bovinen

neutrophilen Granulozyten wurde gezeigt, dass MAP die Bildung von NETs induziert (Ladero-Aunon, Molina et al. 2021). Befanden sich neutrophile Granulozyten jedoch zusammen mit Makrophagen in Kultur, wurde eine geringere Anzahl von NETs gemessen (Ladero-Aunon, Molina et al. 2021). Diese Untersuchungen zeigten zudem, dass bovine neutrophile Granulozyten fähig sind, MAP zu töten (Ladero-Aunon, Molina et al. 2021). Dennoch wurde bei zusätzlicher Anwesenheit von Makrophagen eine schlechtere Tötungsrate erzielt (Ladero-Aunon, Molina et al. 2021). Daraus schlossen die Autoren, dass neutrophile Granulozyten MAPs effektiv töten könnten, dies jedoch durch die Präsenz von Makrophagen beeinträchtigt wird (Ladero-Aunon, Molina et al. 2021). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass MAPs von Makrophagen phagozytiert werden und hier im Zellinneren geschützt vor den Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten persistieren. Auf dieser Grundlage kann die Hypothese aufgestellt werden, dass MAP zwar eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten induziert, die neutrophilen Granulozyten jedoch nicht in der Lage sind, den Erreger effizient zu bekämpfen. Möglicherweise liegt dies daran, dass MAP3916c, eine extrazelluläre DNase der MAPs, NETs zersetzen kann und die Kolonisation von MAP fördert, was bereits in einem *in vivo*-Assay bei C57BL/6-Mäusen gezeigt wurde (Zang, Dang et al. 2022). Bei Meerschweinchen konnte zudem gezeigt werden, dass die durch neutrophile Granulozyten freigesetzten NETs *Mycobacterium tuberculosis* zwar einfangen können, aber diese NETs nicht in der Lage sind, den Erreger abzutöten, was an der komplexen Zellwand und den Mechanismen der Toxinabwehr von Mykobakterien liegen kann (Filio-Rodriguez, Estrada-Garcia et al. 2017). Es wurde sogar die Hypothese aufgestellt, dass NETs andere Immunzellen wie Lymphozyten und Makrophagen binden können, was die Immunantwort beeinträchtigen könnte (Sivanandham, Brocca-Cofano et al. 2018; Parker, Forrester et al. 2021). Diese Ergebnisse unterstützen unsere Hypothese, dass die Funktionen neutrophiler Granulozyten gegenüber einer Infektion mit MAP nicht effektiv sind und deuten sogar darauf hin, dass deren Aktivierung die Immunantwort von Rindern auf MAP negativ beeinflusst. Die Rolle neutrophiler Granulozyten bei der bovinen Paratuberkulose sowie die Effizienz ihrer Effektorfunktionen zur Bekämpfung von MAP müssen in weiterführenden Studien geklärt werden.

Die Proteine CRISP3 und CTSC sind dem Pfad „Neutrophil degranulation“ zugeordnet, welcher im Rahmen dieser Arbeit anhand von

Pathway-Enrichment-Analysen eine Anreicherung in MAP-infizierten Kühen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen aufwies (Figure 4, Publikation). Neutrophile Degranulation bezeichnet die Freisetzung von Granula durch neutrophile Granulozyten. Diese Granula enthalten antimikrobielle Proteine, die Mikroorganismen abtöten sollen (Eichelberger and Goldman 2020). Die Degranulation kann extrazellulär erfolgen, um Erreger außerhalb der Zelle zu bekämpfen, oder intrazellulär in das Phagosom, um Pathogene, die bereits durch Phagozytose aufgenommen wurden, abzutöten (Eichelberger and Goldman 2020). Die durch Exozytose freigesetzten neutrophilen Granula sind jedoch für den Wirt toxisch und können neben einer exzessiven Freisetzung von NETs zu Gewebeschäden führen (Eichelberger and Goldman 2020; Lodge, Cowburn et al. 2020; Parker, Forrester et al. 2021). Daher könnten eine vermehrte neutrophile Degranulation, auf die die erhöhte Abundanz von CRISP3 hinweist, sowie die überproportionale Freisetzung von NETs, die möglicherweise durch eine erhöhte Abundanz von CTSC induziert wird, zu Gewebeschäden führen und negativ zum Entzündungsgeschehen beitragen. Inwieweit neutrophile Effektorfunktionen im Rahmen der bovinen Paratuberkulose an Gewebeschäden beteiligt sind, kann in zukünftigen Studien untersucht werden, indem Gewebeproben histologisch auf Schäden untersucht werden und mithilfe eines immunhistochemischen Nachweises von proteolytischen Enzymen wie Elastase und Myeloperoxidase, die von neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden, analysiert werden.

Die Auswertung der Daten des Serumproteoms mit der Datenbank ShinyGO ergab eine Anreicherung des Pfads „Phagosome“ bei MAP-infizierten Kühen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (Figure 3, Publikation). Bezüglich der Phagozytose von MAP wurde bereits bei Ziegen nachgewiesen, dass neben Makrophagen auch neutrophile Granulozyten in der Lage sind, MAP zu phagozytieren (Criado, Perez et al. 2023). Die Frage, welchen Effekt eine Phagozytose durch neutrophile Granulozyten auf MAP hat, ist noch nicht geklärt. Bei Menschen induzierte *Mycobacterium tuberculosis* die Nekrose infizierter neutrophiler Granulozyten, so dass diese samt den intrazellulären, lebendigen Mykobakterien, die aufgrund ihrer hohen Resistenz gegenüber neutrophilen Oxidantien überlebt haben, durch Makrophagen phagozytiert werden, in deren Phagosomen sie ihr Wachstum fortsetzen können (Dallenga, Repnik et al. 2017; Parker, Forrester et al. 2021). Im Gegensatz dazu wurde bei mit *Mycobacterium tuberculosis* infizierten Mäusen

gezeigt, dass aktivierte neutrophile Granulozyten eine längere Lebensspanne haben und eine größere Anzahl an lebenden Bakterien beherbergten, was das Überleben und Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* unterstützt (Andrews, Zhang et al. 2024). Diese Ergebnisse verdeutlichen nicht nur, dass neutrophile Granulozyten unfähig sind, Mykobakterien durch ihre Effektorfunktionen abzutöten, sondern sogar deren Überleben und Wachstum fördern können. Da aktivierte murine neutrophile Granulozyten durch die Ausprägung von FCGR1A an der Zelloberfläche gekennzeichnet sind (Andrews, Zhang et al. 2024), könnte die erhöhte Abundanz von FCGR1A im Serum von MAP-infizierten Kühen auf eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten hindeuten. Folglich werden neutrophile Granulozyten zwar durch eine MAP-Infektion des Wirts aktiviert und beteiligen sich mithilfe ihrer Effektorfunktionen an der Bekämpfung des Erregers, was durch die Überrepräsentation von Proteinen des Pfads „Neutrophil degranulation“ bestätigt wird. Andererseits scheint die Bekämpfung von MAP durch neutrophile Granulozyten keine effiziente Wirkung zu zeigen und resultiert möglicherweise in Gewebeschäden des Wirts sowie in der Förderung des Überlebens und Wachstums von MAP. Neutrophile Granulozyten stellen somit einen Schlüsselpunkt bei mykobakteriellen Infektionen dar, weshalb eine adäquate Untersuchung ihrer Rolle, vor allem hinsichtlich der bovinen Paratuberkulose, essentiell ist. Dabei sind nach einer nachweislichen Exposition mit MAP verschiedene Phänotypen zu betrachten. Anhand von Rindern, die sich nach einer Exposition nicht infizieren, kann die mögliche Beteiligung neutrophiler Effektorfunktionen an der effizienten Beseitigung von MAP analysiert werden. Zudem muss durch die Untersuchung MAP-infizierter Rinder geklärt werden, ob neutrophile Granulozyten eine Persistenz von MAP fördern oder gar dafür verantwortlich sind.

Die Datenbank Reactome untergliedert den Pfad „Immune System“ in die drei Kategorien: „Adaptive Immune System“, „Innate Immune System“ und „Cytokine Signaling Immune System“. Alle drei Unterkategorien zeigten eine Überrepräsentation bei MAP-infizierten Kühen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (Figure 4, Publikation). Während der Signalweg „Interferon gamma signaling“ und der bereits erwähnte Pfad „Neutrophil degranulation“ der Kategorie „Cytokine Signaling Immune System“ beziehungsweise „Innate Immune System“ angehören, konnte in der Kategorie „Adaptive Immune System“ anhand von Pathway-Enrichment-Analysen eine Anreicherung des Signalwegs „MHC class II

antigen presentation“ beobachtet werden (Figure 4, Publikation). Unsere Studie bezieht sich dabei auf Proteine, die im Serum von MAP-infizierten Kühen eine signifikant erhöhte Abundanz aufwiesen. Eines der im Pfad „MHC class II antigen presentation“ involvierten Proteine ist CTSS (Tabelle 1, Publikation). In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein Zusammenhang einer erhöhten Abundanz von CTSS im Serum von Rindern mit der bovinen Paratuberkulose hergestellt. CTSS ist eine lysosomale Cysteinpeptidase, die beim Rind bereits in der Niere, der Milz, der Lunge, den Lymphknoten sowie in den glatten Muskelzellen nachgewiesen wurde (Kirschke, Wiederanders et al. 1989; Cheng, Kuzuya et al. 2006). Eine Expression von CTSS in bovinen Immunzellen ist noch unklar. Bei Mäusen kommt CTSS hauptsächlich in Immunzellen, unter anderem professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen vor (Steimle, Kalbacher et al. 2016; Smyth, Sasiwachirangkul et al. 2022). Neben der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix ist CTSS maßgeblich an der Immunantwort des Wirts beteiligt, indem es Proteine innerhalb des Phago lysosoms zersetzt und die MHC-Klasse-II-Antigenpräsentation reguliert (Smyth, Sasiwachirangkul et al. 2022). Bei Letzterem spaltet CTSS die MHC-Klasse-II-assozierte, Chaperon-invariante Kette Ii und generiert das Klasse II invariante Kettenpeptid (*engl.* class II invariant chain peptide, CLIP) (Riese, Wolf et al. 1996; Bania, Gatti et al. 2003). Nach dem Austausch des CLIPs gegen antigene Peptidfragmente wird das mit Peptiden beladene MHC-Klasse-II zur Plasmamembran transportiert und kann von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden (Riese, Wolf et al. 1996; Bania, Gatti et al. 2003).

Neben einer erhöhten Abundanz von CTSS wies auch MHC-Klasse-II eine höhere Abundanz im Serum von MAP-infizierten Kühen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen auf (Figure 1, Publikation), was auf eine funktionelle Korrelation dieser beiden Proteine hindeutet. Wie eine erhöhte extrazelluläre Freisetzung von MHC-Klasse-II und CTSS bei einer MAP-Infektion abläuft, ist nicht bekannt. Im Gegensatz zur vermehrten Freisetzung von MHC-Klasse-II, ist bei Rindern bereits bekannt, dass MAP die Expression von MHC-Klasse-II auf der Oberfläche von Makrophagen inhibiert (Weiss, Evanson et al. 2001). Inwiefern diese Inhibierung abläuft, ist bis jetzt nicht vollständig geklärt. In einem *in vitro* Infektionsassay von bovinen Makrophagen mit MAP führte die Neutralisation von IL-10 zu einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-II, TNF- α , IL-8 und IL-12 (Weiss, Evanson et al. 2005).

In einer weiteren *in vitro* Studie mit humanen Makrophagen, die aus einer monozytären Zelllinie differenziert und mit *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Expression von MHC-Klasse-II auf der Inhibierung von CTSS basierte, die durch die Sekretion von IL-10 induziert wurde (Sendide, Deghmane et al. 2005). Daher wäre es interessant, eine mögliche Inhibierung der Expression von CTSS in bovinen Makrophagen durch IL-10 und die damit zu erwartenden Einschränkungen der MHC-Klasse-II-Antigenpräsentation zu untersuchen.

Bereits in einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression von MHC-Klasse-II auf bovinen PBMCs untersucht (Korbonits, Kleinwort et al. 2022). Dabei wurden PBMCs von MAP-infizierten Kühen sowie von MAP-resistenten Kühen mit MAP ko-inkubiert und anschließend die Abundanz von MHC-Klasse-II sowohl massenspektrometrisch als auch mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung bestimmt, wobei eine erhöhte Expression von MHC-Klasse-II auf PBMCs von MAP-resistenten Kühen gezeigt wurde (Korbonits, Kleinwort et al. 2022). Im Gegensatz dazu steht die in dieser Arbeit detektierte erhöhte Abundanz von MHC-Klasse-II im Serum von MAP-infizierten Kühen (Figure 1, Publikation). Somit inhibiert eine Infektion mit MAP einerseits die Expression von MHC-Klasse-II auf Zellen, andererseits führt sie zu einer erhöhten Abundanz von MHC-Klasse-II im Sekretom der Blutzellen. Eine erhöhte Abundanz von MHC-Klasse-II im extrazellulären Raum kann durch ein Phänomen erklärt werden, das bereits bei murinen Makrophagen, die mit *Mycobacterium tuberculosis* oder *Mycobacterium bovis* BCG infiziert worden waren, entdeckt wurde (Ramachandra, Qu et al. 2010). Dabei schieden die Makrophagen MHC-Klasse-II in Exosomen und von der Plasmamembran stammenden Mikrovesikeln in einer ATP-abhängigen Reaktion aus (Ramachandra, Qu et al. 2010). Hierbei wurde auch gezeigt, dass diese Organellen durchaus in der Lage waren, CD4⁺ T-Zellen Antigene zu präsentieren (Ramachandra, Qu et al. 2010). Dieser Prozess könnte einen alternativen Mechanismus für eine effektive Antigenpräsentation in mykobakteriellen Infektionen darstellen. Da eine MAP-Infektion die Expression von MHC-Klasse-II auf der Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen inhibiert, stellen wir die Hypothese auf, dass MHC-Klasse-II als Alternative dafür in hohen Mengen in Mikrovesikeln und Exosomen freigesetzt werden könnte, um eine Antigenpräsentation zu ermöglichen. Um diese Hypothese zu verfolgen, müssen aus dem Serum von MAP-infizierten

Kühen sowie nicht-infizierten Kühen aufgereinigte Exosomen und Mikrovesikel auf das differentielle Vorhandensein von MHC-Klasse-II untersucht werden.

