

Aus dem Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Lungenzentrum

Programmbereich Infektion

Programmdirektor: Prof. Dr. Stefan Niemann

**Etablierung der *Laser Capture Microdissection* zur
differenzierten Analyse der Stoffwechsellage an
Tuberkulose-Granulomen des
IL-13-überexprimierenden Mausmodells**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von Sofia Scheele
aus Köln

Lübeck 2025

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
1.1 Tuberkulose	1
1.1.1 Pathogenese der humanen Tuberkulose	1
1.1.2 Das Granulom als zentrales Merkmal der TB-Infektion	2
1.1.3 Makrophagen und ihr Stoffwechsel als zentraler Bestandteil der Wirt-Pathogen-Interaktion	5
1.1.4 Die IL-13-überexprimierende Maus, ein TB-Tiermodell voll unerforschter Potenziale	7
1.2 Methodik zur räumlich differenzierenden Analyse infizierter Gewebeschnitte	10
1.2.1 Fixierung als Prämisse für die Arbeit außerhalb des BSL3-Labores	10
1.2.2 Laser-Mikrodissektion in der TB-Forschung – Räumlich differenzierende Probengewinnung aus Gewebeschnitten.....	12
1.3 Ziele und Struktur der Arbeit	13
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Tierexperimentelle Arbeit	15
2.1.1 Mäuse	15
2.1.2 Bakterien	16
2.1.3 Aerosolinfektion.....	16
2.1.4 Organaufbereitung	17
2.2 Anfertigung von Gewebeschnitten	18
2.2.1 Anfertigung von Paraffinschnitten	18

2.2.2	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	19
2.3	Fixierung.....	20
2.4	Überprüfung der Inaktivierung von <i>Mtb</i> in Lungen-Kryoschnitten durch vorangegangene Fixierung.....	20
2.4.1	MGIT	21
2.4.2	Bakterienkultur	21
2.5	Färbungen	22
2.5.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	22
2.5.2	Kresylviolett.....	23
2.5.3	CD68 ⁺ -Ziehl-Neelsen-Kombifärbung.....	24
2.5.4	Arginase-1-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung.....	26
2.5.5	Trichromfärbung.....	28
2.5.6	Ölrot-O-Färbung.....	29
2.6	Laser-Mikrodissektion.....	30
2.6.1	Gewinnung von Material aus Milz- bzw. Lungenschnitten	31
2.6.2	Gewinnung von Probenmaterial aus unstrukturierten Läsionen und strukturierten Granulomen	31
2.7	RNA-Aufbereitung	33
2.7.1	RNeasy Micro Kit	33
2.7.2	FFPE-Kit.....	34
2.7.3	RNA-Qualitätssicherung.....	35
2.7.4	RNA-Qualitätsbestimmung.....	35
2.7.5	Reverse-Transkription.....	36
2.8	Genexpressionsmessung mittels <i>LightCycler</i>.....	37
2.9	Statistische Auswertung und graphische Darstellung	41
2.10	Arbeitsverteilung innerhalb des Promotionsprojektes.....	41
2.10.1	Laborpraktische Tätigkeiten	41

2.10.2	Theoretisch konzeptionelle Tätigkeit.....	42
3	ERGEBNISSE.....	43
3.1	Methodenetablierung zur Gewinnung von RNA aus infiziertem, kryokonserviertem Lungengewebe mittels Laser-Mikrodissektion.....	43
3.1.1	Nachweis effektiver Mtb-Inaktivierung durch verschiedene Fixierungen	43
3.1.2	RNA-Isolation trotz Fixierung möglich.....	44
3.1.3	MeOH-Fixierung bei Raumtemperatur am geeignetsten für mittels <i>LCM</i> gewonnener Proben.....	46
3.2	Anwendung der Laser-Mikrodissektion zur Untersuchung der Stoffwechsellage in Granulomen der infizierten IL-13^{tg} Maus.....	47
3.2.1	RNA-Qualitätseinschränkungen in zwei Granulombereichen	49
3.2.2	Nachweis über die Möglichkeit der räumlich differenzierenden Genanalyse in Granulomen mittels Laser-Mikrodissektion	50
3.2.3	Explorative Betrachtung der Fettstoffwechsellage in Granulomen mittels Laser-Mikrodissektion	56
4	DISKUSSION.....	60
4.1	Methanol als erfolgsversprechende Fixierung	60
4.1.1	Temperatur- und Zeitabhängigkeit des Fixierungserfolges.....	60
4.1.2	Einfluss der Fixierungen auf die RNA	62
4.2	Messungen von <i>CD68⁺</i>- und <i>Arg1</i>-Expression bestätigen Laser-Mikrodissektion als räumlich differenzierende Methodik in Granulomen der IL-13^{tg} Maus	63
4.2.1	<i>CD68⁺</i> , kein spezifischer Marker zur Beschreibung der Schaummakrophagenzone in der IL-13 ^{tg} -Maus	63
4.2.2	Definierung der Schaummakrophagenzone auf Transkriptionsebene über die Expression von <i>Arg1</i>	64
4.3	Lipidstoffwechsellage in Granulomen der IL-13^{tg} Maus	65
4.3.1	Makrophagen und ihr Stoffwechsel in der Tuberkulose-Infektion	66

4.3.2	Lipidstoffwechsel und Nekrose	71
4.4	Problematik der Methodik am Granulomgewebe und analytische Limitationen der Arbeit	74
4.5	Schlüsse der Arbeit und Ausblick	77
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	81
	LITERATURVERZEICHNIS.....	82
	ANHÄNGE	XIII
A	Zusatzinformationen zu den normalisierten qPCR-Läufen	XIII
B	Negativ-Kontrollen der Immunhistochemischen Färbungen	XIV
	DANKSAGUNG	XV

Abkürzungsverzeichnis

5-HETE	5-Hydroxyeicosatetraensäure
ACC	Acetyl–Coenzyme-A-Carboxylase
ACSL	Acyl-CoA-Synthetase
AMPK	Monophosphat aktivierte Protein-Kinase
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
Arg1	Arginase1-Gen
<i>BMDM</i>	<i>Bone Marrow-Derived Macrophage</i>
BSL3	Biologische Schutzstufe 3
CFH	Kubikfuß pro Stunde
<i>CP</i>	<i>Crossing Point</i>
CPT1	Carnitin-Palmitoyltransferase I
DGAT	Diacylglycerol O-Acyltransferase
<i>ESAT-6</i>	<i>Early Secreted Antigenic Target 6</i>
EtOH	Ethanol
<i>FABP</i>	<i>Fatty-Acid-Binding Protein</i>
Fer-1	Ferostatin-1
FFPE	Formalin Fixierung und Paraffin Einbettung
FZB	Forschungszentrum Borstel
Gpx4	Glutathion Peroxidase 4
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl Transferase
IFNγ	Interferon- γ
IL-13	Interleukin-13
iNOS	Induzierbare Stickoxid-Synthase

IRTG	<i>International Research Training Group</i>
ISS	<i>In situ</i> -Sequenzierung
IVC-Käfig	Individuell belüfteter Käfig
KBE	Kolonien bildende Einheit
LCM	<i>Laser Capture Microdissection</i>
LPS	Lipopolysaccharide
M1	Proinflammatorische M1-Makrophagen
M2	Antiinflammatorische M2-Makrophagen
MDR	<i>Multi-Drug-Resistent</i>
MeOH	Methanol
MGIT	Mykobakterielles-Wachstum-Indikator-Röhrchen
Mtb	<i>Mykobacterium tuberculosis</i>
NLPR3	<i>NLR Family Pyrin Domain Containing 3</i>
NOS	Stickoxid-Synthase
OADC	Oleinsäure, Albumin, Dextrose, Katalase
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyde
PFK2	Phosphofruktokinase
PGC-1β	Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor- γ -Coaktivator-1 β
PI	Phosphatidylinositol
PLIN	Perilipin
PMBC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptor- γ

PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
<i>RD1</i>	<i>Region of Difference</i>
<i>RIN</i>	<i>RNA Integrity Number</i>
ROS	Radikale Sauerstoffspezies
<i>sRIN</i>	<i>Spatial RNA Integrity Number</i>
<i>STAT6</i>	<i>Signal Transducer And Activator of Transcription 6</i>
TAG	Triacylglycerole
TB	Tuberkulose
tg	Transgen
Th1	T Zellen des Subtyps 1
Th2	T Zellen des Subtyps 2
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
<i>UPL</i>	<i>Universal Probe Library</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
<i>Wnt6</i>	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 6</i>