Die Funktion der im Rahmen dieser Arbeit detektierten erhöhten Abundanz von CTSS im Serum von MAP-infizierten Kühen (Figure 1, Publikation) ist noch nicht bekannt. Aufgrund der bereits bewiesenen Regulation von MHC-Klasse-II durch CTSS bei Mäusen und Menschen (Sendide, Deghmane et al. 2005; Smyth, Sasiwachirangkul et al. 2022), könnte eine erhöhte Abundanz von extrazellulärem CTSS im Serum von MAP-infizierten Rindern mit einer vermehrten Freisetzung von MHC-Klasse-II in Exosomen und Mikrovesikeln im Kontext stehen. Zusätzlich kann extrazelluläres humanes CTSS, dessen Freisetzung durch pro-inflammatorische Zytokine induziert wird, unter anderem durch die Spaltung von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Proteinen eine Entzündung regulieren (Andrault, Samsonov et al. 2015; Repnik, Starr et al. 2015; Brown, Nath et al. 2020; Sullivan, Davidovich et al. 2022). Da unsere Analyse des Serumproteoms eine Anreicherung von Proteinen des Pfads „Neutrophil degranulation“ bei MAP-infizierten Rindern ergab, wäre eine vermehrte Freisetzung von antimikrobiellen Proteinen naheliegend. Da die exzessive Abgabe von Granula aus neutrophilen Granulozyten zu Gewebeschäden führt (Eichelberger and Goldman 2020), könnte eine erhöhte Abundanz von extrazellulärem CTSS damit korrelieren, um potenzielle Gewebeschäden durch eine Spaltung antimikrobieller Proteine zu verhindern.

Da eine erhöhte Abundanz von CTSS im Serum MAP-infizierter Rinder im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen – den gesunden, nicht-infizierten Kühen desselben infizierten Betriebs und den gesunden Kühen des Paratuberkulose-freien Betriebs – detektiert wurde (Figure 1, Publikation), wählten wir CTSS als den idealen Biomarker für die bovine Paratuberkulose aus. Dabei kann eine erhöhte Abundanz von CTSS nicht nur eine MAP-Infektion in einem Bestand anzeigen, sondern auch zwischen infizierten und nicht-infizierten Rindern differenzieren. Mithilfe eines Western Blot-Assays wurden die massenspektrometrisch ermittelten Ergebnisse für CTSS im Kontext einer praxistauglichen Anwendung und anhand einer höheren Anzahl an MAP-infizierten sowie gesunden, nicht-infizierten Rindern, die einer Exposition mit MAP ausgesetzt waren, aus zwei verschiedenen Beständen verifiziert (Figure 5, Publikation). Allerdings könnte die Nutzung von extrazellulärem CTSS als Biomarker für die bovine Paratuberkulose auch Limitationen aufweisen. So könnte eine erhöhte Abundanz von CTSS nur in bestimmten Krankheitsstadien

der Paratuberkulose auftreten, weshalb in einem nächsten Schritt zu untersuchen ist, inwiefern extrazelluläres CTSS mit den Stadien der Erkrankung assoziiert ist. Zusätzlich wäre es interessant, ob die Abundanz von CTSS mit der Menge an MAP-spezifischen Antikörpern und der Keimzahl in Kot und Milch korreliert.

Eine weitere Limitation könnte durch eine potenzielle Assoziation von CTSS mit anderen Erkrankungen auftreten. Im humanen Serum wurde eine erhöhte Abundanz von CTSS unter anderem bereits mit Diabetes Typ I und verschiedenen Krebsarten assoziiert (Liu, Liu et al. 2016; Ghanadi, Ashorzadeh et al. 2022; Frorup, Jensen et al. 2024). Bei Diabetes Typ I wurde die Freisetzung von CTSS aus humanen Inselzellen und β -Zellen durch pro-inflammatorische Zytokine induziert (Frorup, Jensen et al. 2024), was darauf hindeutet, dass CTSS generell bei Entzündungsprozessen freigesetzt werden könnte. In Bezug auf Krebs wurde bereits bei Menschen gezeigt, dass CTSS durch den Abbau der extrazellulären Matrix zur Tumordinvasion beiträgt und durch die Regulierung der Angiogenese, also der Bildung neuer Blutgefäße, das Tumorstadium fördert (Fan, Wang et al. 2012). Eine möglicherweise durch MAP induzierte erhöhte Abundanz von extrazellulärem CTSS könnte ein Mechanismus des Erregers darstellen, sein Wachstum durch eine verbesserte Gewebedurchblutung infolge der Angiogenese zu begünstigen. Weiterhin förderte beim Menschen ein Umbau der extrazellulären Matrix durch CTSS die durch eine chronische Entzündung ausgelöste Fibrogenese der Leber (Zuo, Xie et al. 2023). Eine Gewebeumstrukturierung durch CTSS bei der bovinen Paratuberkulose und eine daraus resultierende Förderung des Entzündungsgeschehen sollte daher als mögliche Funktion von CTSS in Betracht gezogen und erforscht werden. Zusätzlich ist es essentiell, als nächstes zu untersuchen, ob eine erhöhte Menge von CTSS im Serum oder Plasma auch bei anderen mykobakteriellen und nicht-mykobakteriellen Infektionen aufgezeigt werden kann, um die Eignung von CTSS als potenziellen Biomarker für die bovine Paratuberkulose zu überprüfen. Für die Diagnostik von klinischen Erkrankungen sollte jedoch ohnehin nicht ausschließlich ein einziger Laborparameter herangezogen werden. Zwingend notwendig ist die Betrachtung weiterer klinischer Parameter. Dennoch ist die Zuversicht groß, dass extrazelluläres CTSS, neben weiteren Kandidaten in einem Biomarker-Panel für die bovine Paratuberkulose, die momentan zur Verfügung stehenden diagnostischen Nachweisverfahren verbessern kann. Da für die Serumproteomik zwar eine überschaubare, aber

durchaus äußerst valide Stichprobengröße herangezogen wurde, muss die Einsetzbarkeit nun in großangelegten Kohortenstudien getestet werden. Es wäre dabei sinnvoll, neben CTSS auch den Nutzen anderer in dieser Arbeit oder bereits in anderen Studien identifizierten Biomarker zu validieren, um eine größtmögliche Zuverlässigkeit bei der Detektion sowohl von MAP-infizierten als auch von nicht-infizierten Rindern zu erreichen. Dabei sind Kandidaten, die eine starke Assoziation zu immunologischen Funktionen aufweisen, wie FCGR1A, MHC-Klasse-II, CTSS und CRISP3 zu bevorzugen, um frühzeitig eine durch eine MAP-Infektion ausgelöste Immunantwort zu erkennen.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit signifikante Unterschiede im Serumproteom von MAP-infizierten Kühen sowohl im Vergleich zu gesunden, nicht-infizierten Kühen desselben infizierten Betriebs als auch im Vergleich zu gesunden Kühen eines Paratuberkulose-freien Betriebs aufgedeckt werden. Die als signifikant differentiell abundant ermittelten Proteine und die mithilfe von Pathway-Enrichment-Analysen identifizierten Überrepräsentationen von Pfaden und Signalwegen ermöglichten neue Erkenntnisse bei den Wirt-Pathogen-Interaktionen während einer Infektion mit MAP. Hierbei scheinen vor allem die im Serum von MAP-infizierten Kühen höher abundanten Proteine FCGR1A, MHC-Klasse-II und CTSS sowie die Anreicherung von Proteinen in den Pfaden „Neutrophil degranulation“ und „MHC class II antigen presentation“ eine tragende Rolle bei der Immunantwort des Wirts zu spielen. Darüber hinaus könnte eine erhöhte Expression der mit dem Pfad „Fcgamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis“ assoziierten Proteine entscheidend für eine Anfälligkeit für eine MAP-Infektion sein. Die in dieser Arbeit ermittelten neuen Erkenntnisse zu den immunologischen Abläufen während einer MAP-Infektion bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Pathogenese der Paratuberkulose. Zusätzlich konnte extrazelluläres CTSS als potenzieller Biomarker für die bovine Paratuberkulose identifiziert werden. Dessen Praxistauglichkeit muss nun in großangelegten Kohortenstudien evaluiert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die bovine Paratuberkulose ist eine unheilbare, infektiöse, chronische, granulomatöse Enteritis bei Rindern, die erhebliche wirtschaftliche Verluste zur Folge hat. Da die derzeit zur Verfügung stehenden Nachweisverfahren aufgrund ihrer eingeschränkten Sensitivität und Spezifität nur bedingt eine Infektion mit dem zugrundeliegenden Erreger, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), detektieren können und oftmals zu falsch-positiven Ergebnissen führen, gestaltet sich eine gezielte Eradikation als besonders herausfordernd. Darüber hinaus ist eine effektive Bekämpfung der Paratuberkulose aufgrund ungeklärter Wirt-Pathogen-Interaktionen nach wie vor schwierig.

Das Ziel dieser Studie war es daher, neue Einblicke in die Faktoren des Wirts auf die Persistenz einer MAP-Infektion zu gewinnen und die Diagnostik der bovinen Paratuberkulose durch potenzielle neue Biomarker für den Nachweis von MAP-Infektionen bei Rindern zu verbessern. Zu diesem Zweck wurde das Serumproteom von MAP-infizierten Milchkühen im Vergleich zu zwei verschiedenen Kontrollgruppen charakterisiert. Die gesunden Kontrolltiere wurden in Milchkühe eines Paratuberkulose-freien Betriebs und Milchkühe desselben infizierten Betriebs, die sich trotz Exposition gegenüber MAP nicht infizierten, unterteilt. Mithilfe einer differentiellen Proteomanalyse mittels label-freier Tandem-Massenspektrometrie, gekoppelt an eine Flüssigkeitschromatographie, wurde ein hochauflösendes Serumproteom erstellt. Dabei wurden insgesamt 394 Proteine identifiziert. Die differentielle Analyse des Proteoms ergab signifikante Unterschiede in der Abundanz von 60 Proteinen im Serum von MAP-infizierten Kühen im Vergleich zu gesunden, nicht-infizierten Kühen aus demselben Betrieb und 90 Proteinen im Vergleich zu gesunden Kontrollkühen aus einem Paratuberkulose-freien Betrieb. Die Untersuchung der Proteomdaten auf eine Überrepräsentation von Signalwegen zeigte eine Anreicherung von Proteinen in Wegen, die stark mit dem Immunsystem assoziiert sind.

Eine Überrepräsentation von Proteinen, die mit der MHC-Klasse-II-Antigenpräsentation verbunden sind, wie MHC-Klasse-II und dem für ihre Regulierung verantwortlichen Protein Cathepsin S (CTSS), deutet auf einen alternativen Mechanismus der Antigenpräsentation während einer MAP-Infektion hin. Darüber hinaus wiesen die Proteine, das Cysteine-rich secretory protein 3 und

Cathepsin C, eine höhere Abundanz im Serum von MAP-infizierten Kühen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen auf. Beide Proteine sind mit der neutrophilen Degranulation assoziiert und zeigen eine Aktivierung der Effektorfunktionen von neutrophilen Granulozyten an, die offenbar nicht in der Lage sind, den Erreger zu eliminieren. Zusätzlich wies das Protein Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor eine höhere Abundanz im Serum von MAP-infizierten Kühen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen auf. Dieses Protein steht in Zusammenhang mit der Fc-gamma-Rezeptor (FCGR)-abhängigen Phagozytose. Eine Anreicherung von Proteinen in diesem Signalweg bei MAP-infizierten Kühen konnte jedoch nur im Vergleich zu den gesunden, nicht-infizierten Kühen des infizierten Betriebs festgestellt werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass Proteine, die an der FCGR-abhängigen Phagozytose beteiligt sind, mit einer Anfälligkeit für oder einer Resistenz gegenüber der bovinen Paratuberkulose assoziiert sind.

Die Charakterisierung des Serumproteoms von MAP-infizierten Kühen im Vergleich zu zwei verschiedenen gesunden Phänotypen deutet auf unterschiedliche Wirt-Pathogen-Interaktionen während einer MAP-Infektion hin. Zukünftige Studien sollten die vorgestellten Erkenntnisse und deren Zusammenhänge durch *in vitro* Ko-Inkubationen von bovinen peripheren Blutleukozyten mit MAP weiter untersuchen.

Zusätzlich zu den Einblicken in die Immunantwort von Rindern auf eine MAP-Infektion identifizierte diese Studie CTSS als potenziellen Biomarker für die bovine Paratuberkulose im Serum. Das durch die differentielle Proteomanalyse identifizierte CTSS wurde anschließend in einem Western Blot-Assay verifiziert und in einer größeren Kohorte analysiert, wobei CTSS als potenzieller Biomarker bestätigt werden konnte. Großangelegte Kohortenstudien und die Entwicklung praxistauglicher Nachweismethoden sind nun erforderlich, um die praktische Anwendbarkeit von CTSS als Biomarker für die bovine Paratuberkulose zu evaluieren.

6 SUMMARY

Bovine paratuberculosis is an incurable, infectious, chronic, granulomatous enteritis of cattle leading to significant economic losses. Since currently available detection methods only identify an infection with the underlying pathogen, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), to a certain extent and often yield false-positive results due to their limited sensitivity and specificity, targeted eradication is particularly challenging. Furthermore, effectively combating paratuberculosis remains difficult due to unexplained host-pathogen-interactions.

The aim of this study was therefore to provide new insights into host factors on the persistence of MAP-infection and to improve the diagnosis of bovine paratuberculosis by potential biomarkers for detecting MAP-infections in cattle. For this purpose, the serum proteome of MAP-infected dairy cows was characterized in comparison to two different control groups. The healthy control animals were divided into dairy cows from a paratuberculosis-free herd and dairy cows from the same infected herd that did not become infected despite exposure to MAP. A high-resolution serum proteome was generated using differential proteome analysis with label-free tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography, identifying a total of 394 proteins. Differential analysis of the proteome revealed significant differences in the abundance of 60 proteins in the serum of MAP-infected cows compared to healthy, uninfected cows from the same herd and 90 proteins compared to healthy control cows from a paratuberculosis-free herd. The examination of the proteomic data for an overrepresentation of signaling pathways showed an enrichment of proteins in pathways with strong association to the immune system.

An overrepresentation of proteins associated with MHC class II antigen presentation, such as MHC class II and the protein responsible for its regulation, Cathepsin S (CTSS), suggests an alternative mechanism of antigen presentation during MAP-infection. In addition, the proteins, cysteine-rich secretory protein 3 and Cathepsin C, showed a higher abundance in the serum of MAP-infected cows compared to both control groups. Both proteins are associated with neutrophil degranulation and indicate an activation of effector functions of neutrophil granulocytes, which are apparently not capable to eliminate the pathogen. Additionally, the protein Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor exhibited a

higher abundance in the serum of MAP-infected cows in comparison to both control groups. This protein is linked to Fc gamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis. However, an enrichment of proteins in this signaling pathway in MAP-infected cows could only be determined in comparison to the healthy, uninfected cows from the infected herd. This could indicate that proteins involved in FCGR dependent phagocytosis are associated with susceptibility or resistance to bovine paratuberculosis.

The characterization of the serum proteome of MAP-infected cows in comparison to two different healthy phenotypes indicates different host-pathogen interactions during MAP-infection. Future studies should further investigate the presented findings and their correlations by *in vitro* co-incubations of bovine peripheral blood leukocytes with MAP.

In addition to providing insights into the immune response of cattle to MAP-infection, this study identified CTSS as a potential biomarker for bovine paratuberculosis in serum. CTSS, which was identified by differential proteome analysis was subsequently verified by Western blotting and analyzed in a larger cohort, confirming its potential as a biomarker. Large-scale cohort studies and the development of practical detection methods are now required to assess the practical applicability of CTSS as a biomarker for bovine paratuberculosis.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Afdhal, N. H., A. Long, J. Lennon, J. Crowe and D. P. O'Donoghue (1991). "Controlled trial of antimycobacterial therapy in Crohn's disease. Clofazimine versus placebo." *Dig Dis Sci* 36(4): 449-453. <https://doi.org/10.1007/BF01298873>

Agrawal, G., T. J. Borody and J. M. Aitken (2024). "Mapping Crohn's Disease Pathogenesis with Mycobacterium paratuberculosis: A Hijacking by a Stealth Pathogen." *Dig Dis Sci* 69(7): 2289-2303. <https://doi.org/10.1007/s10620-024-08508-4>

Agrawal, G., H. Hamblin, A. Clancy and T. Borody (2020). "Anti-Mycobacterial Antibiotic Therapy Induces Remission in Active Paediatric Crohn's Disease." *Microorganisms* 8(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081112>

Ahmed, M., S. Thirunavukkarasu, B. A. Rosa, K. A. Thomas, S. Das, J. Rangel-Moreno, L. Lu, S. Mehra, S. K. Mbandi, L. B. Thackray, M. S. Diamond, K. M. Murphy, T. Means, J. Martin, D. Kaushal, T. J. Scriba, M. Mitreva and S. A. Khader (2020). "Immune correlates of tuberculosis disease and risk translate across species." *Sci Transl Med* 12(528). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay0233>

Alfituri, O. A., R. Blake, K. Jensen, N. A. Mabbott, J. Hope and J. M. Stevens (2024). "Differential role of M cells in enteroid infection by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and Salmonella enterica serovar Typhimurium." *Front Cell Infect Microbiol* 14: 1416537. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1416537>

Alonso-Hearn, M., G. Badia-Bringue and M. Canive (2022). "Genome-wide association studies for the identification of cattle susceptible and resilient to paratuberculosis." *Front Vet Sci* 9: 935133. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.935133>

Alonso-Hearn, M., A. Ballesteros, A. Navarro, G. Badia-Bringue and R. Casais (2023). "Lateral-flow assays for bovine paratuberculosis diagnosis." *Front Vet Sci* 10: 1257488. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1257488>

Alonso-Hearn, M., E. Molina, M. Geijo, P. Vazquez, I. Sevilla, J. M. Garrido and R. A. Juste (2009). "Isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from muscle tissue of naturally infected cattle." *Foodborne Pathog Dis* 6(4): 513-518. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0226>

Andrault, P. M., S. A. Samsonov, G. Weber, L. Coquet, K. Nazmi, J. G. Bolscher, A. C. Lalmanach, T. Jouenne, D. Bromme, M. T. Pisabarro, G. Lalmanach and F. Lecaille (2015). "Antimicrobial Peptide LL-37 Is Both a Substrate of Cathepsins S and K and a Selective Inhibitor of Cathepsin L." *Biochemistry* 54(17): 2785-2798. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00231>

Andrews, J. T., Z. Zhang, G. Prasad, F. Huey, E. V. Nazarova, J. Wang, A. Ranaraja, T. Weinkopff, L. X. Li, S. Mu, M. J. Birrer, S. C. Huang, N. Zhang, R. J. Arguello, J. A. Philips, J. T. Mattila and L. Huang (2024). "Metabolically active

neutrophils represent a permissive niche for Mycobacterium tuberculosis." *Mucosal Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.mucimm.2024.05.007>

Ansari, A., G. P. Singh, M. Singh and H. Singh (2024). "Identification of host immune-related biomarkers in active tuberculosis: A comprehensive analysis of differentially expressed genes." *Tuberculosis (Edinb)* 148: 102538. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2024.102538>

Arango-Sabogal, J. C., O. Labrecque, J. H. Fairbrother, S. Buczinski, J. P. Roy, J. Arsenault, V. Wellemans and G. Fecteau (2024). "Comparison of 2 PCR assays on environmental samples cultured for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis." *J Vet Diagn Invest* 36(1): 24-31. <https://doi.org/10.1177/10406387231203970>

Arango-Sabogal, J. C., J. Pare, O. Labrecque, G. Cote, J. P. Roy, S. Buczinski, V. Wellemans and G. Fecteau (2017). "Incidence of fecal excretion of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy cows before and after the enrolment in the Quebec voluntary program." *Prev Vet Med* 148: 94-105. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.10.006>

Asgari, N., E. A. Ghaemi, M. H. Naeimi, A. Tahamtan, L. A. Sechi and S. Zamani (2023). "Cross-reactivity between Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis 4027 peptide and Human IRF5 may contribute to Multiple Sclerosis in Iranian patients." *Heliyon* 9(11): e22137. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22137>

Asgari, N., E. A. Ghaemi, S. Tavasoli, M. Aghaei, H. Razavi Nikoo, L. A. Sechi and S. Zamani (2023). "Detection of Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis in the Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis by Using Serological and Molecular Techniques." *Curr Microbiol* 80(11): 359. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03477-9>

Badia-Bringue, G., M. Canive, P. Vazquez, J. M. Garrido, A. Fernandez, R. A. Juste, J. A. Jimenez, O. Gonzalez-Recio and M. Alonso-Hearn (2023). "Association between High Interferon-Gamma Production in Avian Tuberculin-Stimulated Blood from Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-Infected Cattle and Candidate Genes Implicated in Necroptosis." *Microorganisms* 11(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071817>

Baggerman, G., E. Vierstraete, A. De Loof and L. Schoofs (2005). "Gel-based versus gel-free proteomics: a review." *Comb Chem High Throughput Screen* 8(8): 669-677. <https://doi.org/10.2174/138620705774962490>

Bania, J., E. Gatti, H. Lelouard, A. David, F. Cappello, E. Weber, V. Camosseto and P. Pierre (2003). "Human cathepsin S, but not cathepsin L, degrades efficiently MHC class II-associated invariant chain in nonprofessional APCs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6664-6669. <https://doi.org/10.1073/pnas.1131604100>

Bannantine, J. P., G. Etienne, F. Laval, J. R. Stabel, A. Lemassu, M. Daffe, D. O. Bayles, C. Ganneau, F. Bonhomme, M. Branger, T. Cochard, S. Bay and F.

Biet (2017). "Cell wall peptidolipids of *Mycobacterium avium*: from genetic prediction to exact structure of a nonribosomal peptide." *Mol Microbiol* 105(4): 525-539. <https://doi.org/10.1111/mmi.13717>

Bastida, F. and R. A. Juste (2011). "Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination." *J Immune Based Ther Vaccines* 9: 8. <https://doi.org/10.1186/1476-8518-9-8>

Bates, A., R. Laven, R. O'Brien, S. Liggett and F. Griffin (2020). "Estimation of the sensitivity and specificity of four serum ELISA and one fecal PCR for diagnosis of paratuberculosis in adult dairy cattle in New Zealand using Bayesian latent class analysis." *Prev Vet Med* 185: 105199. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105199>

Batt, S. M., C. E. Burke, A. R. Moorey and G. S. Besra (2020). "Antibiotics and resistance: the two-sided coin of the mycobacterial cell wall." *Cell Surf* 6: 100044. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2020.100044>

Bay, S., D. Begg, C. Ganneau, M. Branger, T. Cochard, J. P. Bannantine, H. Kohler, J. L. Moyen, R. J. Whittington and F. Biet (2021). "Engineering Synthetic Lipopeptide Antigen for Specific Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Infection." *Front Vet Sci* 8: 637841. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.637841>

Bech-Nielsen, S., J. B. Jorgensen, P. Ahrens and N. C. Feld (1992). "Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows." *J Clin Microbiol* 30(3): 613-618. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.3.613-618.1992>

Begg, D. J., K. de Silva, N. Carter, K. M. Plain, A. Purdie and R. J. Whittington (2011). "Does a Th1 over Th2 dominance really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections?" *Immunobiology* 216(7): 840-846. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.12.004>

Begg, D. J., K. de Silva, L. Di Fiore, D. L. Taylor, K. Bower, L. Zhong, S. Kawaji, D. Emery and R. J. Whittington (2010). "Experimental infection model for Johne's disease using a lyophilised, pure culture, seedstock of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis." *Vet Microbiol* 141(3-4): 301-311. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.007>

Begg, D. J., K. M. Plain, K. de Silva, R. Gurung, A. Gunn, A. C. Purdie and R. J. Whittington (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. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.029>

Beinhauerova, M. and I. Slana (2023). "Utilisation of Actiphage in combination with IS900 qPCR as a diagnostic tool for rapid determination of paratuberculosis infection status in small ruminant herds." *J Vet Res* 67(3): 347-352. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2023-0041>

Bellei, E., S. Bergamini, E. Monari, L. I. Fantoni, A. Cuoghi, T. Ozben and A. Tomasi (2011). "High-abundance proteins depletion for serum proteomic analysis: concomitant removal of non-targeted proteins." *Amino Acids* 40(1): 145-156. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0628-x>

Bissonnette, N., J. P. Brousseau, S. Ollier, A. S. Byrne, E. M. Ibeagha-Awemu and K. Tahlan (2024). "Systematic assessment of the reliability of quantitative PCR assays targeting IS900 for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis presence in animal and environmental samples." *J Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24566>

BMEL (2021). "Meldepflichtige Tierkrankheiten." from <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tiergesundheit/tierseuchen/meldepflichtige-tierkrankheiten.html>. zuletzt aufgerufen am 23. Juli 2024

Bournazos, S., T. Wang Taia and V. Ravetch Jeffrey (2016). "The Role and Function of Fcγ Receptors on Myeloid Cells." *Microbiology Spectrum* 4(6): 10.1128/microbiolspec.mchd-0045-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mchd-0045-2016>

Brown, R., S. Nath, A. Lora, G. Samaha, Z. Elgamal, R. Kaiser, C. Taggart, S. Weldon and P. Geraghty (2020). "Cathepsin S: investigating an old player in lung disease pathogenesis, comorbidities, and potential therapeutics." *Respir Res* 21(1): 111. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01381-5>

Bruzek, S., M. Betensky, J. Di Paola, T. Diacovo, N. Goldenberg and V. Ignjatovic (2023). "What can the plasma proteome tell us about platelets and (vice versa)?" *Platelets* 34(1): 2186707. <https://doi.org/10.1080/09537104.2023.2186707>

Bryant, J. M., V. C. Thibault, D. G. Smith, J. McLuckie, I. Heron, I. A. Sevilla, F. Biet, S. R. Harris, D. J. Maskell, S. D. Bentley, J. Parkhill and K. Stevenson (2016). "Phylogenomic exploration of the relationships between strains of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis." *BMC Genomics* 17: 79. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2234-5>

Buddle, B. M., G. W. de Lisle, J. F. Griffin and S. A. Hutchings (2015). "Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir." *N Z Vet J* 63 Suppl 1(sup1): 19-27. <https://doi.org/10.1080/00480169.2014.929518>

Buergelt, C. D. and J. E. Williams (2004). "Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis." *Aust Vet J* 82(8): 497-503. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2004.tb11169.x>

Bull, T. J., E. J. McMinn, K. Sidi-Boumedine, A. Skull, D. Durkin, P. Neild, G. Rhodes, R. Pickup and J. Hermon-Taylor (2003). "Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fresh ileocolonic mucosal biopsy

specimens from individuals with and without Crohn's disease." *J Clin Microbiol* 41(7): 2915-2923. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2915-2923.2003>

Buzzao, D., M. Castresana-Aguirre, D. Guala and E. L. L. Sonnhammer (2024). "Benchmarking enrichment analysis methods with the disease pathway network." *Brief Bioinform* 25(2). <https://doi.org/10.1093/bib/bbae069>

Camanes, G., A. Joly, C. Fourichon, R. Ben Romdhane and P. Ezanno (2018). "Control measures to prevent the increase of paratuberculosis prevalence in dairy cattle herds: an individual-based modelling approach." *Vet Res* 49(1): 60. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0557-3>

Canive, M., O. Gonzalez-Recio, A. Fernandez, P. Vazquez, G. Badia-Bringue, J. L. Lavin, J. M. Garrido, R. A. Juste and M. Alonso-Hearn (2021). "Identification of loci associated with susceptibility to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in Holstein cattle using combinations of diagnostic tests and imputed whole-genome sequence data." *PLoS One* 16(8): e0256091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256091>

Cater, J. H., M. R. Wilson and A. R. Wyatt (2019). "Alpha-2-Macroglobulin, a Hypochlorite-Regulated Chaperone and Immune System Modulator." *Oxid Med Cell Longev* 2019: 5410657. <https://doi.org/10.1155/2019/5410657>

Cechova, M., M. Beinhauerova, V. Babak and P. Kralik (2022). "A viability assay combining palladium compound treatment with quantitative PCR to detect viable Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis cells." *Sci Rep* 12(1): 4769. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08634-x>

Cechova, M., M. Beinhauerova, V. Babak, I. Slana and P. Kralik (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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.748337>

Chaubey, K. K., R. D. Gupta, S. Gupta, S. V. Singh, A. K. Bhatia, S. Jayaraman, N. Kumar, A. Goel, A. S. Rathore, Sahzad, J. S. Sohal, B. J. Stephen, M. Singh, M. Goyal, K. Dhama and A. Derakhshandeh (2016). "Trends and advances in the diagnosis and control of paratuberculosis in domestic livestock." *Vet Q* 36(4): 203-227. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1196508>

Cheng, X. W., M. Kuzuya, K. Nakamura, Q. Di, Z. Liu, T. Sasaki, S. Kanda, H. Jin, G. P. Shi, T. Murohara, M. Yokota and A. Iguchi (2006). "Localization of cysteine protease, cathepsin S, to the surface of vascular smooth muscle cells by association with integrin α 5 β 3." *Am J Pathol* 168(2): 685-694. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050295>

Cheng, Z. J., Y. F. Wang, X. Y. Jiang, W. Y. Ren, S. F. Lei, F. Y. Deng and L. F. Wu (2024). "High sensitivity C-reactive protein and prediabetes progression and regression in middle-aged and older adults: A prospective cohort study." *J Diabetes Investig* 15(1): 78-86. <https://doi.org/10.1111/jdi.14090>

Chiodini, R. J., H. J. Van Kruiningen and R. S. Merkal (1984). "Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects." *Cornell Vet* 74(3): 218-262

Chiodini, R. J., H. J. Van Kruiningen, W. R. Thayer, R. S. Merkal and J. A. Coutu (1984). "Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease." *Dig Dis Sci* 29(12): 1073-1079. <https://doi.org/10.1007/BF01317078>