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1:	Humanes nekrotisch-verkäsendes Granulom.....	4
ABBILDUNG 2:	Struktur der Arbeit, Teil 1: Fragen	14
ABBILDUNG 3:	Nachweis der effektiven <i>Mtb</i> -Inaktivierung nach Fixierung	44
ABBILDUNG 4:	<i>Hprt</i> -Messungen nach unterschiedlichen Fixierungen und RNA-Aufbereitungen.....	46
ABBILDUNG 5:	Normalisierung der <i>Hprt</i> -Signale unterschiedlich fixierter Proben über die mittels <i>LCM</i> gewonnenen Flächen.....	47
ABBILDUNG 6:	Arbeitsablauf an <i>Mtb</i> -infizierten Lungenschnitten.....	48
ABBILDUNG 7:	Immunhistochemischer Nachweis über die Hochregulation der <i>CD68⁺</i> - und <i>Arg1</i> -Expression in unstrukturierten Läsionen	52
ABBILDUNG 8:	Verstärkte <i>CD68⁺</i> - und <i>Arg1</i> -Expression in unstrukturierten Läsionen mittels qPCR messbar	53
ABBILDUNG 9:	Immunhistochemischer Nachweis einer verstärkten <i>CD68⁺</i> - und <i>Arg1</i> -Expression in strukturierten Granulomen.....	54
ABBILDUNG 10:	Transkriptioneller Nachweis einer verstärkten <i>CD68⁺</i> - und <i>Arg1</i> -Expression in strukturierten Granulomen.....	56
ABBILDUNG 11:	Differenzierte Betrachtung der Fettstoffwechsellage, Teil 1	58
ABBILDUNG 12:	Differenzierte Betrachtung der Fettstoffwechsellage, Teil 2	59
ABBILDUNG 13:	Lungenschnitt nach Laser-Mikrodissektion.....	76
ABBILDUNG 14:	Struktur der Arbeit, Teil 2: Antworten.....	80
ABBILDUNG 15:	Negativ-Kontrollen der Immunhistochemischen Färbungen....	XIV

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1:	Mäusestämme	16
TABELLE 2:	Materialien Aerosolinfection.....	17
TABELLE 3:	Materialien Organaufbereitung	18
TABELLE 4:	Anfertigung von Paraffinschnitten	19
TABELLE 5:	Materialien Gefrierschnitte	20
TABELLE 6:	Materialien Fixierung	20
TABELLE 7:	Materialien Fixierungsüberprüfung	22
TABELLE 8:	Materialien Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	23
TABELLE 9:	Materialien Kresylviolett-färbung.....	24
TABELLE 10:	Materialien CD-68 ⁺ -Ziehl-Neelsen-Kombifärbung	26
TABELLE 11:	Materialien Arginase-1-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung	27
TABELLE 12:	Materialien Trichromfärbung.....	29
TABELLE 13:	Materialien Ölrot-O-Färbung.....	30
TABELLE 14:	Materialien Laser Mikrodisektion	32
TABELLE 15:	Materialien RNA-Isolation	34
TABELLE 16:	Materialien Qualitätsbestimmung RNA.....	36
TABELLE 17:	Materialien Reverse Transkription	37
TABELLE 18:	qPCR-Schema.....	38
TABELLE 19:	Materialien <i>LightCycler</i> -Messungen	39
TABELLE 20:	Primer- und SONDENSEQUENZ FÜR DIE QUANTITATIVE <i>Real-Time</i> PCR.....	40
TABELLE 21:	Proben aus nekrotischen Zentrum und Schaummakrophagenzone mit geringer RNA-Integrität	50

TABELLE 22: Zusatzinformationen zu den in Kapitel 3.2 dargestellten, auf qPCR-Daten beruhenden Analysen**XIII**

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Tuberkulose

Tuberkulose (TB) ist eine Infektionskrankheit, die weltweit von prägender Bedeutung ist. Trotz des deklarierten Zieles der Weltgesundheitsorganisation, (WHO) die globale TB-Epidemie bis 2030 zu beenden, starben 2022 schätzungsweise immer noch 1,3 Millionen Menschen an dieser Erkrankung. Sie rangiert damit nach Covid-19 auf Platz zwei der weltweit häufigsten infektionsbedingten Todesursachen. Finanzierungsdefizite, Rückschläge in Präventions- und Diagnosemaßnahmen bedingt durch die Covid-19 Pandemie, langwierige Therapien und eine hohe Zahl Multi-Drug-resistenter (MDR) Fälle stellen die Weltgemeinschaft auch 140 Jahre nach der Erstbeschreibung des Erregers vor große Herausforderungen (62, 68, 189).

1.1.1 Pathogenese der humanen Tuberkulose

Erreger der TB-Erkrankung sind aerobe, stäbchenförmige, Gram-positive Bakterien der Familie *Mycobacteriaceae* (149). Der häufigste Erreger beim Menschen ist das intra- sowie extrazellulär vorkommende *Mykobacterium tuberculosis (Mtb)* (199). Dieses ist charakterisiert durch eine dicke, lipophile Zellwand, die sich aus drei Schichten, gebildet aus Glycerophospholipiden, Lipomannan und Lipoarabinomannan, einem Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex sowie Mykolsäuren zusammensetzt. Sie stellt somit eine sehr resistente Barriere gegenüber äußeren Faktoren dar (80). Zusätzlich bedingt ihre spezifische Struktur ein säurefestes Färbeverhalten, was eine Unterscheidung zu anderen Gram-positiven Bakterien zulässt. Auch langsame Replikationszeiten sind ein beschreibendes Merkmal des TB-Erregers. Übertragen wird er hauptsächlich über Aerosole. Werden diese eingeatmet, gelangt das Mykobakterium in die Lunge, sodass sich diese zumeist als Hauptmanifestationsort der Erkrankung erweist. Ist das Immunsystem nicht in der Lage, das Pathogen einzudämmen, kommt es nach der Erstinfektion zur primären Tuberkulose. Häufig sind hier Kinder betroffen (50).

Die meisten Infektionen laufen aber in Form von latenten TB-Infektionen stumm ab. Diese Form der TB wird von der WHO als „Stadium persistierender Immunantwort auf Stimulation mit *Mtb* Antigenen bei zugleich fehlenden klinischen Anzeichen für eine aktive Tuberkulose“ charakterisiert (71). Jahre bis Jahrzehnte nach der Erstinfektion kann es dann entweder zu einer Reinfektion mit folgender starker Immunantwort oder bei auftretender Immunschwäche beispielsweise durch HIV-Infektion oder auch Immunseneszenz zu einer Reaktivierung der Erkrankung durch im Körper persistierender Mykobakterien kommen (65, 81). Dies wird dann als post-primäre TB bezeichnet. Sowohl die primäre als auch die post-primäre TB werden als aktive Tuberkulose kategorisiert. Sie gehen mit Symptomen wie Husten, Fieber und Gewichtsverlust sowie radiologischen Zeichen wie Lymphadenopathien, Atelektasen, alveolären Konsolidierungen und Kavernen einher (156).

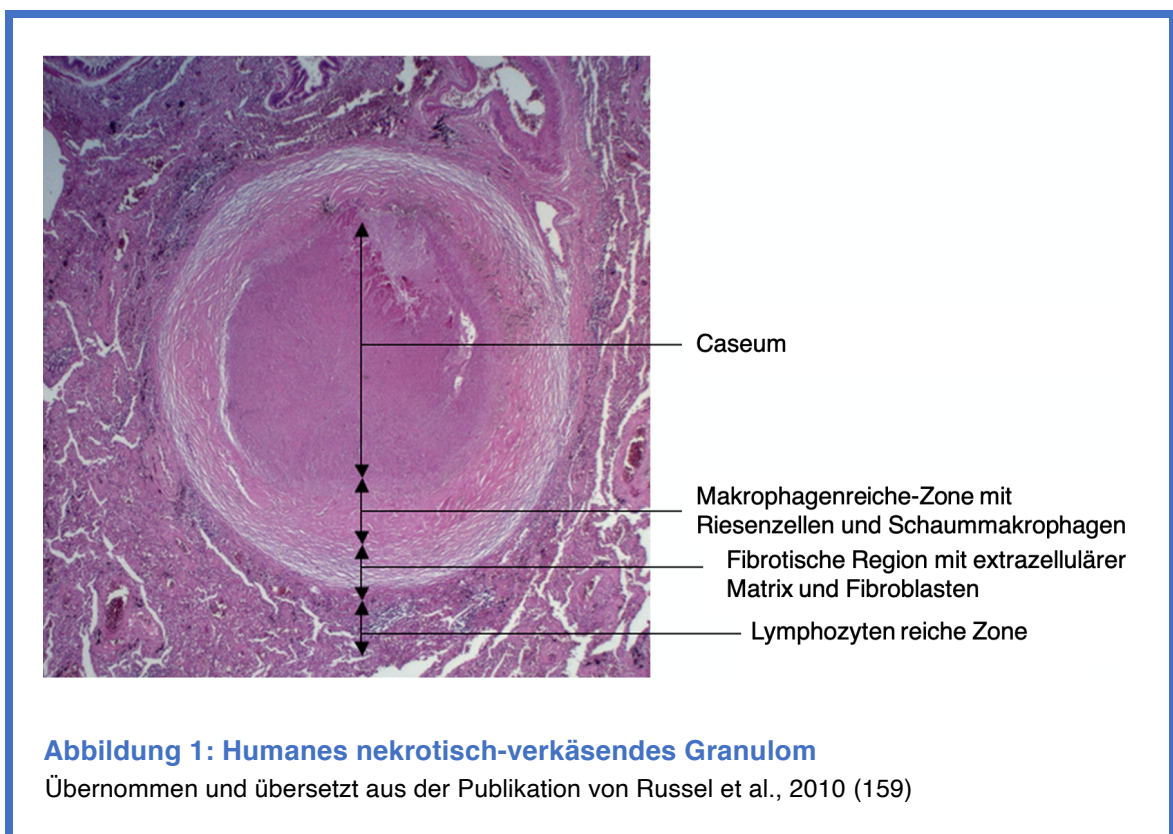
1.1.2 Das Granulom als zentrales Merkmal der TB-Infektion