Choi, B. K., D. M. Hercules and A. I. Gusev (2001). "Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression." *J Chromatogr A* 907(1-2): 337-342. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)01052-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)01052-9)

Clark, D. L., Jr., J. J. Koziczowski, R. P. Radcliff, R. A. Carlson and J. L. Ellingson (2008). "Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction." *J Dairy Sci* 91(7): 2620-2627. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0902>

Clemens, D. L. and M. A. Horwitz (1995). "Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited." *Journal of Experimental Medicine* 181(1): 257-270. <https://doi.org/10.1084/jem.181.1.257>

Conde, C., M. Price-Carter, T. Cochard, M. Branger, K. Stevenson, R. Whittington, J. P. Bannantine and F. Biet (2021). "Whole-Genome Analysis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis IS900 Insertions Reveals Strain Type-Specific Modalities." *Front Microbiol* 12: 660002. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660002>

Corneli, S., A. Di Paolo, N. Vitale, M. Torricelli, L. Petrucci, C. Sebastiani, M. Ciullo, L. Curcio, M. Biagetti, P. Papa, S. Costarelli, M. Cagiola, A. Dondo and P. Mazzone (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. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.638890>

Coussens, P. M. (2001). "Mycobacterium paratuberculosis and the bovine immune system." *Anim Health Res Rev* 2(2): 141-161

Criado, M., V. Perez, N. Arteche-Villasol, N. Elguezabal, E. Molina, J. Benavides and D. Gutierrez-Exposito (2023). "Evaluation of the innate immune response of caprine neutrophils against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in vitro." *Vet Res* 54(1): 61. <https://doi.org/10.1186/s13567-023-01193-7>

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

Dallenga, T., U. Repnik, B. Corleis, J. Eich, R. Reimer, G. W. Griffiths and U. E. Schaible (2017). "M. tuberculosis-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages." *Cell Host Microbe* 22(4): 519-530 e513. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.09.003>

Dane, H., L. D. Stewart and I. R. Grant (2023). "Culture of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: challenges, limitations and future prospects." *J Appl Microbiol* 134(1). <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac017>

de Almeida, D. E., C. J. Colvin and P. M. Coussens (2008). "Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis." *Vet Immunol Immunopathol* 125(3-4): 234-245. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.05.019>

de Lisle, G. W., P. Seguin, B. S. Samagh, A. H. Corner and J. R. Duncan (1980). "Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests." *Can J Comp Med* 44(2): 177-182

Degroote, R. L., A. Schmalen, S. M. Hauck and C. A. Deeg (2023). "Unveiling Differential Responses of Granulocytes to Distinct Immunostimulants with Implications in Autoimmune Uveitis." *Biomedicines* 12(1). <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010019>

Delemarre, E. M., L. van Hoorn, A. W. J. Bossink, J. Drylewicz, S. A. Joosten, T. H. M. Ottenhoff, O. W. Akkerman, D. Goletti, E. Petruccioli, A. Navarra, B. T. A. van den Broek, S. P. A. Paardekooper, I. van Haeften, L. Koenderman, J. J. Lammers, S. F. T. Thijsen, R. W. Hofland and S. Nierkens (2021). "Serum Biomarker Profile Including CCL1, CXCL10, VEGF, and Adenosine Deaminase Activity Distinguishes Active From Remotely Acquired Latent Tuberculosis." *Front Immunol* 12: 725447. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.725447>

Dietzel, E., J. Wessling, J. Floehr, C. Schafer, S. Ensslen, B. Denecke, B. Rosing, J. Neulen, T. Veitinger, M. Spehr, T. Tropartz, R. Tolba, T. Renne, A. Egert, H. Schorle, Y. Gottenbusch, A. Hildebrand, I. Yiallourous, W. Stocker, R. Weiskirchen and W. Jahnen-Dechent (2013). "Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization." *Dev Cell* 25(1): 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.03.001>

Diez-Martin, E., L. Hernandez-Suarez, C. Munoz-Villafranca, L. Martin-Souto, E. Astigarraga, A. Ramirez-Garcia and G. Barreda-Gomez (2024). "Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Analysis of Molecular Bases, Predictive Biomarkers, Diagnostic Methods, and Therapeutic Options." *Int J Mol Sci* 25(13). <https://doi.org/10.3390/ijms25137062>

Donat, K., E. Einax and A. Klassen (2022). "Evaluation of the Thuringian Bovine Johne's Disease Control Program-A Case Study." *Animals (Basel)* 12(4). <https://doi.org/10.3390/ani12040493>

Donat, K., E. Einax, D. Rath and A. Klassen (2024). "Successful Control of Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis Infection in a Dairy Herd within

a Decade-A Case Study." *Animals (Basel)* 14(6).
<https://doi.org/10.3390/ani14060984>

Donat, K., G. Erhardt, A. Soschinka and H. R. Brandt (2014). "Decreased serum protein associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis shedding in German Holstein cows." *Vet Rec* 174(16): 408.
<https://doi.org/10.1136/vr.101957>

Donat, K., M. Schmidt, H. Köhler and C. Sauter-Louis (2016). "Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds." *Journal of Dairy Science* 99(5): 3744-3752.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2015-10625>

Dow, C. T. and B. L. Alvarez (2022). "Mycobacterium paratuberculosis zoonosis is a One Health emergency." *EcoHealth* 19(2): 164-174.
<https://doi.org/10.1007/s10393-022-01602-x>

Dudemaine, P. L., G. Fecteau, M. Lessard, O. Labrecque, J. P. Roy and N. Bissonnette (2014). "Increased blood-circulating interferon-gamma, interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis." *J Dairy Sci* 97(6): 3382-3393.
<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7059>

Dulberger, C. L., E. J. Rubin and C. C. Boutte (2020). "The mycobacterial cell envelope - a moving target." *Nat Rev Microbiol* 18(1): 47-59.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7>

Duong, V. A. and H. Lee (2023). "Bottom-Up Proteomics: Advancements in Sample Preparation." *Int J Mol Sci* 24(6). <https://doi.org/10.3390/ijms24065350>

Eichelberger, K. R. and W. E. Goldman (2020). "Manipulating neutrophil degranulation as a bacterial virulence strategy." *PLoS Pathog* 16(12): e1009054.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009054>

Eisenberg, S. W. F., R. Chuchaisangrat, M. Nielen and P. Koets Ad (2013). "Relationship between Presence of Cows with Milk Positive for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-Specific Antibody by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Viable *M. avium* subsp. paratuberculosis in Dust in Cattle Barns." *Applied and Environmental Microbiology* 79(18): 5458-5464.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01187-13>

Ekundayo, T. C., A. O. Falade, B. E. Igere, C. D. Iwu, M. A. Adewoyin, T. A. Olasehinde and O. A. Ijabadeniyi (2022). "Systematic and meta-analysis of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis related type 1 and type 2 diabetes mellitus." *Sci Rep* 12(1): 4608. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08700-4>

Elguezabal, N., F. Bastida, I. A. Sevilla, N. Gonzalez, E. Molina, J. M. Garrido and R. A. Juste (2011). "Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis growth parameters: strain characterization and comparison of methods." *Appl Environ Microbiol* 77(24): 8615-8624.
<https://doi.org/10.1128/AEM.05818-11>

Englisz, A., M. Smycz-Kubanska and A. Mielczarek-Palacz (2024). "Sensitivity and Specificity of Selected Biomarkers and Their Combinations in the Diagnosis of Ovarian Cancer." *Diagnostics (Basel)* 14(9). <https://doi.org/10.3390/diagnostics14090949>

Englund, S., G. Bolske and K. E. Johansson (2002). "An IS900-like sequence found in a Mycobacterium sp. other than Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis." *FEMS Microbiol Lett* 209(2): 267-271. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11142.x>

Eppleston, J., D. J. Begg, N. K. Dhand, B. Watt and R. J. Whittington (2014). "Environmental survival of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in different climatic zones of eastern Australia." *Appl Environ Microbiol* 80(8): 2337-2342. <https://doi.org/10.1128/AEM.03630-13>

Espejo, L. A., F. J. Zagmutt, H. Groenendaal, C. Munoz-Zanzi and S. J. Wells (2015). "Evaluation of performance of bacterial culture of feces and serum ELISA across stages of Johne's disease in cattle using a Bayesian latent class model." *J Dairy Sci* 98(11): 8227-8239. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8440>

Estevinho, M. M., J. Cabeda, M. Santiago, E. Machado, R. Silva, M. Duro, I. Pita, R. Morais, G. Macedo, T. J. Bull, F. Magro and A. Sarmiento (2023). "Viable Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Colonizes Peripheral Blood of Inflammatory Bowel Disease Patients." *Microorganisms* 11(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061520>

Fan, Q., X. Wang, H. Zhang, C. Li, J. Fan and J. Xu (2012). "Silencing cathepsin S gene expression inhibits growth, invasion and angiogenesis of human hepatocellular carcinoma in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* 425(4): 703-710. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.013>

Fechner, K., N. Dreyman, S. Schimkowiak, C. P. Czerny and J. Teitzel (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. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16590>

Fecteau, M. E. (2018). "Paratuberculosis in Cattle." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 34(1): 209-222. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.011>

Field, N. L., C. G. McAloon, L. Gavey and J. F. Mee (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. <https://doi.org/10.1186/s13620-022-00217-6>

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

Filio-Rodriguez, G., I. Estrada-Garcia, P. Arce-Paredes, M. M. Moreno-Altamirano, S. Islas-Trujillo, M. D. Ponce-Regalado and O. Rojas-Espinosa (2017). "In vivo induction of neutrophil extracellular traps by *Mycobacterium tuberculosis* in a guinea pig model." *Innate Immun* 23(7): 625-637. <https://doi.org/10.1177/1753425917732406>

Fox, N. J., G. L. Caldow, H. Liebeschuetz, K. Stevenson and M. R. Hutchings (2018). "Counterintuitive increase in observed *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis prevalence in sympatric rabbits following the introduction of paratuberculosis control measures in cattle." *Vet Rec* 182(22): 634. <https://doi.org/10.1136/vr.104638>

Frorup, C., M. H. Jensen, M. Haupt-Jorgensen, K. Buschard, J. Storling, F. Pociot and T. Floyel (2024). "Elevated Cathepsin S Serum Levels in New-Onset Type 1 Diabetes and Autoantibody-Positive Siblings." *Diabetes* 73(8): 1278-1284. <https://doi.org/10.2337/db23-0911>

Galon, J., P. Paulet, A. Galinha, P. Lores, C. Bonnerot, J. Jami, W. H. Fridman and C. Sautes (1997). "Soluble Fc gamma receptors: interaction with ligands and biological consequences." *Int Rev Immunol* 16(1-2): 87-111. <https://doi.org/10.3109/08830189709045704>

Gao, X., X. Guo, M. Li, H. Jia, W. Lin, L. Fang, Y. Jiang, H. Zhu, Z. Zhang, J. Ding and T. Xin (2019). "Interleukin 8 and Pentaxin (C-Reactive Protein) as Potential New Biomarkers of Bovine Tuberculosis." *J Clin Microbiol* 57(10). <https://doi.org/10.1128/JCM.00274-19>

Garcia, A. A., K. M. Plain, P. C. Thomson, A. J. Thomas, C. J. Davies, J. Toribio and R. J. Whittington (2023). "Association between major histocompatibility complex haplotypes and susceptibility of unvaccinated and vaccinated cattle to paratuberculosis." *Vet Immunol Immunopathol* 265: 110677. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2023.110677>

Garcia, A. B. and L. Shalloo (2015). "Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle." *J Dairy Sci* 98(8): 5019-5039. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9241>

Garvey, M. (2020). "Mycobacterium Avium Paratuberculosis: A Disease Burden on the Dairy Industry." *Animals (Basel)* 10(10). <https://doi.org/10.3390/ani10101773>

Gasteiner, J., H. Wenzl, K. Fuchs, U. Jark and W. Baumgartner (1999). "Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria." *Zentralbl Veterinarmed B* 46(7): 457-466. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.1999.00256.x>

Gerrard, Z. E., B. M. C. Swift, G. Botsaris, R. S. Davidson, M. R. Hutchings, J. N. Huxley and C. E. D. Rees (2018). "Survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in retail pasteurised milk." *Food Microbiol* 74: 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.004>

Geyer, P. E., L. M. Holdt, D. Teupser and M. Mann (2017). "Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics." *Mol Syst Biol* 13(9): 942. <https://doi.org/10.15252/msb.20156297>

Ghaffari, M. H., J. B. Daniel, H. Sadri, S. Schuchardt, J. Martin-Tereso and H. Sauerwein (2024). "Longitudinal characterization of the metabolome of dairy cows transitioning from one lactation to the next: Investigations in blood serum." *J Dairy Sci* 107(2): 1263-1285. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23841>

Ghanadi, K., S. Ashorzadeh, A. Aliyepoor and K. Anbari (2022). "Evaluation of serum levels of cathepsin S among colorectal cancer patients." *Ann Med Surg (Lond)* 78: 103831. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.103831>

Gonzalez-Ruiz, S., M. G. Strillacci, M. Duran-Aguilar, G. J. Canto-Alarcon, S. E. Herrera-Rodriguez, A. Bagnato, L. F. Guzman, F. Milian-Suazo and S. I. Roman-Ponce (2019). "Genome-Wide Association Study in Mexican Holstein Cattle Reveals Novel Quantitative Trait Loci Regions and Confirms Mapped Loci for Resistance to Bovine Tuberculosis." *Animals (Basel)* 9(9). <https://doi.org/10.3390/ani9090636>

Gossner, A., C. Watkins, F. Chianini and J. Hopkins (2017). "Pathways and Genes Associated with Immune Dysfunction in Sheep Paratuberculosis." *Sci Rep* 7: 46695. <https://doi.org/10.1038/srep46695>

Graham, D. Y., S. A. Naser, E. Offman, N. Kassir, R. Hardi, T. Welton, G. Ryzewska, B. Stepien, T. Arlukowicz, A. Wos, C. Fehrmann, P. Anderson, A. Bibliowicz, P. McLean, R. Fathi, M. S. Harris and I. N. Kalfus (2019). "643 RHB-104, a Fixed-Dose, Oral Antibiotic Combination Against Mycobacterium Avium Paratuberculosis (MAP) Infection, Is Effective in Moderately to Severely Active Crohn's Disease." *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG* 114: S376-S377. <https://doi.org/10.14309/01.ajg.0000592108.53051.68>

Granger, J., J. Siddiqui, S. Copeland and D. Remick (2005). "Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines." *PROTEOMICS* 5(18): 4713-4718. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401331>

Grankvist, K., R. Gomez, M. Nybo, G. Lima-Oliveira and A. von Meyer (2019). "Preanalytical aspects on short- and long-term storage of serum and plasma." *Diagnosis (Berl)* 6(1): 51-56. <https://doi.org/10.1515/dx-2018-0037>

Griss, S., T. Knific, A. Buzzell, L. P. Carmo, G. Schupbach-Regula, M. Meylan, M. Ocepek and B. Thomann (2024). "A scoping review on associations between paratuberculosis and productivity in cattle." *Front Vet Sci* 11: 1352623. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1352623>

Gupta, S., S. V. Singh, M. Singh, K. K. Chaubey, K. Karthik, A. K. Bhatia, N. Kumar and K. Dhama (2019). "Vaccine approaches for the 'therapeutic management' of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in domestic livestock." *Vet Q* 39(1): 143-152. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1667042>

Gupta, S. K., T. Wilson, P. H. Maclean, B. H. A. Rehm, A. Heiser, B. M. Buddle and D. N. Wedlock (2022). "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis antigens induce cellular immune responses in cattle without causing reactivity to tuberculin in the tuberculosis skin test." *Front Immunol* 13: 1087015. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1087015>

Haghkhah, M., Z. Hemati, A. Derakhshandeh, F. Namazi, K. K. Chaubey and S. V. Singh (2023). "Immuno-reactivity evaluation of Mce-truncated subunit candidate vaccine against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis challenge in the goat models." *BMC Vet Res* 19(1): 157. <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03715-Z>

Halvey, P., V. Farutin, L. Koppes, N. S. Gunay, D. A. Pappas, A. M. Manning and I. Capila (2021). "Variable blood processing procedures contribute to plasma proteomic variability." *Clin Proteomics* 18(1): 5. <https://doi.org/10.1186/s12014-021-09311-3>

Hands, C. M., R. L. Sayers, C. Nitride, L. A. Gethings and E. N. C. Mills (2020). "A multiple reaction monitoring method for determining peanut (*Arachis hypogea*) allergens in serum using quadrupole and time-of-flight mass spectrometry." *Anal Bioanal Chem* 412(12): 2815-2827. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02508-9>

Harris, N. B. and R. G. Barletta (2001). "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine." *Clin Microbiol Rev* 14(3): 489-512. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.489-512.2001>

Hernandez-Reyes, A. L., G. Chavez-Gris, E. Maldonado-Castro, L. E. Alcaraz-Sosa and M. T. Diaz-Negrete (2022). "First identification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in wild ruminants in a zoo in Mexico." *Vet World* 15(3): 655-661. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.655-661>

Herthnek, D. and G. Bolske (2006). "New PCR systems to confirm real-time PCR detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis." *BMC Microbiol* 6: 87. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-87>

Hill, A. B. (1965). "The Environment and Disease: Association or Causation?" *Proc R Soc Med* 58(5): 295-300

Hodgeman, R., R. Mann, N. Djitro, K. Savin, S. Rochfort and B. Rodoni (2023). "The pan-genome of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Map) confirms ancestral lineage and reveals gene rearrangements within Map Type S." *BMC Genomics* 24(1): 656. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09752-0>

Hostetter, J., E. Steadham, J. Haynes, T. Bailey and N. Cheville (2003). "Phagosomal maturation and intracellular survival of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in J774 cells." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 26(4): 269-283. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(02\)00070-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0147-9571(02)00070-X)

Hu, E., T. Yang, L. Cai, J. Ouyang, F. Wang, Z. Li, Y. Wang, X. Xing and X. Liu (2024). "Proteomic Analysis Identifies GSN as a Noninvasive Circulating Serum Biomarker for Predicting Early Recurrence of Hepatocellular Carcinoma." *J Proteome Res* 23(3): 1062-1074. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.3c00813>

Huang, J., X. Chen, X. Fu, Z. Li, Y. Huang and C. Liang (2021). "Advances in Aptamer-Based Biomarker Discovery." *Front Cell Dev Biol* 9: 659760. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.659760>

Imada, J. B., S. M. Roche, A. Thaivalappil, C. A. Bauman and D. F. Kelton (2023). "Investigating Ontario dairy farmers motivations and barriers to the adoption of biosecurity and Johne's control practices." *Journal of Dairy Science* 106(4): 2449-2460. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2022-22528>

Jahanban-Esfahlan, A. and R. Amarowicz (2024). "Molecularly imprinted polymers for sensing/depleting human serum albumin (HSA): A critical review of recent advances and current challenges." *Int J Biol Macromol* 266(Pt 1): 131132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131132>

Jain, M., A. K. Singh, M. Singh, S. Gupta, A. Kumar, G. K. Aseri, R. Polavarapu, D. Sharma and J. S. Sohal (2020). "Comparative evaluation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) recombinant secretory proteins as DTH marker for paratuberculosis." *J Microbiol Methods* 175: 105987. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105987>

Jambunathan, K. and A. K. Galande (2014). "Sample collection in clinical proteomics--proteolytic activity profile of serum and plasma." *Proteomics Clin Appl* 8(5-6): 299-307. <https://doi.org/10.1002/prca.201300037>

Jenum, S., R. Bakken, S. Dhanasekaran, A. Mukherjee, R. Lodha, S. Singh, V. Singh, M. C. Haks, T. H. Ottenhoff, S. K. Kabra, T. M. Doherty, C. Ritz and H. M. Grewal (2016). "BLR1 and FCGR1A transcripts in peripheral blood associate with the extent of intrathoracic tuberculosis in children and predict treatment outcome." *Sci Rep* 6: 38841. <https://doi.org/10.1038/srep38841>

Johne, H. A. and L. Frothingham (1895). "Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind." *Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin* 21: 438-453

Johnson, P., L. McLeod, J. Campbell, M. Rousseau, K. Larson and C. Waldner (2022). "Estimating the sensitivity and specificity of serum ELISA and pooled and individual fecal PCR for detecting Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Canadian cow-calf herds using Bayesian latent class models." *Front Vet Sci* 9: 937141. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.937141>

Jones, P. H., T. B. Farver, B. Beaman, B. Cetinkaya and K. L. Morgan (2006). "Crohn's disease in people exposed to clinical cases of bovine paratuberculosis." *Epidemiol Infect* 134(1): 49-56. <https://doi.org/10.1017/S0950268805004681>

Jungersen, G., A. Huda, J. J. Hansen and P. Lind (2002). "Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle." *Clin Diagn Lab Immunol* 9(2): 453-460. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.2.453-460.2002>

Jungersen, G., H. Mikkelsen and S. N. Grell (2012). "Use of the johnin PPD interferon-gamma assay in control of bovine paratuberculosis." *Vet Immunol Immunopathol* 148(1-2): 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.05.010>

Jurado-Martos, F., F. Cardoso-Toset, C. Tarradas, A. Galan-Relano, J. M. Sanchez-Carvajal, I. Ruedas-Torres, E. Vera, F. Larenas-Munoz, L. Gomez-Gascon, I. M. Rodriguez-Gomez, L. Carrasco, J. Gomez-Laguna, B. H. Lorenzo and I. Luque (2023). "Diagnostic performance of faecal and tissue multiplex qPCR IS900/F57 for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle." *Res Vet Sci* 161: 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.06.007>

Jurkovich, V., B. Bogнар, K. Balogh, M. Kovacs-Weber, K. Fornoyos, R. T. Szabo, P. Kovacs, L. Konyves and M. Mezes (2016). "Effects of subclinical *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infection on some physiological parameters, health status and production in dairy cows." *Acta Vet Hung* 64(3): 301-312. <https://doi.org/10.1556/004.2016.029>

Juste, R. A., M. Alonso-Hearn, E. Molina, M. Geijo, P. Vazquez, I. A. Sevilla and J. M. Garrido (2009). "Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial." *BMC Res Notes* 2: 233. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-233>

Juste, R. A., P. Vazquez, O. Ruiz-Larranaga, M. Iriondo, C. Manzano, M. Agirre, A. Estonba, M. V. Geijo, E. Molina, I. A. Sevilla, M. Alonso-Hearn, N. Gomez, V. Perez, A. Cortes and J. M. Garrido (2018). "Association between combinations of genetic polymorphisms and epidemiopathogenic forms of bovine paratuberculosis." *Heliyon* 4(2): e00535. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00535>

Kalis, C. H., M. T. Collins, J. W. Hesselink and H. W. Barkema (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. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.07.003>

Karolczak, K. and C. Watala (2021). "Blood Platelets as an Important but Underrated Circulating Source of TGFbeta." *Int J Mol Sci* 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094492>

Khare, S., J. S. Nunes, J. F. Figueiredo, S. D. Lawhon, C. A. Rossetti, T. Gull, A. C. Rice-Ficht and L. G. Adams (2009). "Early phase morphological lesions and transcriptional responses of bovine ileum infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis." *Vet Pathol* 46(4): 717-728. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0187-G-FL>

Kirkpatrick, B. W. and G. E. Shook (2011). "Genetic susceptibility to paratuberculosis." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 27(3): 559-571, vi. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.003>

Kirschke, H., B. Wiederanders, D. Bromme and A. Rinne (1989). "Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins." *Biochem J* 264(2): 467-473. <https://doi.org/10.1042/bj2640467>

Klopfstein, M., A. Leyer, B. Berchtold, P. R. Torgerson and M. Meylan (2021). "Limitations in the implementation of control measures for bovine paratuberculosis in infected Swiss dairy and beef herds." *PLoS One* 16(2): e0245836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245836>

Knific, T., M. Ocepek, A. Kirbis, B. Krt, J. Prezelj and J. M. Gethmann (2022). "Quantitative Risk Assessment of Exposure to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) via Different Types of Milk for the Slovenian Consumer." *Foods* 11(10). <https://doi.org/10.3390/foods11101472>

Koch, R. (1882). "Die Ätiologie der Tuberkulose." *Berliner klinische Wochenschrift* Nr. 15: 428-445

Koets, A. P., S. Eda and S. Sreevatsan (2015). "The within host dynamics of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection in cattle: where time and place matter." *Vet Res* 46(1): 61. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0185-0>

Kontsevaya, I., A. M. Cabibbe, D. M. Cirillo, A. R. DiNardo, N. Frahm, S. H. Gillespie, D. Holtzman, L. Meiwes, E. Petruccioli, M. Reimann, M. Ruhwald, W. Sabiiti, F. Saluzzo, E. Tagliani and D. Goletti (2024). "Update on the diagnosis of tuberculosis." *Clin Microbiol Infect* 30(9): 1115-1122. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.07.014>

Korbonits, L., K. J. H. Kleinwort, B. Amann, A. Didier, E. Martlbauer, S. M. Hauck and C. A. Deeg (2022). "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Infected Cows Reveal Divergent Immune Response in Bovine Peripheral Blood Derived Lymphocyte Proteome." *Metabolites* 12(10). <https://doi.org/10.3390/metabo12100924>

Kraut, A., M. Louwagie, C. Bruley, C. Masselon, Y. Coute, V. Brun and A. M. Hesse (2019). "Protein Biomarker Discovery in Non-depleted Serum by Spectral Library-Based Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry." *Methods Mol Biol* 1959: 129-150. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9164-8_9

Kravitz, A., K. Pelzer and N. Sriranganathan (2021). "The Paratuberculosis Paradigm Examined: A Review of Host Genetic Resistance and Innate Immune Fitness in Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis Infection." *Front Vet Sci* 8: 721706. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.721706>

Krieger, M., S. Eisenberg, K. Donat and A. Campe (2023). "High-Impact Risk Factors for Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in Dairy Herds in Germany." *Animals (Basel)* 13(12). <https://doi.org/10.3390/ani13121889>

Kudahl, A. B. and S. S. Nielsen (2009). "Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows." *J Dairy Sci* 92(9): 4340-4346. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2039>

Kudahl, A. B., S. S. Nielsen and S. Ostergaard (2008). "Economy, efficacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis." *J Dairy Sci* 91(12): 4599-4609. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1257>

Kuehnel, M. P., R. Goethe, A. Habermann, E. Mueller, M. Rohde, G. Griffiths and P. Valentin-Weigand (2001). "Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria." *Cell Microbiol* 3(8): 551-566. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00139.x>

Küpper, J., H. Brandt, K. Donat and G. Erhardt (2012). "Heritability estimates for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis status of German Holstein cows tested by fecal culture." *J Dairy Sci* 95(5): 2734-2739. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4994>

Ladero-Aunon, I., E. Molina, A. Holder, J. Kolakowski, H. Harris, A. Urkitza, J. Anguita, D. Werling and N. Elguezal (2021). "Bovine Neutrophils Release Extracellular Traps and Cooperate With Macrophages in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis clearance In Vitro." *Front Immunol* 12: 645304. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645304>

Lambrecht, R. S. and M. T. Collins (1992). "Mycobacterium paratuberculosis. Factors that influence mycobactin dependence." *Diagn Microbiol Infect Dis* 15(3): 239-246. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(92\)90119-e](https://doi.org/10.1016/0732-8893(92)90119-e)

Lan, J., A. Nunez Galindo, J. Doecke, C. Fowler, R. N. Martins, S. R. Rainey-Smith, O. Cominetti and L. Dayon (2018). "Systematic Evaluation of the Use of Human Plasma and Serum for Mass-Spectrometry-Based Shotgun Proteomics." *J Proteome Res* 17(4): 1426-1435. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00788>

Lee, H. W., Y. J. Jeon, Y. I. Cho, S. Ha and S. Kang (2024). "Age-dependent changes in serum chemistry, mineral concentrations and complete blood cell count parameters in Holstein cattle." *Acta Vet Hung* 71(3-4): 159-173. <https://doi.org/10.1556/004.2023.00925>

Lee, P. Y., J. Osman, T. Y. Low and R. Jamal (2019). "Plasma/serum proteomics: depletion strategies for reducing high-abundance proteins for biomarker discovery." *Bioanalysis* 11(19): 1799-1812. <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0145>

Linder, M. I., Y. Mizoguchi, S. Hesse, G. Csaba, M. Tatematsu, M. Lyszkiewicz, N. Zietara, T. Jeske, M. Hastreiter, M. Rohlf, Y. Liu, P. Grabowski, K. Ahomaa, D. Maier-Begandt, M. Schwestka, V. Pazhakh, A. I. Isiaku, B. Briones Miranda, P. Blombery, M. K. Saito, E. Rusha, Z. Alizadeh, Z. Pourpak, M. Kobayashi, N. Rezaei, E. Unal, F. Hauck, M. Drukker, B. Walzog, J. Rappsilber, R. Zimmer, G. J. Lieschke and C. Klein (2023). "Human genetic defects in SRP19 and SRPRA

cause severe congenital neutropenia with distinctive proteome changes." *Blood* 141(6): 645-658. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016783>

Lisuzzo, A., L. Laghi, E. Fiore, A. Cecchinato, V. Bisutti, S. Pegolo, D. Giannuzzi, R. Tessari, A. Barberio, E. Schiavon, E. Mazzotta, C. Tommasoni and M. Giancesella (2024). "Serum metabolome differences associated with subclinical intramammary infection caused by *Streptococcus agalactiae* and *Prototheca* spp. in multiparous dairy cows." *J Dairy Sci* 107(3): 1656-1668. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23851>