Strukturen, die in jedem Stadium der Infektion auftreten können und in der Fachwelt gerne als herausstechendes pathologisches Kennzeichen betitelt werden, sind sogenannte Granulome (84, 193). Granulome sind Ausdruck einer lokalen Immunantwort des Wirtes auf den Erreger, die über eine strukturierte Ansammlung unterschiedlicher, die Lungenstruktur auflösender Immunzellen sichtbar wird (97, 173). Zur Vereinfachung und Thesengenerierung wird in der Forschung und auch hier im Folgenden gelegentlich nur von „dem Granulom“ gesprochen. Granulome stellen allerdings eine heterogene Gruppe und damit unterschiedliche Mikromilieus für den Erreger innerhalb eines Individuums dar (173). So wurden in der humanen Tuberkulose verkäsend nekrotische, nicht-nekrotische, Neutrophilen reiche, komplett fibrotische und kalzifizierte Granulome, die nebeneinander auftreten können, beschrieben (22, 94, 97). Schon 1927 arbeiteten Opie und Aronson laut Gomez und McKinney heraus, dass Homogenate aus kalzifizierten Läsionen seltener als Homogenate aus verkäsend-fibrotischen Läsionen des Lungenapex Verstorbener in der Lage waren, bei Meerschweinchen eine TB-Infektion auszulösen (65). Auch Versuche in Makaken zeigten, dass innerhalb eines Wirtes

einige Läsionen eine mykobakterielle Sterilität erreichten, während andere eine mykobakterielle Persistenz erlaubten (110).

Funktionell kann also Granulomen zum einen zugesprochen werden, ein Ort der Infektionsabwehr zu sein, an dem Immunzellen den Erreger vom umliegenden Gewebe abschirmen und es in vielen Fällen schaffen, ihn zu eradizieren (148). Hierbei ist das lokale Zusammenspiel der Immunzellen mit Chemokinen und Zytokinen wichtig (40). So führte im Mausmodell beispielsweise die Defizienz des Tumornekrosefaktors (TNF), einem proinflammatorischen Zytokin, welches gleichzeitig für die Aufrechterhaltung der Granulome wichtig sein soll, zu einem aggravierten Infektionsverlauf und frühzeitigem Versterben der Tiere (55, 98). Auch in mit *Mtb* infizierten Makaken wiesen sterile Granulome eine höhere Zahl TNF-produzierender T-Zellen auf als nicht sterile (60). Zum anderen wird Granulomen aber auch eine promykobakterielle Funktion zugeschrieben. Dementsprechend wurde immer wieder gezeigt, dass Granulome bei der humanen Infektion der Ort sein können, an dem Mykobakterien in der Latenzphase persistieren (193). Die hier entstehende These der promykobakteriellen Funktion der Granulome wurde zusätzlich durch *in vivo* und *in vitro* Versuche der letzten Jahrzehnte untermauert. Im Tiermodell wurde nachgewiesen, dass eine Granulombildung mit einer erhöhten bzw. eine fehlende Granulombildung mit einer reduzierten Zahl an Mykobakterien einhergeht (77, 139). Das Bild des Granuloms als Brutstätte wurde weiter unterstützt durch die Erkenntnis, dass Mykobakterien aktiv zur Granulombildung beitragen können. So konnte beispielsweise in einem Infektionsmodell mit Zebrafischen gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit Mykobakterien, die eine Defizienz des Virulenzfaktoren kodierenden *Region of Difference 1 (RD1)*-Lokus aufwiesen, die für Granulombildung notwendige Aggregation von Immunzellen unterblieb und sich jene eben nicht formierten (184). Auch wenn es in diese Richtung im letzten Jahrzehnt vermehrt Bestrebungen gab, wird die Aufgabe der Forschung der nächsten Jahre weiterhin sein, noch fundierter und spezifischer für die einzelnen Granulomformen herauszuarbeiten, bei welcher Zell und Zytokin Kombinationen die ein oder die andere Funktion überwiegt sowie unter welchen Bedingungen und mit welcher Dynamik dies geschieht (44, 110, 123, 173).

Neben den bisher aufgezeichneten Milieu-Unterschieden zwischen Granulomen in einem Individuum ist auch, bedingt durch den Aufbau der Granulome, von Milieu-Unterschieden innerhalb eines Granuloms auszugehen. Das nekrotische oder nekrotisch-verkäsende Granulom ist aufgrund seiner klar definierbaren Strukturen besonders umfassend in der humanen Tuberkulose beschrieben und definiert. Aus diesem Grund ist es häufig Repräsentant aller Granulome und soll auch hier genauer beleuchtet werden (72, 97, 146, 158). Wie in Abbildung 1 dargestellt, wird bei diesem Granulom ein nekrotisches Zentrum von einem Ring aus Schaummakrophagen und einzelnen Langerhans-Riesenzellen umgeben (85, 141). Um jene schließt sich eine Schicht aus Lymphozyten, die B- und T-Zell reich ist (178). Des Weiteren wird bei der Darstellung des Aufbaus gelegentlich auf eine fibrotische Kapsel verwiesen, die bei etwas reiferen Granulomen den Schaummakrophagensaum von den Lymphozyten abtrennt (76, 157, 193).



Geprägt wird diese Struktur insgesamt durch Hypoxie (11). Der entstehende Mangel an Sauerstoff muss in den Zellen des Granuloms durch Stoffwechsellanpassungen

ausgeglichen werden, was unter anderem durch die Hypoxie-induzierten-Faktoren (HIF) koordiniert wird (130).

Im humanen nekrotischen Granulom ist *Mtb* sowohl im Schaummakrophagenbereich als auch im nekrotischen Zentrum zu finden. Von einer unterschiedlichen Anpassungsreaktion des Erregers je nach Schicht kann ausgegangen werden, da sich Unterschiede bei Transkriptionsanalysen des Pathogens je nach Region dieser Granulome zeigten (51). Dies geht konform mit der Tatsache, dass Hypoxie getragene Stoffwechseleränderungen auch bei Mykobakterien bekannt sind (194). Möchte man die Wechselwirkungen zwischen Host und Pathogen im Rahmen einer TB-Infektion sinnvoll nachvollziehen und besser verstehen, sind also kleinräumige Transkriptionsanalysen, die lokale Milieu-Bedingungen einschließen, nötig.

1.1.3 Makrophagen und ihr Stoffwechsel als zentraler Bestandteil der Wirt-Pathogen-Interaktion

Makrophagen und ihr Stoffwechsel haben in der TB-Forschung, wenn es um Granulome und die Wirt-Pathogen-Interaktion geht, besondere Aufmerksamkeit erlangt. Dies basiert unter anderem auf einer gängigen, durch *in vitro* und *in vivo* Versuche untermauerten Granulom-Entstehungsskizze, die die Interaktion von Makrophagen und Mykobakterien in den Vordergrund stellt: Gelangt der Erreger in die Lunge, wird er von alveolaren Makrophagen aufgenommen und ins Interstitium transportiert (30). Innerhalb der Makrophagen schafft es der Erreger, der Abtötung zu entgehen und sich zu replizieren (154). Von Makrophagen ausgeschüttete Chemokine rufen dann ein Herbeiströmen weiterer Immunzellen wie NK-Killerzellen, Neutrophile und aktivierten T-Zellen hervor, was zur Bildung der Granulome beiträgt (44).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Mykobakterien nicht nur in Makrophagen überleben können, sondern auch den Stoffwechsel dieser beeinflussen. Gehäuft wird hier argumentiert, dass Mykobakterien diesen zu ihren Gunsten in eine lipogenetische Richtung drücken und hierdurch ein für sie

vorteilhaftes Milieu schaffen. Letztendlich beeinflussen aber auch hier wieder lokale und dynamische Vorgänge das Resultat der Interaktion. Vielfach wurde mittlerweile bewiesen, dass die Infektion von Makrophagen mit *Mtb* eben jene schaumartige Morphologie, wie sie sich bei Makrophagen im nekrotischen Granulom zeigt, hervorruft (141, 142). Ein Charakteristikum dieser Morphologie ist eine Ansammlung von Lipidtröpfchen, welche einen Speicherort für Lipide darstellen und Ausdruck einer lipogenetischen Stoffwechsellage sind (141, 186). Diese entstehen mutmaßlich über eine Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) durch mykobakterielle Bestandteile. So führte eine Infektion mit *M. bovis* in murinen peritonealen Makrophagen zu einer gesteigerten Expression des Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptor- γ (PPAR γ) sowie zu einer damit einhergehenden Lipidtröpfchenbildung. In Makrophagen von TLR2-Knockout-Mäusen war beides deutlich reduziert (4). PPAR γ ist ein Kernrezeptor, dem zugesprochen wird, in der Tuberkuloseinfektion neben der Speicherung von Lipiden eine Bedeutung bei der Aufnahme von diesen zu spielen (117). Hervorgerufen wird eine lipogenetische Stoffwechsellage auch durch das Protein *Early Secreted Antigenic Target 6 (ESAT-6)*. Dieser unter dem *RD1*-Lokus kodierte Virulenzfaktor von *Mtb* führte nach einer Zugabe zu Zellen einer Zelllinie aus humanen Monozyten (THP1) zu einer vermehrten Glucoseaufnahme mit nachfolgender Glykolyse und der Bildung von Stoffwechselprodukten, die für den Aufbau von Triacylglycerolen (TAG) essenziell sind (57, 166). TAG sind ein wichtiger Bestandteil von Lipidtröpfchen. Dass *Mtb* intensiv mit diesem lipidreichen Milieu interagiert, bewiesen elektronenmikroskopische Aufnahmen. Hier konnte bei infizierten, sich aus peripheren mononukleären Blutzellen (PMBC) differenzierenden Makrophagen gezeigt werden, dass Mykobakterien in Schaummakrophagen in unmittelbarer Nähe zu Lipidtröpfchen vorzufinden sind und mit diesen interagieren (141). Auch konnte mittels radiomarkierter TAG bewiesen werden, dass in Makrophagen residierende Mykobakterien TAG des Wirtes aufnehmen und in den eigenen Lipidstoffwechsel einpflegen (31). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass ein lipidreiches Milieu neben Hypoxie dazu beitragen kann, dass Mykobakterien in ein Stadium der Dormanz, geprägt von reduzierter Replikation, verminderter Stoffwechselaktivität und Resistenz gegenüber Antituberkulostatika übergehen

(113, 147, 151). Lipidreichtum kann dabei zur einer Abschwächung von durch Hypoxie ausgelöstem, transkriptionellen Stress im Mykobakterium beitragen (35). Eine Studie von Knigth et al. aus dem Jahr 2018 konterkariert dieses oft gezeichnete Bild der gezielten vorteilhaften Einflussnahme durch *Mtb* und akzentuiert, dass auch mit Blick auf den Lipidstoffwechsel letztendlich die lokale Zell- und Zytokinkonstellation von prägender Bedeutung sein wird. So zeigten die Autor*innen *in vitro*, dass bei der Stimulierung durch das Zytokin Interferon- γ (IFN γ) in aus Knochenmark stammenden Makrophagen (*BMDM*) intrazelluläre Mykobakterien trotz vermehrter Lipidtröpfchenbildung durch den Wirt scheinbar weniger in der Lage waren, Lipide aufzunehmen bzw. zu bilden, als in nicht stimulierten infizierten Makrophagen (99). Auch mit Blick auf den Lipidstoffwechsel und seine Bedeutung in der Wirt-Pathogen-Interaktion ist demnach der lokale Blick zum vertiefenden Erkenntnisgewinn wichtig.

1.1.4 Die IL-13-überexprimierende Maus, ein TB-Tiermodell voll unerforschter Potenziale

Nicht alle Aspekte der Erkrankung können am Mensch selbst untersucht werden, was die Etablierung und Verwendung guter Modelle erfordert. Da die meisten humanen Proben der vergangen 50 Jahre aus chirurgischen Resektionen stammen, stellen sie selten die gesamte Pathologie einer infizierten Lunge dar und kommen häufig von Individuen, die schon eine intensive antimykobakterielle Therapie erhalten haben (84). Viel des vorhandenen Wissens und viele der vorherrschenden Theorien über die Erkrankung und ihren Verlauf beruhen deshalb auf Modellen. Problematisch bei der Verwendung von Modellen ist allerdings, dass *Mtb* ein obligat humaner Parasit ist und sich der gesamte Infektionsverlauf in einem Individuum bis zur letztendlichen Transmission des Pathogens an andere Individuen nur im Menschen abspielt (84). Tiermodelle können so meist nur einzelne Aspekte der Erkrankung repräsentieren und müssen gründlich auf ihre Aussagekraft untersucht werden.

Als aussichtsreiches Tiermodell zur Erforschung der TB-Pathologie hat sich die IL-13-überexprimierende Maus, im Folgenden IL-13^{tg} Maus genannt, herauskristallisiert. Ihr volles Potenzial in einem TB-Infektionsmodell ist aber bisher noch wenig elaboriert. Das Tiermodell Maus profiliert sich gegenüber anderen etablierten Infektionsmodellen an nicht-menschlichen Primaten, Kaninchen und Meerschweinchen aufgrund einer Vielzahl vorhandener molekularer und immunologischer Werkzeuge bei gleichzeitig geringem Platzbedarf in der Haltung. Das TB-Infektionsmodell der IL-13^{tg} Maus sticht gegenüber Wildtypmäusen vor allem mit Blick auf die Pathologie innerhalb der Lunge aber noch einmal besonders hervor. IL-13^{tg} steht hier für einen transgenen (tg) Maustyp, in den ein genomisches Fragment des Interleukin-13 (IL-13) zusammen mit einer humanen CD2 Lokus Kontrollregion transferiert wurde (45). Bei einer Infektion mit *Mtb* kommt es dadurch, anders als in Wildtypmäusen, zu einer verstärkten Ausschüttung von IL-13 durch aktivierte T Zellen des Subtyps 2 (Th2) und damit zur einer ausgeprägten adaptiven Immunantwort (77). Eine Antwort der Zellen des Subtyps 1 (Th1) setzt dann etwas verzögert ein, ist aber auch messbar. Eine starke Th2 Antwort wurde im Menschen mit einer postprimären Tuberkuloseinfektion in Verbindung gebracht (86, 155). Desweiteren zeigte eine Untersuchung an einer Kohorte von TB-Patient*innen in Ghana, dass die Entwicklung einer ausgeprägten Lungenpathologie mit der Rezeptoruntereinheit IL-4R α in Verbindung gebracht werden kann (79). So zeigt sich dann auch, dass IL-13^{tg} Mäuse im Verlauf einer Infektion mit *Mtb* vermittelt über die Rezeptoruntereinheit IL-4R α strukturierte Granulome entwickeln, während Wildtypmäuse lediglich unstrukturierte Läsionen bilden (77). Diese strukturierten Zellansammlungen gleichen in ihrem Aufbau den humanen nekrotischen Granulomen, wie sie in Kapitel 1.1.2. beschrieben wurden. Um ein nekrotisches Zentrum legt sich also ein lipidreicher Schaummakrophagensaum, welcher durch eine fibrotische Kapsel von umliegenden Lymphozyten und mehrkernigen Langhans-Riesenzellen getrennt wird (77). Diese Struktur weist zusätzlich hypoxische Areale auf. Innerhalb dieser Granulome sind Mykobakterien, der Situation im humanen Granulom gleichend, sowohl im Schaummakrophagensaum als auch im nekrotischen Zentrum detektierbar (52). Im ersteren zeigen sie sich intrazellulär, im letzteren auch extrazellulär (185). Neben diesen nekrotischen

Granulomen wurden auch unstrukturierte Läsionen in der IL-13^{tg} Maus beschrieben. Ob diese eigenständige Entitäten oder Vorläufer der nekrotischen Granulome darstellen, ist an diesem Punkt nicht klar (76). Bei der Erstbeschreibung dieses Infektionsmodells und der dazu durchgeführten Untersuchung an Lungenhomogenaten wurde gezeigt, dass die Bildung dieser Granulome mit einem starken Anstieg der Expression von Arginase-1 und dem der Bakterienlast verbunden war. Die Expression von Arginase-1, auch zytosolische Arginase genannt, wird durch Th2 Zytokine IL-4 und IL-13 induziert. Sie gilt deshalb auch als Marker für alternativ aktivierte Makrophagen (129). Ihre Stoffwechselprodukte tragen zur Kollagenbildung und damit zum Aufbau der fibrotischen Kapsel bei (111, 128). Hierdurch geht sie in einen Substrat-Wettbewerb mit Stickoxid-Synthasen (NOS) (126, 127). Die induzierbare NOS (iNOS), auch NOS2 genannt, die vor allem bei der Tuberkuloseinfektion eine Rolle spielt, wird in klassisch aktivierten Makrophagen unter anderem durch das Th1 Zytokin IFN γ aktiviert (28, 102, 116). Da ihr zugesprochen wird, über ihre Produkte antimykobakteriell zu wirken, könnte die Substrat-Konkurrenz der zwei Enzyme der Grund dafür sein, warum die Expression von Arginase-1 das Überleben von Mykobakterien in der IL-13^{tg} Maus begünstigt (28, 76, 91). Eine starke Expression von Arginase-1 wurde im Schaummakrophagensaum der nekrotischen Granulome der IL-13^{tg} Mäuse aufgezeigt. Dieser Nachweis erfolgte aber bisher rein immunhistochemisch. Ebenso wurde histologisch gezeigt, dass das strukturierte Granulom der IL-13^{tg} Maus ein insgesamt sehr lipidreiches Milieu darstellt (76). Weitere Analysen der Stoffwechsellage, die sich rein auf das Granulom bezogen, unterblieben bisher.

In zwei Anfang 2022 erschienenen Publikationen von Kokesch-Himmelreich et al. und Walter et al. konnte gezeigt werden, dass sich die IL-13^{tg} Maus aufgrund ihrer Pathologie sehr gut für Antibiotikapenetrationsstudien eignet (100, 185). Auch für Analysen der verschiedenen entstehenden Milieus und damit Stoffwechsellagen des Wirtes, aber auch des Pathogens innerhalb eines nekrotischen Granuloms könnte diese Maus also ein gutes Modell darstellen. Eine validierende, tiefergehende Analyse, die über histologische Beschreibungen und damit die Betrachtung des Proteoms bzw. Lipidoms hinausgeht, steht hierfür aber noch aus.