Liu, W. L., D. Liu, K. Cheng, Y. J. Liu, S. Xing, P. D. Chi, X. H. Liu, N. Xue, Y. Z. Lai, L. Guo and G. Zhang (2016). "Evaluating the diagnostic and prognostic value of circulating cathepsin S in gastric cancer." *Oncotarget* 7(19): 28124-28138. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8582>

Lodge, K. M., A. S. Cowburn, W. Li and A. M. Condliffe (2020). "The Impact of Hypoxia on Neutrophil Degranulation and Consequences for the Host." *Int J Mol Sci* 21(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041183>

Loeffler, F. (1884). "Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe." *Mitteilungen aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte, Berlin, Germany* Bd. 2: 421-499

Loefering, D. J. and M. R. Lennartz (2002). "Differential effect of Fc gamma receptor ligation on LPS-stimulated TNF-alpha secretion by hepatic, splenic, and peritoneal macrophages." *Inflammation* 26(6): 305-310. <https://doi.org/10.1023/a:1021468819285>

Lopes-Luz, L., D. P. Saavedra, M. B. T. Fogaca, S. Buhner-Sekula and M. M. A. Stefani (2023). "Challenges and advances in serological and molecular tests to aid leprosy diagnosis." *Exp Biol Med (Maywood)* 248(22): 2083-2094. <https://doi.org/10.1177/15353702231209422>

Lorencova, A., V. Babak, A. Kralova and G. Borilova (2019). "Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw fermented sausages during production and storage." *Meat Sci* 155: 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.04.023>

Lowe, A. M., C. P. Yansouni and M. A. Behr (2008). "Causality and gastrointestinal infections: Koch, Hill, and Crohn's." *Lancet Infect Dis* 8(11): 720-726. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70257-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70257-3)

Lu, W., S. Wang, R. Liu, Y. Guan and Y. Zhang (2021). "Human serum albumin-imprinted polymers with high capacity and selectivity for abundant protein depletion." *Acta Biomater* 126: 249-258. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.03.010>

Luke, T. D. W., J. M. Morton, W. J. Wales and C. K. M. Ho (2024). "Associations between serum health biomarker concentrations and reproductive performance,

accounting for milk yield, in pasture-based Holstein cows in southeastern Australia." *J Dairy Sci* 107(1): 438-458. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23006>

Ma, H., Y. Chen, M. Yu, X. Chen, L. Qi, S. Wei, Q. Fan, Q. Xu, M. Zhan and Z. Sha (2021). "Immune role of the complement component 6 gene and its associated novel miRNA, miR-727, in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)." *Dev Comp Immunol* 123: 104156. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104156>

Magombedze, G., S. Eda and A. Koets (2016). "Can Immune Response Mechanisms Explain the Fecal Shedding Patterns of Cattle Infected with *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis?" *PLoS One* 11(1): e0146844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146844>

Magombedze, G., T. Shiri, S. Eda and J. R. Stabel (2017). "Inferring biomarkers for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection and disease progression in cattle using experimental data." *Sci Rep* 7: 44765. <https://doi.org/10.1038/srep44765>

Mallikarjunappa, S., M. Adnane, P. Cormican, N. A. Karrow and K. G. Meade (2019). "Characterization of the bovine salivary gland transcriptome associated with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis experimental challenge." *BMC Genomics* 20(1): 491. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5845-4>

Manning, E. J. and M. T. Collins (2001). "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis." *Rev Sci Tech* 20(1): 133-150. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1275>

Marco-Ramell, A. and A. Bassols (2010). "Enrichment of low-abundance proteins from bovine and porcine serum samples for proteomic studies." *Res Vet Sci* 89(3): 340-343. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.03.019>

Martucciello, A., G. Galletti, A. Pesce, M. Russo, E. Sannino, N. Arrigoni, M. Ricchi, M. Tamba, R. Brunetti, M. Ottaiano, G. Iovane and E. De Carlo (2021). "Short communication: Seroprevalence of paratuberculosis in Italian water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the region of Campania." *J Dairy Sci* 104(5): 6194-6199. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19022>

Mauric Maljkovic, M., I. Vlahek, A. Piplica, A. Ekert Kabalin, V. Susic and V. Stevanovic (2023). "Prospects of toll-like receptors in dairy cattle breeding." *Anim Genet* 54(4): 425-434. <https://doi.org/10.1111/age.13325>

Mazzone, P., S. Corneli, A. Di Paolo, C. Maresca, A. Felici, M. Biagetti, M. Ciullo, C. Sebastiani, G. Pezzotti, S. Leo, M. Ricchi and N. Arrigoni (2018). "Survival of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the intermediate and final digestion products of biogas plants." *J Appl Microbiol* 125(1): 36-44. <https://doi.org/10.1111/jam.13762>

McAloon, C. G., S. Roche, C. Ritter, H. W. Barkema, P. Whyte, S. J. More, L. O'Grady, M. J. Green and M. L. Doherty (2019). "A review of paratuberculosis in

dairy herds - Part 1: Epidemiology." *Vet J* 246: 59-65.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.010>

McAloon, C. G., S. Roche, C. Ritter, H. W. Barkema, P. Whyte, S. J. More, L. O'Grady, M. J. Green and M. L. Doherty (2019). "A review of paratuberculosis in dairy herds - Part 2: On-farm control." *Vet J* 246: 54-58.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.009>

McQueen, C. F. and J. T. Groves (2022). "Toxicity of the iron siderophore mycobactin J in mouse macrophages: Evidence for a hypoxia response." *J Inorg Biochem* 227: 111669. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111669>

Mearelli, F., G. Barbati, C. Moras, C. Ronco, G. Biolo and G. on the behalf of the Need Speed (2021). "Soluble FcγRIIA expressed on monocytes (sCD64): A new serum biomarker of acute kidney injury in patients with suspected infection at emergency department admission." *Cytokine* 148: 155661.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155661>

Meex, R. C., A. J. Hoy, A. Morris, R. D. Brown, J. C. Lo, M. Burke, R. J. Goode, B. A. Kingwell, M. J. Kraakman, M. A. Febbraio, J. W. Greve, S. S. Rensen, M. P. Molloy, G. I. Lancaster, C. R. Bruce and M. J. Watt (2015). "Fetuin B Is a Secreted Hepatocyte Factor Linking Steatosis to Impaired Glucose Metabolism." *Cell Metab* 22(6): 1078-1089. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.023>

Mintz, M. J. and D. J. Lukin (2023). "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) and Crohn's disease: the debate continues." *Transl Gastroenterol Hepatol* 8: 28. <https://doi.org/10.21037/tgh-23-16>

Moghadam, M., E. A. Ghaemi, H. Akbari, H. Razavi Nikoo and S. Zamani (2022). "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and Hashimoto's thyroiditis: Is MAP the trigger?" *Front Cell Infect Microbiol* 12: 972929.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.972929>

Momotani, E., D. L. Whipple, A. B. Thiermann and N. F. Cheville (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.
<https://doi.org/10.1177/030098588802500205>

Mun, D. G., F. A. Bhat, N. Joshi, L. Sandoval, H. Ding, A. Jain, J. A. Peterson, T. Kang, G. P. Pujari, J. L. Tomlinson, R. Budhraj, R. M. Zenka, N. Kannan, B. R. Kipp, S. Dasari, A. Gaspar-Maia, R. L. Smoot, R. K. Kandasamy and A. Pandey (2024). "Diversity of post-translational modifications and cell signaling revealed by single cell and single organelle mass spectrometry." *Commun Biol* 7(1): 884. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06579-7>

Nambu, M., S. Nishiumi, T. Kobayashi, T. Masuda, S. Ito, M. Yoshida and S. Ohtsuki (2020). "Effects of differences in pre-analytical processing on blood protein profiles determined with SWATH-MS." *J Proteomics* 223: 103824.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103824>

Nancy Hilda, J. and S. Das (2018). "Neutrophil CD64, TLR2 and TLR4 expression increases but phagocytic potential decreases during tuberculosis." *Tuberculosis (Edinb)* 111: 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.06.010>

Navarro Leon, A. I., M. Munoz, N. Iglesias, C. Blanco-Vazquez, A. Balseiro, F. Milhano Santos, S. Ciordia, F. J. Corrales, T. Iglesias and R. Casais (2024). "Proteomic Serum Profiling of Holstein Friesian Cows with Different Pathological Forms of Bovine Paratuberculosis Reveals Changes in the Acute-Phase Response and Lipid Metabolism." *J Proteome Res* 23(8): 2762-2779. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.3c00244>

Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (2017). "Niedersächsische Verordnung zum Schutz der Rinder gegen die Paratuberkulose (Nds. ParaTb-VO) vom 10. Oktober 2017", ausgegeben am 24.10.2017

Nielsen, S. S. and A. K. Ersbøll (2006). "Age at Occurrence of Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis in Naturally Infected Dairy Cows." *Journal of Dairy Science* 89(12): 4557-4566. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72505-X](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72505-X)

Nielsen, S. S. and N. Toft (2008). "Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques." *Vet Microbiol* 129(3-4): 217-235. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011>

Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2008). "Fcγ receptors as regulators of immune responses." *Nat Rev Immunol* 8(1): 34-47. <https://doi.org/10.1038/nri2206>

Noble, A., B. Paudyal, J. C. Schwartz, W. Mwangi, D. Munir, E. Tchilian, J. A. Hammond and S. P. Graham (2023). "Distinct effector functions mediated by Fc regions of bovine IgG subclasses and their interaction with Fc gamma receptors." *Front Immunol* 14: 1286903. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1286903>

Nogueira, B. M. F., S. Krishnan, B. Barreto-Duarte, M. Araujo-Pereira, A. T. L. Queiroz, J. J. Ellner, P. Salgame, T. J. Scriba, T. R. Sterling, A. Gupta and B. B. Andrade (2022). "Diagnostic biomarkers for active tuberculosis: progress and challenges." *EMBO Mol Med* 14(12): e14088. <https://doi.org/10.15252/emmm.202114088>

Novo, L. C., K. L. Parker Gaddis, X. L. Wu, T. M. McWhorter, J. Burchard, H. D. Norman, J. Durr, R. Fourdraine and F. Penagaricano (2024). "Genetic parameters and trends for Johne's disease in US Holsteins: An updated study." *J Dairy Sci* 107(7): 4804-4821. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23788>

Nunez-Garcia, J., S. H. Downs, J. E. Parry, D. A. Abernethy, J. M. Broughan, A. R. Cameron, A. J. Cook, R. de la Rua-Domenech, A. V. Goodchild, J. Gunn, S. J. More, S. Rhodes, S. Rolfe, M. Sharp, P. A. Upton, H. M. Vordermeier, E. Watson, M. Welsh, A. O. Whelan, J. A. Woolliams, R. S. Clifton-Hadley and M. Greiner (2018). "Meta-analyses of the sensitivity and specificity of ante-mortem and

post-mortem diagnostic tests for bovine tuberculosis in the UK and Ireland." *Prev Vet Med* 153: 94-107. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.02.017>

Ogunlade, B., L. F. Tadesse, H. Li, N. Vu, N. Banaei, A. K. Barczak, A. A. E. Saleh, M. Prakash and J. A. Dionne (2024). "Rapid, antibiotic incubation-free determination of tuberculosis drug resistance using machine learning and Raman spectroscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 121(25): e2315670121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2315670121>

Ottardi, M., I. Lechner, J. Wang, S. Schmitt, M. Schneeberger, R. M. Schmid, R. Stephan and M. Meylan (2024). "Seroprevalence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Swiss dairy herds and risk factors for a positive herd status and within-herd prevalence." *Front Vet Sci* 11: 1409694. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1409694>

Ozsvari, L., A. Harnos, Z. Lang, A. Monostori, S. Strain and I. Fodor (2020). "The Impact of Paratuberculosis on Milk Production, Fertility, and Culling in Large Commercial Hungarian Dairy Herds." *Front Vet Sci* 7: 565324. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.565324>

Park, H. E., J. S. Park, H. T. Park, J. G. Choi, J. I. Shin, M. Jung, H. L. Kang, S. C. Baik, W. K. Lee, D. Kim, H. S. Yoo and M. K. Shin (2021). "Alpha-2-Macroglobulin as a New Promising Biomarker Improving the Diagnostic Sensitivity of Bovine Paratuberculosis." *Front Vet Sci* 8: 637716. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.637716>

Park, H. E., J. S. Park, H. T. Park, J. I. Shin, K. M. Kim, S. R. Park, J. G. Choi, M. Jung, H. L. Kang, S. C. Baik, W. K. Lee, H. S. Yoo and M. K. Shin (2022). "Fetuin as a potential serum biomarker to detect subclinical shedder of bovine paratuberculosis." *Microb Pathog* 169: 105675. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105675>

Parker, H. A., L. Forrester, C. D. Kaldor, N. Dickerhof and M. B. Hampton (2021). "Antimicrobial Activity of Neutrophils Against Mycobacteria." *Front Immunol* 12: 782495. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.782495>

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

Pietrowska, M., A. Wlosowicz, M. Gawin and P. Widlak (2019). "MS-Based Proteomic Analysis of Serum and Plasma: Problem of High Abundant Components and Lights and Shadows of Albumin Removal." *Adv Exp Med Biol* 1073: 57-76. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12298-0_3

Plebani, M., G. Banfi, S. Bernardini, F. Bondanini, L. Conti, R. Dorizzi, F. E. Ferrara, R. Mancini and T. Trenti (2020). "Serum or plasma? An old question looking for new answers." *Clin Chem Lab Med* 58(2): 178-187. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0719>

Pop, T. L., C. Sirbe, G. Benta, A. Mititelu and A. Grama (2022). "The Role of Vitamin D and Vitamin D Binding Protein in Chronic Liver Diseases." *Int J Mol Sci* 23(18). <https://doi.org/10.3390/ijms231810705>

Poupart, P., M. Coene, H. Van Heuverswyn and C. Cocito (1993). "Preparation of a specific RNA probe for detection of Mycobacterium paratuberculosis and diagnosis of Johne's disease." *Journal of Clinical Microbiology* 31(6): 1601-1605. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.6.1601-1605.1993>

Prakoewa, F. R. S., N. Haningtyas, L. M. Dewi, E. J. Handoko, M. T. Azenta and M. F. Ilyas (2024). "The role of CXCL10 as a biomarker for immunological response among patients with leprosy: a systematic literature review." *PeerJ* 12: e17170. <https://doi.org/10.7717/peerj.17170>

Pritchard, T. C., M. P. Coffey, K. S. Bond, M. R. Hutchings and E. Wall (2017). "Phenotypic effects of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in dairy cattle." *J Dairy Sci* 100(1): 679-690. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11323>