Differenzierte Transkriptomanalysen am Granulom der IL-13^{tg}, die weitere Rückschlüsse über Milieus und die Vergleichbarkeit mit humanen Granulomen zulassen würden, wurden noch nicht durchgeführt.

1.2 Methodik zur räumlich differenzierenden Analyse infizierter Gewebeschnitte

1.2.1 Fixierung als Prämisse für die Arbeit außerhalb des BSL3-Labores

Aufgrund der Infektiosität des Erregers ist es indiziert, Aerosolinfektionsversuche von Nagetieren mit *Mtb* in Laboren der biologischen Schutzstufe 3 (BSL3) durchzuführen (92). Versuchstechnisch komplexer ist hierbei, dass oft aus logistischen Gründen Folgeanalysen bei größeren Apparaten außerhalb des BSL3-Labores stattfinden müssen. Vor dem Ausschleusen des zu untersuchenden, organischen Materials aus dem Labor muss demnach ein Arbeitsschritt erfolgen, der ein Abtöten der Mykobakterien sicherstellt (78). Es muss also eine Fixierung vorgenommen werden, deren Aufgabe über die normalen Ansprüche an eine solche, sprich die Verhinderung zellulärer Autolyse und den Erhalt der Morphologie, hinausgeht (138). Wichtig ist aus sicherheitstechnischen Gründen hierbei, dass die Wahl der Fixierungen nicht allein auf Literaturrecherchen beruhen, sondern für jeden Bakterienstamm einzeln und laborintern validiert werden (135, 15). Sollen in der Folge Transkriptomanalysen stattfinden, sollte eine *Mtb* abtötende Fixierung gleichzeitig möglichst wenig Einfluss auf die RNA und ihre Isolation haben. RNA ist äußerst labil und kann leicht durch äußere Faktoren degradiert oder fragmentiert werden. Auch ubiquitär vorhandene RNasen können schnell zu einem Abbau der RNA beitragen. Jeder Arbeitsschritt, der im Rahmen einer RNA-Gewinnung angewendet wird, sollte deshalb auf sein RNA-degradierendes Potenzial geprüft werden.

Zur unmittelbaren Gewebefixierung nach Organentnahme sind die Formalin-Fixierung mit anschließender Paraffin-Einbettung (FFPE) und die Kryokonservierung weit verbreitet. Bei der ersten Technik kann die Aufgabe der

Mtb-Abtötung durch eine Einwirkzeit von einer Stunde bei 4°C durch eine wässrige Lösung von Formaldehyd, auch Formalin genannt, übernommen werden (115). Diese Art der Fixierung erhält die Morphologie des untersuchten Gewebes besonders gut. Bei der Kryokonservierung, bei der das Gewebe mittels Stickstoff eingefroren wird, wird die Morphologie weniger gut erhalten. Allerdings wurde gezeigt, dass die Gewinnung von RNA aus diesem Gewebe gegenüber FFPE behandeltem mit qualitativ hochwertigeren Ergebnissen verbunden ist (191). Da eine Kryokonservierung allein nicht zu einer Abtötung der Mykobakterien führt, muss hier eine zusätzliche Strategie angewendet werden. An Kryoschnitten zeigten sich die Anwendung von Gamma-Irradiation und Hitze-Sterilisation bei 100°C erfolgreich (188, 200). Während die erste Variante spezielle Geräte benötigt und aus diesem Grund wenig praktikabel ist, wird die zweite auch verwendet, um RNA zu degradieren (26). Ebenfalls wurde berichtet, dass eine Behandlung von infiziertem Gewebe in einer herkömmlichen Mikrowelle zu einer Abtötung des Erregers führen kann (41). Hierbei dürften aufgrund der Hitzeentwicklung aber ebenfalls RNA degradierende Prozesse ablaufen. Gleichfalls ist es möglich, auch an Kryoschnitten wenig ressourcenintensiv und platzsparend organisch-chemische Lösungen zur Erregerabtötung zu verwenden. Die oben erwähnte Formalin-Lösung kann dabei unabhängig von einer folgenden Paraffin-Einbettung Anwendung finden. Allerdings hat nicht nur die Paraffin-Einbettung Auswirkungen auf die RNA-Qualität (47). Im Gegenteil ist hinlänglich bekannt, dass vor allem Formalin fragmentierende Eigenschaften besitzt (167). Andere organisch-chemische Lösungen sind Alkohole. Alkoholen wird nicht nur eine RNA präservierendere Eigenschaft zugeschrieben, sondern insbesondere Ethanol (EtOH) und dem mit morphologisch besseren Ergebnissen verbundenen Methanol (MeOH) auch ein antimykobakterieller Effekt (25, 61, 132, 187). Beide Alkohole könnten sich damit als Fixierung, die das Kriterium der *Mtb*-Abtötung bei gleichzeitiger Präservierung der RNA erfüllt, als vorteilhafter gegenüber Formalin erweisen. Untersuchungen, die diese zwei Aspekte miteinander in Bezug setzen, konnten aber nicht gefunden werden.

1.2.2 Laser-Mikrodissektion in der TB-Forschung – Räumlich differenzierende Probengewinnung aus Gewebeschnitten

Eine Methode, die eine differenzierte Analyse erlaubt, ist die *Laser Capture Microdissection (LCM)*. Hierbei können unter einem Mikroskop mittels Laserenergie genau definierte Bereiche von Gewebeschnitten herausgetrennt werden. Durch eine Impulsenergie werden diese dann kontaktfrei in den Deckel eines Reagenzgefäßes katapultiert. Nachfolgend können an den so gesammelten Zellen selektive Genom-, Transkriptom- und Proteom-Analyseverfahren durchgeführt werden (34). Zugleich ermöglicht die *LCM* eine Probenakquise für differenzierte, quantitative Vergleiche unterschiedlicher Regionen innerhalb eines Gewebes mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) (46).

In der TB-Forschung wurde die Methodik der *LCM* bereits angewendet, um in Material von TB-Patient*innen, Wildtypmäusen oder Meerschweinchen Mykobakterien zu detektieren oder Genexpressionsanalysen mittels qPCR bzw. Microarrays vorzunehmen (24, 33, 82, 97, 115, 162, 198). Die meisten Protokolle verwendeten Schnitte aus FFPE-Gewebe. Die Beschreibung der Verarbeitung von Laser dissektierten Kryoschnitten in der TB-Forschung wurde nur in zwei Protokollen gefunden. Zum einen wurde ein solches für die *LCM* gekoppelt an Flüssigkeit-Chromatografie-Massenspektrometrie bei Antibiotikakonzentrationsstudien nach einem Protokoll von Zimmermann et al. ausgearbeitet (200). Zum anderen zeichneten Kim et al. ein Protokoll auf, bei dem Kryoschnitte von humanen Lungen in 4% Paraformaldehyde (PFA), einem Polymer des Formaldehyds, fixiert und die hieraus gewonnenen Proben mittels Microarray untersucht wurden (97). Trotz des mutmaßlich bestehenden Vorteils von Alkoholen mit Blick auf die RNA-Qualität, zeigte sich die Suche nach Protokollen für Genexpressionsanalysen zur Analyse der Stoffwechsellage nach *LCM* von *Mtb*-infizierten, mittels Alkoholen fixierten, kryokonservierten Materials erfolglos. Ein stärkerer Fokus auf einen Erhalt der RNA ist aber vor allem dann sinnvoll, wenn nur wenig Gewebematerial zur Verfügung steht. Bei Untersuchungen an Granulomen der IL-13^{tg} Maus ist dies aufgrund der geringen Granulomgröße bedeutsam der Fall.

1.3 Ziele und Struktur der Arbeit

Die in einer TB-Infektion entstehenden Granulome stellen einen Ort intensiver Wirt-Pathogen-Interaktion dar. Ihre Morphe und Funktion ist dabei auch innerhalb eines Individuums heterogen und noch nicht vollständig verstanden. Auch im Inneren eines Granuloms kann es getragen, bedingt durch Hypoxie und Lipidmetabolismus, zu Milieu-Unterschieden kommen, die unterschiedliche Anpassungsreaktionen des Erregers hervorrufen. Auch hier sind noch viele Fragen und die Pathomechanismen ungeklärt. Die IL-13^{tg} Maus bildet, anders als Wildtypmäuse, in ihrer Lunge nekrotische Granulome, die den humanen Granulomen ähneln. Sie könnte damit ein gutes Tiermodell für die Erforschung jener Milieu-Unterschiede darstellen. Tiefergehend differenzierte und validierende Beschreibungen der vorkommenden Stoffwechsellagen stehen aber noch aus. Ziel dieses Projektes ist es deshalb, über Transkriptomanalysen einen Schritt in diese Richtung beizutragen. Hierzu soll an kryokonservierten Lungenschnitten *Mtb*-infizierter IL-13^{tg} Mäuse die *Laser Capture Microdissection*, die es erlaubt, lokal differenzierende Probenakquise zu betreiben, in einem Arbeitsablauf etabliert werden. Da das Schneiden am Kryotom der letzte Schritt ist, der in den BSL3-Räumlichkeiten des FZB stattfinden kann, muss vorab eine Fixierung der Kryoschnitte gefunden werden, die zum einen eine Abtötung des Erregers sicherstellt und zum anderen möglichst wenig Einfluss auf die RNA nimmt, die aus den Proben gewonnen werden soll. Der in Abbildung 2 dargestellten Struktur folgend sollen in dieser Arbeit also sequentiell die zwei nachstehenden Fragen (methodischer und inhaltlicher Art) beantwortet werden:

- Ist es möglich, eine Methode zu etablieren, bei der aus organisch-chemisch fixierten, kryokonservierten Gewebeschnitten von mit *Mtb* infizierten IL-13^{tg} Mäusen mittels *LCM* differenziert RNA gewonnen wird, die quantitative Analysen der Stoffwechsellage erlaubt?
- Lässt sich diese Methodik anwenden, um weitere Rückschlüsse auf die Stoffwechsellage in verschiedenen Granulomtypen (strukturierte nekrotische und unstrukturierte Läsionen) und Bereichen innerhalb eines strukturierten, nekrotischen Granuloms der IL-13^{tg} Maus zu ziehen?