Pumpitakkul, V., S. Roytrakul, N. Phaonakrop, A. Thongphakdee, S. Sanannu, T. Nipanunt, S. Pandhumas, K. Kaewsen, S. Ployetch, S. Sirisawadi, N. Kunasut, P. Anuracpreeda, A. Watthanadirek-Wijidwong and G. Suriyaphol (2024). "Analysis of serum proteomic profiles of endangered Siamese and Burmese Eld's deer infected with subclinical Babesia bovis in Thailand." *Acta Trop* 257: 107294. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107294>

Qual, D. A., J. B. Kaneene, T. J. Varty, R. Miller and C. O. Thoen (2010). "Lack of association between the occurrence of Crohn's disease and occupational exposure to dairy and beef cattle herds infected with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis." *J Dairy Sci* 93(6): 2371-2376. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2344>

Raizman, E. A., S. J. Wells, S. M. Godden, J. Fetrow and J. M. Oakes (2007). "The associations between culling due to clinical Johne's disease or the detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis fecal shedding and the diagnosis of clinical or subclinical diseases in two dairy herds in Minnesota, USA." *Preventive Veterinary Medicine* 80(2): 166-178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.02.005>

Ramachandra, L., Y. Qu, Y. Wang, C. J. Lewis, B. A. Cobb, K. Takatsu, W. H. Boom, G. R. Dubyak and C. V. Harding (2010). "Mycobacterium tuberculosis synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation." *Infect Immun* 78(12): 5116-5125. <https://doi.org/10.1128/IAI.01089-09>

Rasmussen, P., H. W. Barkema, E. Beaulieu, S. Mason and D. C. Hall (2022). "Economic premiums associated with Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis-negative replacement purchases in major dairy-producing regions." *J Dairy Sci* 105(4): 3234-3247. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21224>

- Rasmussen, P., H. W. Barkema and D. C. Hall (2021).** "Corrigendum: Effectiveness and Economic Viability of Johne's Disease (Paratuberculosis) Control Practices in Dairy Herds." *Front Vet Sci* 8: 657453. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.657453>
- Rasmussen, P., H. W. Barkema, S. Mason, E. Beaulieu and D. C. Hall (2021).** "Economic losses due to Johne's disease (paratuberculosis) in dairy cattle." *J Dairy Sci* 104(3): 3123-3143. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19381>
- Rasper-Hossinger, M., M. Biggel, R. Stephan, F. Seehusen and S. Scherrer (2023).** "Strain diversity in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-positive bovine fecal samples collected in Switzerland." *Front Vet Sci* 10: 1154516. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1154516>
- Rayment, N., G. Rhodes, B. Hudspith, V. Hughes, F. Chianini, G. Agrawal, T. J. Bull, R. Pickup and J. Sanderson (2024).** "Visualisation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cultured cells, infected sheep and human tissue sections using fluorescent in situ hybridization (FISH)." *J Microbiol Methods* 224: 107001. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.107001>
- Rekvig, O. P. (2024).** "The greatest contribution to medical science is the transformation from studying symptoms to studying their causes-the unrelenting legacy of Robert Koch and Louis Pasteur-and a causality perspective to approach a definition of SLE." *Front Immunol* 15: 1346619. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1346619>
- Repnik, U., A. E. Starr, C. M. Overall and B. Turk (2015).** "Cysteine Cathepsins Activate ELR Chemokines and Inactivate Non-ELR Chemokines." *J Biol Chem* 290(22): 13800-13811. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.638395>
- Ridge, S. E., I. R. Morgan, D. C. Sockett, M. T. Collins, R. J. Condron, N. W. Skilbeck and J. J. Webber (1991).** "Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle." *Aust Vet J* 68(8): 253-257. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1991.tb03230.x>
- Riese, R. J., P. R. Wolf, D. Bromme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh and H. A. Chapman (1996).** "Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading." *Immunity* 4(4): 357-366. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80249-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80249-6)
- Rosseels, V. and K. Huygen (2008).** "Vaccination against paratuberculosis." *Expert Rev Vaccines* 7(6): 817-832. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.6.817>
- Rossi, G., Y. T. Grohn, Y. H. Schukken and R. L. Smith (2017).** "The effect of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows." *J Dairy Sci* 100(9): 7446-7454. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12721>
- Roussel, A. J., M. C. Libal, R. L. Whitlock, T. B. Hairgrove, K. S. Barling and J. A. Thompson (2005).** "Prevalence of and risk factors for paratuberculosis in

purebred beef cattle." *J Am Vet Med Assoc* 226(5): 773-778.
<https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.773>

Rozanova, S., K. Barkovits, M. Nikolov, C. Schmidt, H. Urlaub and K. Marcus (2021). "Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview." *Methods Mol Biol* 2228: 85-116. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1024-4_8

Schiff, D. E., J. Rae, T. R. Martin, B. H. Davis and J. T. Curnutte (1997). "Increased phagocyte Fc gammaRI expression and improved Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon-gamma treatment of normal human subjects." *Blood* 90(8): 3187-3194

Schiff, H. F., N. F. Walker, C. Ugarte-Gil, M. Tebruegge, A. Manousopoulou, S. D. Garbis, S. Mansour, P. H. M. Wong, G. Rockett, P. Piazza, M. Niranjani, A. F. Vallejo, C. H. Woelk, R. J. Wilkinson, L. B. Tezera, D. Garay-Baquero and P. Elkington (2024). "Integrated plasma proteomics identifies tuberculosis-specific diagnostic biomarkers." *JCI Insight* 9(8). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.173273>

Scholman, R. C., B. Giovannone, S. Hiddingh, J. M. Meerding, B. Malvar Fernandez, M. E. A. van Dijk, M. J. Tempelman, B. J. Prakken and W. de Jager (2018). "Effect of anticoagulants on 162 circulating immune related proteins in healthy subjects." *Cytokine* 106: 114-124.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.021>

Sendide, K., A. E. Deghmane, D. Pechkovsky, Y. Av-Gay, A. Talal and Z. Hmama (2005). "Mycobacterium bovis BCG attenuates surface expression of mature class II molecules through IL-10-dependent inhibition of cathepsin S." *J Immunol* 175(8): 5324-5332. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5324>

Serrano, M., N. Elguezabal, I. A. Sevilla, M. V. Geijo, E. Molina, R. Arrazuria, A. Urkitza, G. J. Jones, M. Vordermeier, J. M. Garrido and R. A. Juste (2017). "Tuberculosis Detection in Paratuberculosis Vaccinated Calves: New Alternatives against Interference." *PLoS One* 12(1): e0169735.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169735>

Shao, M., N. Cui, Y. Tang, F. Chen, Y. Cui, G. Dang and S. Liu (2023). "A candidate subunit vaccine induces protective immunity against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in mice." *npj Vaccines* 8(1): 72.
<https://doi.org/10.1038/s41541-023-00675-1>

Sharma, S., K. Sharma, R. Kumar, D. Dayal, S. Dhanda, N. Kumar, K. K. Chaubey, S. V. Singh, S. Banger and V. Sharma (2024). "Evaluation of Immune Exhaustion and Co-Inhibitory Receptor Expression in Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis (MAP) Seropositive Diarrhoeic Bovines." *Pathogens* 13(6). <https://doi.org/10.3390/pathogens13060473>

Shin, M. K., H. T. Park, S. W. Shin, M. Jung, Y. B. Im, H. E. Park, Y. I. Cho and H. S. Yoo (2015). "Whole-blood gene-expression profiles of cows infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis reveal changes in immune response

and lipid metabolism." *J Microbiol Biotechnol* 25(2): 255-267. <https://doi.org/10.4014/jmb.1408.08059>

Shuken, S. R. (2023). "An Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics." *J Proteome Res* 22(7): 2151-2171. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00838>

Silva-Pereira, T. T., N. C. Soler-Camargo and A. M. S. Guimaraes (2024). "Diversification of gene content in the Mycobacterium tuberculosis complex is determined by phylogenetic and ecological signatures." *Microbiol Spectr* 12(2): e0228923. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02289-23>

Sivanandham, R., E. Brocca-Cofano, N. Krampe, E. Falwell, S. M. K. Venkatraman, R. M. Ribeiro, C. Apetrei and I. Pandrea (2018). "Neutrophil extracellular trap production contributes to pathogenesis in SIV-infected nonhuman primates." *J Clin Invest* 128(11): 5178-5183. <https://doi.org/10.1172/JCI99420>

Smith, R. L., M. A. Al-Mamun and Y. T. Grohn (2017). "Economic consequences of paratuberculosis control in dairy cattle: A stochastic modeling study." *Prev Vet Med* 138: 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.01.007>

Smyth, P., J. Sasiwachirangkul, R. Williams and C. J. Scott (2022). "Cathepsin S (CTSS) activity in health and disease - A treasure trove of untapped clinical potential." *Mol Aspects Med* 88: 101106. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2022.101106>

Sockett, D. C., T. A. Conrad, C. B. Thomas and M. T. Collins (1992). "Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis." *J Clin Microbiol* 30(5): 1134-1139. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.5.1134-1139.1992>

Ssekitoleko, J., L. Ojok, A. Abd El Wahed, J. Erume, A. Amanzada, E. Eltayeb, K. H. Eltom and J. B. Okuni (2021). "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Virulence: A Review." *Microorganisms* 9(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122623>

Stabel, J. R. and J. P. Bannantine (2005). "Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in fecal samples." *J Clin Microbiol* 43(9): 4744-4750. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4744-4750.2005>

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). <https://doi.org/10.1128/IAI.00650-19>

Stabel, J. R., L. Bradner, S. Robbe-Austerman and D. C. Beitz (2014). "Clinical disease and stage of lactation influence shedding of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis into milk and colostrum of naturally infected dairy cows." *Journal of Dairy Science* 97(10): 6296-6304. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8204>

Steimle, A., H. Kalbacher, A. Maurer, B. Beifuss, A. Bender, A. Schafer, R. Muller, I. B. Autenrieth and J. S. Frick (2016). "A novel approach for reliable detection of cathepsin S activities in mouse antigen presenting cells." *J Immunol Methods* 432: 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.02.015>

Stevenson, K. (2015). "Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review." *Vet Res* 46(1): 64. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0203-2>

Su, H., S. Weng, L. Luo, Q. Sun, T. Lin, H. Ma, Y. He, J. Wu, H. Wang, W. Zhang and Y. Xu (2024). "Mycobacterium tuberculosis hijacks host macrophages-derived interleukin 16 to block phagolysosome maturation for enhancing intracellular growth." *Emerg Microbes Infect* 13(1): 2322663. <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2322663>

Sullivan, G. P., P. Davidovich, N. Munoz-Wolf, R. W. Ward, Y. E. Hernandez Santana, D. M. Clancy, A. Gorman, Z. Najda, B. Turk, P. T. Walsh, E. C. Lavelle and S. J. Martin (2022). "Myeloid cell-derived proteases produce a proinflammatory form of IL-37 that signals via IL-36 receptor engagement." *Sci Immunol* 7(78): eade5728. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.ade5728>

Sweeney, R. W. (2011). "Pathogenesis of paratuberculosis." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 27(3): 537-546, v. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.001>

Sweeney, R. W., R. H. Whitlock, T. L. Bowersock, D. L. Cleary, T. R. Meinert, P. L. Habecker and G. W. Pruitt (2009). "Effect of subcutaneous administration of a killed *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis vaccine on colonization of tissues following oral exposure to the organism in calves." *Am J Vet Res* 70(4): 493-497. <https://doi.org/10.2460/ajvr.70.4.493>

Swift, G. L., E. D. Srivastava, R. Stone, R. D. Pullan, R. G. Newcombe, J. Rhodes, S. Wilkinson, P. Rhodes, G. Roberts, B. W. Lawrie and et al. (1994). "Controlled trial of anti-tuberculous chemotherapy for two years in Crohn's disease." *Gut* 35(3): 363-368. <https://doi.org/10.1136/gut.35.3.363>

Szelest, M. and K. Giannopoulos (2024). "Biological relevance of alternative splicing in hematologic malignancies." *Mol Med* 30(1): 62. <https://doi.org/10.1186/s10020-024-00839-2>

Tiambeng, T. N., D. S. Roberts, K. A. Brown, Y. Zhu, B. Chen, Z. Wu, S. D. Mitchell, T. M. Guardado-Alvarez, S. Jin and Y. Ge (2020). "Nanoproteomics enables proteoform-resolved analysis of low-abundance proteins in human serum." *Nat Commun* 11(1): 3903. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17643-1>

Tieri, S., C. Morsella, L. Mendez, B. Vasini, C. Garro and F. Paolicchi (2024). "Comparison of two serological diagnosis tests for bovine paratuberculosis." *Vet Res Commun*. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10363-7>

Timms, V. J., G. Daskalopoulos, H. M. Mitchell and B. A. Neilan (2016). "The Association of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with Inflammatory

Bowel Disease." *PLoS One* 11(2): e0148731.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148731>

Tiwari, A., J. A. VanLeeuwen, S. L. McKenna, G. P. Keefe and H. W. Barkema (2006). "John's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds." *Can Vet J* 47(9): 874-882

Tremblay, M., M. Kammer, H. Lange, S. Plattner, C. Baumgartner, J. A. Stegeman, J. Duda, R. Mansfeld and D. Dopfer (2018). "Identifying poor metabolic adaptation during early lactation in dairy cows using cluster analysis." *J Dairy Sci* 101(8): 7311-7321. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13582>

Tuberquia-Lopez, B. C., N. M. Correa-Valencia, M. Hernandez-Agudelo, J. A. Fernandez-Silva and N. F. Ramirez-Vasquez (2022). "Paratuberculosis control strategies in dairy cattle: A systematic review." *Open Vet J* 12(4): 525-539. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2022.v12.i4.16>

Twort, F. W., G. L. Y. Ingram and L. E. Hill (1912). "A method for isolating and cultivating the mycobacterium enteritidis chronicæ pseudotuberculosis 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. <https://doi.org/10.1098/rspb.1912.0011>

Typiak, M., P. Trzonkowski, M. Skotarczak and A. Dubaniewicz (2023). "Comparative Analysis of Fcγ and Complement Receptors Presence on Monocytes in Pulmonary Sarcoidosis and Tuberculosis." *Int J Mol Sci* 24(11). <https://doi.org/10.3390/ijms24119713>

Udby, L., J. Calafat, O. E. Sorensen, N. Borregaard and L. Kjeldsen (2002). "Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils." *J Leukoc Biol* 72(3): 462-469

Uzoigwe, J. C., M. L. Khaita and P. S. Gibbs (2007). "Epidemiological evidence for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis as a cause of Crohn's disease." *Epidemiol Infect* 135(7): 1057-1068. <https://doi.org/10.1017/S0950268807008448>