1

Etablierung der Methodik

Welche organisch-chemischen Fixierung für Lungen-Kryoschnitten tötet effektiv den verwendeten *Mtb*-Stamm H37Rv ab?

- Fixierung mittels 4% Paraformaldehyd bei 4°C
- Fixierung mittels 100% Methanol
 - Austestung des Einflusses unterschiedlicher Fixierungszeiten

Ist die RNA-Isolation trotz Fixierung weiterhin möglich?

- Vergleich zweier von der Firma Zeiss* für die Isolation von RNA aus Laser mikrodissektierten Proben empfohlener Kits
- Qualitätsbeurteilung der gewonnenen RNA mittels NanoDrop und mittels qPCR über die Bestimmung der Genexpression des Haushaltsgens *Hprt*

Welche Fixierung ist mit Blick auf die RNA-Qualität am geeignetsten, wenn nach der Fixierung eine Probenakquise mittels *LCM* erfolgt?

- Wie in Schritt zwei Verwendung von uninfiziertem Lungen- und Nierengewebe; gleiches Vorgehen nur Probengewinnung mittels *LCM*
- Färbung der zu mikrodissektierenden Gewebeschnitte mittels Kresylviolett, wie von der Firma Zeiss empfohlen

2

Anwendung der Methodik an Gewebeschnitten der IL-13^{tg} Maus

➢ Erste inhaltliche Rückschlüsse

Kann aus fixierten Lungenschnitten infizierter IL-13^{tg} Mäuse RNA gewonnen werden, die Rückschlüsse auf die Stoffwechsellage in verschiedenen Bereichen / Mikromilieus zulässt?

- Zur Abdeckung der Heterogenität der Pathologie und Etablierung der Methodik für verschiedene Granulomtypen: Fokus auf strukturierte, nekrotische Granulome und unstrukturierte Läsionen
- Zur Identifikation der Strukturen Anfertigung von Vergleichsschnitten:
 - Ziehl-Neelsen-Färbung zur Demarkierung von Mykobakterien
 - Trichromfärbung zur Demarkierung der fibrotischen Kapsel
 - CD68⁺-Färbung und Arginase-1 Färbung zur Detektion von Makrophagen
 - Ölrot-O Färbung zur Beschreibung des Lipidstatus
- Genexpressionsanalysen im Rahmen von qPCR-Analysen der Gene von CD68⁺ und Arginase-1 sowie der Genen *Acc2*, *Plin2*, *Dgat2*, *Fabp3* und *Acs14*, welche in den Lipidstoffwechsel involviert sind
- Qualitätskontrollen der gewonnenen RNA mittels Bioanalyzer

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Arbeit

2.1.1 Mäuse

Die Züchtung der in dieser Arbeit verwendeten Mäuse (Tabelle 1) erfolgte unter spezifischen pathogen-freien Bedingungen in der Tierhaltung des Forschungszentrums Borstel. Alle Versuchstiere waren frei von bakteriellen, parasitären und viralen Infektionen. Separat belüftete und mit speziellen Filtern ausgestatteten Käfige (IVC-Käfigen) im BSL-3 Labor des Forschungszentrums dienten zur Haltung infizierter Tiere. Kryokonserviertes Lungen- und Nierenmaterial, welches zur Etablierung der Methodik diente, stammte von gesunden, überschüssigen Mäusen aus der Zucht des Forschungszentrums Borstel. Material, welches zur Untersuchung der Stoffwechsellage in verschiedenen Granulomtypen und Bereichen mittels Laser-Mikrodissektion und zur Untersuchung der Effektivität der *Mtb*-Inaktivierung unterschiedlicher organisch-chemischer Fixierungen verwendet werden sollte, stammte von Versuchsreihen mit IL-13^{tg} Mäusen aus dem Jahr 2016. Diese waren vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holsteins mit der Nummer 69-6/16 aus dem Jahr 2016 genehmigt worden. In diesen Versuchsreihen wurden beginnend ab Tag 42 nach Infektion vier bis fünf Tiere im Abstand von sieben Tagen getötet und ihre Organe entnommen. Der linke Lungenlappen wurde dabei in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, der rechte wurde kryokonserviert. 2019 wurden zur Untersuchung der Effektivität der *Mtb*-Inaktivierung unterschiedlicher organisch-chemischer Fixierungen aus einer Versuchsreihe kryokonservierte Lungenlappen gewählt, die aufgrund einer Vielzahl an makroskopisch sichtbaren Granulomen versprochen, eine hohe Anzahl an Mykobakterien aufzuweisen. Zur Untersuchung der Stoffwechsellage in verschiedenen Granulomtypen und Bereichen mittels Laser-Mikrodissektion wurden vier Tiere aus einer anderen Versuchsreihe vom Zeitpunkt d(49) und d(56) bzw. d(100) und d(107) gewählt, deren Lungen in angefertigten Paraffinschnitten vor allem unstrukturierte Läsionen (Zeitpunkt d(49/56)) bzw. viele strukturierte Granulome (Zeitpunkt d(100/107)) zeigten. Von

diesen Tieren wurden die kryokonservierten Lungenlappen für die Laser-Mikrodissektion mit anschließender Genexpressionsanalyse aufbereitet. Als Negativkontrollen für die im Jahr 2019 durchgeführten Versuche dienten vier uninfizierte IL-13^{tg} Mäuse mit dem gleichen genetischen Hintergrund. Es handelte sich hier wieder um überschüssige Mäuse aus der Zucht des Forschungszentrums.

Tabelle 1: Mäusestämme

Mausstamm	Genetischer Hintergrund	Referenz
IL-13 ^{tg}	BALB/c	(76)
IL-13 ^{tg}	C57BL/6	
C57BL/6	C57BL/6	

2.1.2 Bakterien

Die Kultivierung von *M. tuberculosis* (H37Rv) bis zur mittleren logarithmischen Phase wurde von Silvia Maass im Forschungszentrum Borstel (FZB) in OADC (Oleinsäure, Albumin, Dextrose, Katalase) supplementiertem Middelbrook 7H9 Medium durchgeführt. Bis zur Anwendung erfolgte ein Einfrieren bei -80°C.

2.1.3 Aerosolinfektion

Vor Infektion der Mäuse mit *Mtb* erfolgte eine Separation in speziellen Aerosolkäfigen. Diese wurden dann in einem Inhalationssystem installiert. Zur Erreichung einer Infektionsdosis von ca. 100 Kolonien bildenden Einheiten (KBE) pro Maus wurde die verwendete Bakteriensuspension auf $2,5 \times 10^6$ *Mtb* in einem Endvolumen von 6 ml Aqua B. Braun adjustiert. Um etwaige Bakterienaggregate aufzulösen, folgte eine Resuspension der Stammlösung durch 10-maliges Aufziehen und Entlassen mit einer 26G-Kanüle. Von dieser Suspension wurden dann zur Kontrolle der Konzentration 0,5 ml in einer seriellen Verdünnung (1:10) auf Rinderserum supplementierten 7H10 Agarplatten (10% Rinderserum) ausplattiert. Die restlichen 5,5 ml des Gemisches wurden in das Vernebelungsgefäß gegeben. Zur Aerosolinfektion wurde der Durchfluss des Hauptluftstroms auf 60 CFH (Kubikfuß pro Stunde, 1,68 m³/h) und der Durchfluss der Kompressionsluft zur

Vernebelung der Infektionslösung, auf 11 CFH ($=0,28 \text{ m}^3/\text{h}$) eingestellt. Nach 900 Sekunden Aufwärmzeit, 2400 Sekunden Vernebelungszeit, 2400 Sekunden Absaugzeit und 900 Sekunden Dekontaminationszeit, wurden die Mäuse aus dem Gerät entnommen und zurück in IVC-Haltungskäfige überführt. Vier der infizierten Tiere wurden zur Kontrolle der tatsächlichen Infektionsdosis verwendet. Hierfür wurden einen Tag nach der Infektion ihre Lungen komplett isoliert, auf acht Platten ausplattiert und die Keimlast nach drei Wochen bestimmt. Eine Übersicht über die bei der Aerosolinfektion verwendeten Materialien und Geräte ist in Tabelle 2 zu finden.

Aerosolkäfigen	Marine & Industrie Technik, Hamburg
Aqua B. Braun	Braun, Melsungen (D)
Inhalationssystem	Glas-Col®, Terre Haute (USA)
Agarplatten	
10% Rinderserum	Biowest, Nuaille (F)
5ml Glycerin	Applichem, Iowa (USA)
19g Difco™ Middlebrook 7H10	Otto Nordwald, Hamburg (D)

2.1.4 Organaufbereitung

Nach der Tötung der zu untersuchenden Mäuse durch CO_2 -Inhalation erfolgte die Entnahme von Lunge bzw. Milz. Vor der Überführung in ein mit Neg-50 aufgefülltes Tissue-Tek Cyromold wurden die Lungenlappen mit 1:3 Neg-50/PBS aufgepumpt. Bei der Milz wurde auf dieses Prozedere verzichtet. Hierauf folgte ein Einfrieren der eingebetteten Organe mit stickstoffgekühltem Methylbutan für 20-30 Sekunden. Die Lagerung erfolgte dann bei -80°C .

Sollte eine Einbettung der Organe in Paraffin erfolgen, wurden diese nach der Entnahme vorerst 24 Stunden in 4% Formalin fixiert und anschließend in einem Autotechnicon in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (45 Minuten 50% Alkohol; 45 Minuten 70% Alkohol; 45 Minuten 95% Alkohol; 135 Minuten 100% Alkohol; 135 Minuten Intermedium). Hierauf wurden die Organe für 2 Stunden in

Paraffin bei 65°C vorinkubiert und darauffolgend in einer Paraffingießstation bei 65°C mit flüssigem Paraffin umgossen. Vollständig ausgehärtet konnten die Paraffinblöcke bei 4°C aufbewahrt werden. Eine Übersicht über die bei der Organaufbereitung verwendeten Materialien ist in Tabelle 3 zu finden.

Alkohol	CMP Walter, Kiel (D)
Aqua B. Braun	Braun, Melsungen (D)
SHANDON Hypercenter XP	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
CO ₂ , 100%	Hausanschluss
Freezing Medium NEG-50	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Invitrogen™ PBS (10x), pH7.2 Gebrauchslösung: 1:10 PBS in Aqua B. Braun	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Leica EG 1140C	Leica, Nussloch (D)
2- Methylbutan	Merck, Darmstadt (D)
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Stickstoff	Hausanschluss
Tissue-Tek® Cryomold	Sakura Finetek, Tokio (JP)

2.2 Anfertigung von Gewebeschnitten

2.2.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Der Gewebekblock wurde zunächst mit 10 µm Schnitten bis zum Erreichen der Organe angeschnitten. Nun wurden 2 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Um Falten zu verhindern, wurden jene nach dem Schneiden in ein kaltes Wasserbad gegeben. Anschließend wurden sie in einem 37-40°C warmen Wasserbad gestreckt und auf einen Objektträger überführt. Über Nacht wurden sie dann bei 37°C auf einer Heizplatte getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei

Raumtemperatur aufbewahrt. Eine Übersicht über die bei der Anfertigung von Paraffinschnitten verwendeten Materialien und Geräte ist in Tabelle 4 zu finden.

Heizplatte	Medax, Kiel (D)
Objekträger SuperFrost® Plus	R.Langenbrink, Emmendingen (D)
Wasserbad GFL1052	GFL, Burgwedel (D)

2.2.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Vor dem Anfertigen der Gefrierschnitte wurde die Kammer des Kryotoms auf -24°C runtergekühlt und die Proben in dieser aus -80°C kommend aufgewärmt. Hiernach wurden die Proben mit Hilfe von Neg50 auf dem Objekthalter des Kryotoms fixiert. Anschließend wurden $10\ \mu\text{m}$ (nur bei Fixierungsversuche) bzw. $12\ \mu\text{m}$ dicke Gefrierschnitte runtergeschnitten. Das Aufziehen erfolgte auf an der Rückseite mit der Fingerbeere erwärmte Objektträger. Schnitte, die für die Laser- Mikrodisektion vorgesehen waren, wurden auf vorher für 30 Minuten unter UV-Licht aktivierte Membran Slides aufgezogen, alle anderen auf Super Frost Objektträger. Bei Gewebe, das sowohl mikrodisektiert als auch speziellere Färbungen erhalten sollte, wurde jeder vierte Schnitt auf einen Super Frost Objektträger aufgezogen. Schnitte, an denen lediglich ein Fixierungsvergleich ohne Mikrodisektion stattfinden sollte, wurden nicht auf einen Objektträger aufgezogen, sondern direkt in ein Reagenzgefäß gegeben. Eine Übersicht über die bei der Anfertigung von Gefrierschnitten verwendeten Materialien und Geräte ist in Tabelle 5 zu finden.

Tabelle 5: Materialien Gefrierschnitte

Freezing Medium NEG-50	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Kryotom CM 1850	Leica, Wetzlar (D)
MembranSlide NF 1.0 PEN Rnasefree	Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen (D)
Objekträger SuperFrost® Plus	R.Langenbrink, Emmendingen (D)

2.3 Fixierung

Frisch geschnittene, auf Objektträger gezogene Kryoschnitte wurden direkt in die zum Teil in den Glasküvetten vorgekühlten Fixierungslösungen gegeben. Die Fixierung erfolgte in 100% Methanol (MeOH) bei 4°C bzw. Raumtemperatur für zwei bzw. vier Stunden oder in 4% Paraformaldehyde bei Raumtemperatur für eine Stunde (Tabelle 6). Schnitte, die für die CD-68⁺-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung und die Trichromfärbung vorgesehen waren, wurden bei -80°C eingefroren. Jene, die mit Kresylviolett gefärbt werden sollten, wurden direkt weiterverarbeitet. Bei Proben, die nicht mikrodisektiert, sondern lediglich fixiert wurden, um Fixierungsvergleiche vorzunehmen, wurde die Fixierungslösung direkt auf den in ein Reagenzgefäß gegebenen Gewebeschnitt pipettiert und nach der entsprechenden Zeit die Fixierungslösung wieder abgenommen.

Tabelle 6: Materialien Fixierung

Methanol, ROTIPURAN® ≥99,9 %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth, Karlsruhe (D)
4% Paraformaldehyde	Morphisto, Frankfurt (D)

2.4 Überprüfung der Inaktivierung von *Mtb* in Lungen-Kryoschnitten durch vorangegangene Fixierung

Die Überprüfung der erfolgreichen Fixierung *Mtb*-infizierter Lungenschnitte von Versuchstieren und damit die Inaktivierung des Mykobakteriumwachstums erfolgte auf zweierlei Art. Zum einen wurden mit Rinderserum supplementierte 7H10

Agarplatten (10% Rinderserum), zum anderen Mykobakterielles-Wachstum-Indikator-Röhrchen (*MGIT*) beimpft. Pro Fixierung und Bebrütungsmethode wurden mindestens zwei separate Durchgänge mit jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten nicht fixierte, uninfizierte als Positivkontrollen nicht fixierte, infizierte Lungenschnitte. Die bei diesen Versuchen verwendeten Materialien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

2.4.1 MGIT

Pro *MGIT*-Röhrchen wurde ein Objektträger mit drei Gewebeschnitten verwendet. Zu allererst wurden diese angetaut und dann jeder Gewebeschnitt mit 10 µl Braunwasser befeuchtet. Mithilfe eines Skalpells wurde das Gewebe zusammengeschaubt und mit 400 µl Braunwasser in ein mit OADC angereichertes *MGIT* gespült. Dieses wurde zur Bebrütung ans Nationale Referenzzentrum für Mykobakterien in Borstel übermittelt. Ab dem Zeitpunkt, an dem sich Wachstum in den Positivkontrollen zeigte, wurden die Proben für weitere sechs Wochen überwacht.

2.4.2 Bakterienkultur

Pro Rinderserumplatte wurde ein Objektträger mit drei Gewebeschnitten verwendet. Zu allererst wurden diese angetaut und dann jeder Gewebeschnitt mit 10 µl Braunwasser befeuchtet. Mithilfe eines Skalpells wurde das Gewebe zusammengeschaubt und mit 200 µl Braunwasser auf eine getrocknete Rinderserumplatte gespült. Anschließend wurde das Gewebe mit einer Plastikimpföse auf der ganzen Platte ausplattiert. Diese wurden dann für 27 bis 39 Tage bei 37°C inkubiert und nachfolgend die Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten gezählt.

Tabelle 7: Materialien Fixierungsüberprüfung

Agarplatten	
10% Rinderserum	Biowest, Nuailé (F)
5ml Glycerin	Applichem, Iowa (USA)
19g Difco™ Middlebrook 7H10 Agar	Otto Nordwald, Hamburg (D)
Aqua B. Braun	Braun, Melsungen (D)
<i>MGIT</i> + OADC	Nationales Referenzzentrum Borstel, Borstel (D)

2.5 Färbungen

2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) erfolgte bei Paraffinschnitten als Übersichtsfärbung, um zelluläre Bestandteile (Kerne, Zytoplasma, Zellwände) sichtbar zu machen und um histopathologische Veränderungen detektieren zu können. Die hierfür verwendeten Materialien sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Färbung der bewässerten Schnitte (siehe Abschnitt 2.2.) erfolgte für 20 Minuten in einem Färbebad mit Hämatoxylin nach Gill. Darauffolgend wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Anschließend wurden sie für eine Minute in einer 1% Eosin-Lösung gegengefärbt. Die überschüssige Farbe wurde schließlich durch Schwenken in Braunwasser entfernt. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (kurzes Schwenken in 70 % Ethanol, zweimal 96 % Ethanol, 2 min in Ethanol absolut) und dreimal 5 Minuten Inkubation von Rotihistol wurden die Schnitte entwässert. Abschließend wurden sie mit Entellan eingedeckelt. Ausgewertet wurden die Schnitte mikroskopisch bzw. durch fotografische Dokumentation.