Vallée, H. and P. Rinjard (1926). "Etudes sur l'entérite paratuberculeuse des bovidés." *Res. Gen. Med. Vet.* 35(1)

van Hooij, A., E. M. Tjon Kon Fat, D. de Jong, M. Khatun, S. Soren, A. S. Chowdhury, J. Chandra Roy, K. Alam, J. P. Kim, J. H. Richardus, A. Geluk and P. Corstjens (2021). "Prototype multi-biomarker test for point-of-care leprosy diagnostics." *iScience* 24(1): 102006. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.102006>

van Hooij, A., S. van den Eeden, R. Richardus, E. Tjon Kon Fat, L. Wilson, K. Franken, R. Faber, M. Khatun, K. Alam, A. Sufian Chowdhury, J. H. Richardus, P. Corstjens and A. Geluk (2019). "Application of new host biomarker profiles in

quantitative point-of-care tests facilitates leprosy diagnosis in the field." *EBioMedicine* 47: 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.009>

Van Kruiningen, H. J., R. J. Chiodini, W. R. Thayer, J. A. Coutu, R. S. Merkal and P. L. Runnels (1986). "Experimental disease in infant goats induced by a Mycobacterium isolated from a patient with Crohn's disease. A preliminary report." *Dig Dis Sci* 31(12): 1351-1360. <https://doi.org/10.1007/BF01299814>

Vandooren, J. and Y. Itoh (2021). "Alpha-2-Macroglobulin in Inflammation, Immunity and Infections." *Front Immunol* 12: 803244. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803244>

Vass-Bognar, B., J. L. Khol, W. Baumgartner, K. Fornyos, M. Papp, Z. Abonyi-Toth, M. Bakony and V. Jurkovich (2024). "Investigating the Prevalence of Paratuberculosis in Hungarian Large-Scale Dairy Herds and the Success of Control Measures over Four Years." *Animals (Basel)* 14(1). <https://doi.org/10.3390/ani14010151>

Verteramo Chiu, L. J., L. W. Tauer, M. A. Al-Mamun, K. Kaniyamattam, R. L. Smith and Y. T. Grohn (2018). "An agent-based model evaluation of economic control strategies for paratuberculosis in a dairy herd." *J Dairy Sci* 101(7): 6443-6454. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13175>

Wagh, A. N., S. Mugudalabetta, N. O. Gutierrez, K. Padebettu, A. K. Pandey, B. K. Pandey, M. Thulasingham, S. Satyanarayana and A. Dongre (2018). "Does appreciative inquiry decrease false positive diagnosis during leprosy case detection campaigns in Bihar, India? An operational research study." *PLoS Negl Trop Dis* 12(12): e0007004. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007004>

Wang, H. and A. E. Sama (2012). "Anti-inflammatory role of fetuin-A in injury and infection." *Curr Mol Med* 12(5): 625-633. <https://doi.org/10.2174/156652412800620039>

Wang, H., T. Zhao, J. Zeng, R. Zhang, L. Pu, S. Qian, S. Xu, Y. Jiang, L. Pan, X. Dai, X. Guo and L. Han (2024). "Methods and clinical biomarker discovery for targeted proteomics using Olink technology." *Proteomics Clin Appl*: e2300233. <https://doi.org/10.1002/prca.202300233>

Wang, Y., M. Qu, Y. Liu, H. Wang, Y. Dong and X. Zhou (2022). "KLK12 Regulates MMP-1 and MMP-9 via Bradykinin Receptors: Biomarkers for Differentiating Latent and Active Bovine Tuberculosis." *Int J Mol Sci* 23(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012257>

Weber, M. F., D. Kelton, S. W. F. Eisenberg and K. Donat (2024). "Progress in Paratuberculosis Control Programmes for Dairy Herds." *Animals (Basel)* 14(7). <https://doi.org/10.3390/ani14071127>

Weiss, D. J., O. A. Evanson, C. de Souza and M. S. Abrahamsen (2005). "A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by

Mycobacterium avium subsp paratuberculosis." *Am J Vet Res* 66(4): 721-726. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.721>

Weiss, D. J., O. A. Evanson, D. J. McClenahan, M. S. Abrahamsen and B. K. Walcheck (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. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.1002-1008.2001>

White, R., A. Janoff and H. P. Godfrey (1980). "Secretion of Alpha-2-macroglobulin by human alveolar macrophages." *Lung* 158(1): 9-14. <https://doi.org/10.1007/BF02713697>

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. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30410-2](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30410-2)

Whittington, R., K. Donat, M. F. Weber, D. Kelton, S. S. Nielsen, S. Eisenberg, N. Arrigoni, R. Juste, J. L. Saez, N. Dhand, A. Santi, A. Michel, H. Barkema, P. Kralik, P. Kostoulas, L. Citer, F. Griffin, R. Barwell, M. A. S. Moreira, I. Slana, H. Koehler, S. V. Singh, H. S. Yoo, G. Chavez-Gris, A. Goodridge, M. Ocepek, J. Garrido, K. Stevenson, M. Collins, B. Alonso, K. Cirone, F. Paolicchi, L. Gavey, M. T. Rahman, E. de Marchin, W. Van Praet, C. Bauman, G. Fecteau, S. McKenna, M. Salgado, J. Fernandez-Silva, R. Dziedzinska, G. Echeverria, J. Seppanen, V. Thibault, V. Fridriksdottir, A. Derakhshandeh, M. Haghkhah, L. Ruocco, S. Kawaji, E. Momotani, C. Heuer, S. Norton, S. Cadmus, A. Agdestein, A. Kampen, J. Szteyn, J. Frossling, E. Schwan, G. Caldow, S. Strain, M. Carter, S. Wells, M. Munyeme, R. Wolf, R. Gurung, C. Verdugo, C. Fourichon, T. Yamamoto, S. Thapaliya, E. Di Labio, M. Ekgatat, A. Gil, A. N. Alesandre, J. Piaggio, A. Suanes and J. H. de Waard (2019). "Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries." *BMC Vet Res* 15(1): 198. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>

Whittington Richard, J., D. J. Marshall, J. Nicholls Paul, B. Marsh Ian and A. Reddacliff Leslie (2004). "Survival and Dormancy of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the Environment." *Applied and Environmental Microbiology* 70(5): 2989-3004. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2989-3004.2004>

Whittington, R. J., I. B. Marsh, V. Saunders, I. R. Grant, R. Juste, I. A. Sevilla, E. J. Manning and R. H. Whitlock (2011). "Culture phenotypes of genomically and geographically diverse Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolates from different hosts." *J Clin Microbiol* 49(5): 1822-1830. <https://doi.org/10.1128/JCM.00210-11>

Whittington, R. J. and E. S. Sergeant (2001). "Progress towards understanding the spread, detection and control of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in animal populations." *Aust Vet J* 79(4): 267-278. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb11980.x>

Whittington, R. J. and P. A. Windsor (2009). "In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis." *Vet J* 179(1): 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.023>

Wibberg, D., M. Price-Carter, C. Ruckert, J. Blom and P. Mobius (2020). "Complete Genome Sequence of Ovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strain JIII-386 (MAP-S/type III) and Its Comparison to MAP-S/type I, MAP-C, and *M. avium* Complex Genomes." *Microorganisms* 9(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010070>

Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. Humphery-Smith, D. F. Hochstrasser and K. L. Williams (1996). "Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it." *Biotechnol Genet Eng Rev* 13: 19-50. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>

Windsor, P. A. and R. J. Whittington (2010). "Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease." *The Veterinary Journal* 184(1): 37-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.007>

WOAH (2024). Paratuberculosis, in: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2024, World Organisation for Animal Health (WOAH), Paris, France. 14th ed. Chapter 3.1.17.

Yalamanchili, D. R., Z. A. Rockov, L. S. Polakof, E. M. Debbi, S. K. Kitahara and G. D. Paiement (2023). "Serum CD64 as a Marker for Chronic Periprosthetic Joint Infection." *Arthroplast Today* 21: 101138. <https://doi.org/10.1016/j.artd.2023.101138>

Yerlikaya, S., T. Broger, E. MacLean, M. Pai and C. M. Denking (2017). "A tuberculosis biomarker database: the key to novel TB diagnostics." *Int J Infect Dis* 56: 253-257. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.025>

You, Q., C. P. Verschoor, S. D. Pant, J. Macri, G. M. Kirby and N. A. Karrow (2012). "Proteomic analysis of plasma from Holstein cows testing positive for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)." *Vet Immunol Immunopathol* 148(3-4): 243-251. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.05.002>

Yu, J., Y. Fu, J. Gao, Q. Zhang, N. Zhang, Z. Zhang, X. Jiang, C. Chen and Z. Wen (2024). "Cathepsin C from extracellular histone-induced M1 alveolar macrophages promotes NETosis during lung ischemia-reperfusion injury." *Redox Biol* 74: 103231. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103231>

Yu, Y., X. X. Jiang and J. C. Li (2023). "Biomarker discovery for tuberculosis using metabolomics." *Front Mol Biosci* 10: 1099654. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1099654>

Zang, X., G. Dang, Z. Cai, M. Shao, Y. Tang, J. Cao, Z. Cui and S. Liu (2022). "Extracellular DNase MAP3916c attacks the neutrophil extracellular traps and is

needed for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis virulence." *Vet Microbiol* 273: 109529. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109529>

Zarei-Kordshouli, F., B. Geramizadeh and A. Khodakaram-Tafti (2019). "Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS 900 DNA in biopsy tissues from patients with Crohn's disease: histopathological and molecular comparison with Johne's disease in Fars province of Iran." *BMC Infect Dis* 19(1): 23. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3619-2>

Zhang, C., Z. Shu, S. Chen, J. Peng, Y. Zhao, X. Dai, J. Li, X. Zou, J. Hu and H. Huang (2024). "A machine learning-based model analysis for serum markers of liver fibrosis in chronic hepatitis B patients." *Sci Rep* 14(1): 12081. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63095-8>

Zhang, N., J. Wu and Q. Zheng (2024). "Chemical proteomics approaches for protein post-translational modification studies." *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1872(4): 141017. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2024.141017>

Zhao, K. and S. Y. Rhee (2023). "Interpreting omics data with pathway enrichment analysis." *Trends Genet* 39(4): 308-319. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.01.003>

Zhou, Q., P. Shi, W. D. Shi, J. Gao, Y. C. Wu, J. Wan, L. L. Yan and Y. Zheng (2024). "Identification of potential biomarkers of leprosy: A study based on GEO datasets." *PLoS One* 19(5): e0302753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302753>

Zhu, Y. (2024). "Plasma/Serum Proteomics based on Mass Spectrometry." *Protein Pept Lett* 31(3): 192-208. <https://doi.org/10.2174/0109298665286952240212053723>

Zhuang, L., L. Yang, L. Li, Z. Ye and W. Gong (2024). "Mycobacterium tuberculosis: immune response, biomarkers, and therapeutic intervention." *MedComm (2020)* 5(1): e419. <https://doi.org/10.1002/mco2.419>

Zuo, T., Q. Xie, J. Liu, J. Yang, J. Shi, D. Kong, Y. Wang, Z. Zhang, H. Gao, D. B. Zeng, X. Wang, P. Tao, W. Wei, J. Wang, Y. Li, Q. Long, C. Li, L. Chang, H. Ning, Y. Li, C. Cui, X. Ge, J. Wu, G. Li, X. Hong, X. Yang, E. Dai, F. He, J. Wu, Y. Ruan, S. Lu and P. Xu (2023). "Macrophage-Derived Cathepsin S Remodels the Extracellular Matrix to Promote Liver Fibrogenesis." *Gastroenterology* 165(3): 746-761 e716. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.05.039>

DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg, für die Überlassung dieses spannenden Forschungsthemas bedanken. Besonders bedanke ich mich für die stets hervorragende Betreuung, die hilfreichen Kommentare und die Zuverlässigkeit und Geschwindigkeit der Beantwortung jeglicher Fragestellungen. Vielen Dank für die tatkräftige Unterstützung und die ständige Erreichbarkeit! Ich wusste dies stets sehr zu schätzen.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. Stefanie Hauck, unter deren Leitung die massenspektrometrischen Analysen am Helmholtz Zentrum München durchgeführt wurden. Frau Dr. Christine von Törne danke ich für die fachliche Unterstützung bei allen proteomischen Fragestellungen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Armin Scholz und den Mitarbeitern des Lehr- und Versuchsguts Oberschleißheim bedanken. Ich war dort jederzeit willkommen, um Blutproben der Kontrollkühe zu entnehmen. Falls mal Unterstützung im Stall nötig war, war stets eine helfende Hand zur Stelle.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch, insbesondere Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer und Frau Dr. Andrea Stockmaier-Didier, für die mikrobiologische Untersuchung des Probenmaterials.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen ehemaligen und aktuellen Mitdoktoranden Amelie Fleischer, Dr. Anne Hoffmann, Carolin Sprengel, Dr. Felix Gard, Dr. Lucia Korbonits, Lili Flad, Dr. Marie-Christin Schilloks, Ronja Söth, Sabrina Albinger und Sabrina Trapp. Egal ob im Labor oder im Rinderstall, auf eure Unterstützung konnte ich jederzeit zählen. Dank euch, bin ich jeden Tag sehr gerne in die Arbeit gekommen. Es gab wirklich keinen Tag, an dem ihr mich nicht wegen einer lustigen Situation oder Geschichte zum Lachen gebracht habt. Danke für die vielen schönen Momente!

Ein weiterer Dank geht auch an unsere Postdocs Dr. Roxane Degroote, Dr. Kristina Kleinwort, Dr. Adrian Schmalen und Dr. Ulrich Wilk für die wissenschaftlichen Hilfestellungen und Ratschläge. Vor allem dir, liebe Roxy, danke ich für dein offenes Ohr, deine aufmunternden Worte, deine Geduld und die hilfreichen Korrekturen.

Ein großer Dank gilt auch unserer ehemaligen technischen Assistentin Sieglinde Hirmer sowie allen aktuellen technischen Assistenten Barbara Amann, Ursula Cramer, Lydia Hoffmann, Jonas Liedl, Stefanie Püls, Mirjam Telorac und Tanja Weißer für die tatkräftige Unterstützung im Labor. Insbesondere möchte ich mich bei Ulla für die vielen gemeinsamen Stunden in der Zellkultur und bei Tanja für die lustigen, langen FACS-Sessions bedanken. Zudem danke ich dir, Bärbl, dass du trotz unserer unterschiedlichen Ansichten immer alles so durchgeführt hast, wie ich es mir vorgestellt habe.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte bedanken. Danke, liebe Mama, für die fast täglichen, liebevollen Motivationsnachrichten während der Schreibzeit und deinen beeindruckenden Computerkenntnissen. Danke, lieber Papa, für die vielen Fachsimpeleien und dafür, dass du mir schon als Kind die Faszination für Rinder nahegebracht hast. Ein großer Dank geht auch an meine Großeltern für das immer offene Ohr und das große Interesse an meiner Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich dir, lieber Michael, von ganzem Herzen. Du hast mich stets aufgemuntert, motiviert und unterstützt. Du hast mir den Rücken freigehalten und unter anderem dafür gesorgt, dass ich selbst nach langen Labortagen noch eine anständige Mahlzeit zu mir genommen hab – auch wenn es manchmal erst nach Mitternacht war. Danke für Alles!