Tabelle 8: Materialien Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Aqua B. Braun	Braun, Melsungen (D)
Entellan	Merck, Darmstadt (D)
1 % Eosin-Lösung: 10 g/l Eosin Y di-Natrium-Salz in Leitungswasser, vor Gebrauch filtriert und mit 2 bis 3 Tropfen Eisessig angesäuert	
Eisessig, 100%	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Eosin Y di-Natrium-Salz	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethanol absolut zur Analyse, EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt (D)
Hämatoxylin nach Gill: 6 g/l Hämatoxylin, 0,6 g/l NaIO ₃ , 52,8 g/l Al ₂ (SO ₄) ₃ ·H ₂ O, 25 % Ethylenglykol, 6% Eisessig in Leitungswasser	
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
NaIO ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethylenglykol	Merck, Darmstadt (D)
Rotihistol	Carl Roth, Karlsruhe (D)

2.5.2 Kresylviolett

Die Färbung mit Kresylviolett erfolgte als Übersichtsfärbung bei all jenen Schnitten, die für die LCM vorgesehen waren. Bei dieser Färbung stellen sich die Zellkerne stark und das Zytoplasma der Zellen schwach violett dar. Gefärbt wurden Schnitte, die auf PEN-Membran beschichtete Slides aufgezogen waren. Die für die Färbung verwendeten Materialien sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Variante 1: Nach der Fixierung in Methanol wurden die Schnitte für 5 bis 15 Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte ein Waschschrift in DEPC behandeltem Wasser zur Entfernung des Eindeckmediums und der Färbeschritt in Kresylviolett für je zwei Minuten. Hierauf wurden die Schnitte in 100% Ethanol dehydriert und für 5 bis 10 Minuten trocknen gelassen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

Variante 2: Nach der Fixierung in Methanol wurden die Schnitte 30 Sekunden in eisgekühltem Kresylviolett geschwenkt und danach in 100% Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde je ein Objektträger in 50ml Flacons transferiert und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Tabelle 9: Materialien Kresylviolettfärbung

DEPC	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethanol absolut zur Analyse, EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt (D)
1% Kresylviolett-Acetat in 50% EtOH	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

2.5.3 CD68⁺-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung

Begonnen wurde mit der Ziehl-Neelsen-Färbung, mit Hilfe derer Mykobakterien detektiert werden können. Hierauf folgte die immunhistochemische CD68⁺-Färbung. Die für die Färbungen verwendeten Materialien sind in Tabelle 10 aufgelistet. Zu allererst wurden die bei -80°C tiefgefrorenen Kryoschnitte bei Raumtemperatur aufgetaut und für 15 Minuten getrocknet. Dann erfolgte ein Spülen in zweifach destilliertem Wasser. Hierzu wurden die Schnitte, auf einem Färbegestell liegend, mit gefilterter Karbolfuchsinlösung bedeckt und zweimal kurz mit der Bunsenbrennerflamme erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurde die Karbolfuchsinlösung abgegossen. Darauf folgte ein Entfärbeschritt mittels 0,5% Chlorwasserstoff in 70% Ethanol. Jedem Färbe- bzw. Entfärbeschritt folgte ein Spülen in zweifach destilliertem Wasser. Vor Beginn der sich nun anschließenden immunhistochemischen Färbung wurde ein Peroxidase-Block mit in PBS gelöster 0,3%-Wasserstoffperoxid-Lösung zur Reduzierung unerwünschter Hintergrundfärbung durchgeführt. Alle nun folgenden immer zwischengeschobenen Spülschritte erfolgten mit PBS. Nach dem Peroxidase-Block wurde mit 200 µl Avidin und 200 µl Biotin mit Einwirkzeiten von je 15 Minuten geblockt. Dann wurden 200 µl des im Verhältnis 1:200 in 3% BSA/PBS verdünnten primären Antikörpers Rat-α-CD68 auf die Schnitte pipettiert und diese über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einer 45-minütigen Temperierung am nächsten Morgen wurden 200 µl des ebenfalls im

Verhältnis 1:200 in 3% BSA/PBS verdünnten sekundären Antikörpers *Rabbit Anti-Rat-IgG*-Biotin auf die Schnitte aufgetragen. Es folgte ein Bedecken der Schnitte mit 200 µl nach Herstellerprotokoll vorbereiteten Vectastain ABC Reagenz mit anschließender Inkubation für 20 Minuten. Darauffolgend wurden 200 µl des nach Herstellerprotokoll angesetzten Farbstoffes *StayYellow* aufgetragen und dieser für 10 Minuten wirken gelassen. Nach einem Waschschrift mit Braunwasser erfolgte eine Gegenfärbung mit einer 1:10 verdünnten, gefilterten Methylenblau-Lösung. Vor dem Eindecken mit Entellan wurde erneut ein Spülen mit Braunwasser durchgeführt. Als Kontrolle der richtigen Bindung der primären Antikörper wurden Schnitte ohne diese angefertigt. Ausgewertet wurden alle Schnitte mikroskopisch bzw. durch fotografische Dokumentation.

Tabelle 10: Materialien CD-68⁺-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung

Aqua B. Braun	Braun, Melsungen (D)
Avidin-Biotin Kit	Vector Laboratories, Burlingame (CA)
BSA	Appllichem, Iowa (USA)
CD68 (rat) (Klon FA-11)	abcam, Cambridge (GB)
Ethanol absolut zur Analyse, EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt (D)
Entellan	Merck, Darmstadt (D)
DAB peroxidase Substrate Kit, 3,3' - diaminobenzidine	Vector Laboratories, Burlingame (CA)
HCL	Carl Roth, Karlsruhe (D)
H ₂ O ₂	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Löfflers Methylenblau	Merck, Darmstadt (D)
Invitrogen™ PBS (10x), pH7.2 Gebrauchslösung: 1:10 PBS in Aqua B. Braun	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
<i>Rabbit-α-Rat-IgG</i> -Biotin	Vector Laboratories, Burlingame (CA)
<i>StayYellow</i> /HRP	abcam, Cambridge (GB)
Vectastain Elite ABC-Peroxidase Kit	Vector Laboratories, Burlingame (CA)
Ziehl-Neelsen-Karbolfuchsin	Merck, Darmstadt (D)

2.5.4 Arginase-1-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung

Die ersten Schritte der Arginase-1-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung glichen der CD68⁺-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung. Erst nach dem Biotin-Avidin-Block kam es zu einer Unterscheidung im Protokoll. Hier wurde eine Ig-Blockierung mit dem 1:1250 in PBS verdünnten Reagenz des M.O.M. Kits durchgeführt. Nach einer Stunde Inkubationszeit und dreimaligem Spülen mit PBS, wurden 200 µl einer Proteinlösung, bestehend aus einem 1:12,5 in PBS verdünnten aus dem M.O.M Kit stammenden Proteinkonzentrat, hinzugefügt. Hierauf erfolgte eine 5-minütige

Inkubation. Nun wurden 200 µl des 1:250 in der Proteinlösung verdünnten Arginase-1-Antikörpers hinzugeben. Nun schloss sich ein Inkubationsschritt an, der anders als die vorherigen und folgenden, die bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, bei 4°C über Nacht erfolgte. Nach einer 60-minütigen Temperierung am nächsten Morgen und dreimaligem Spülen mit PBS wurden 200 µl des 1:250 in Proteinlösung verdünnten M.O.M Anti-Maus Ig Reagenz aufgetragen. Es folgte eine 20-minütige Inkubation und anschließend ein dreimaliges Spülen. Die Verwendung des Vectastain Reagenz und alle weiteren nachfolgenden Schritte glichen dann wieder dem Prozedere der CD68⁺-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung. Die bei Arginase-1-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung verwendeten Materialien sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Materialien Arginase-1-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung

Aqua B. Braun	Braun, Melsungen (D)
Avidin-Biotin Kit	Vector Laboratories, Burlingame (CA)
Ethanol absolut zur Analyse, EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt (D)
Entellan	Merck, Darmstadt (D)
HCL	Carl Roth, Karlsruhe (D)
H ₂ O ₂	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Löfflers Methylenblau	Merck, Darmstadt (D)
Mouse Anti-Arginase I (Klon 19)	BD, Franklin Lakes (USA)
Invitrogen™ PBS (10x), pH7.2 Gebrauchslösung: 1:10 PBS in Aqua B. Braun	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
StayYellow/HRP	abcam, Cambridge (GB)
Vector M.O.M. Immunodetection Kit	Vector Laboratories, Burlingame (CA)
Vectastain Elite ABC-Peroxidase Kit	Vector Laboratories, Burlingame (CA)
Ziehl-Neelsen-Karbolfuchsin	Merck, Darmstadt (D)

2.5.5 Trichromfärbung

Die Trichromfärbung diente zur Demarkierung der fibrotischen Kapsel. Kollagen zeigt sich bei dieser Färbung blau und Zytoplasma rosa. Die für diese Färbung verwendeten Materialien sind in Tabelle 12 aufgelistet. Nach dem Auftauen tiefgefrorener Kryoschnitte und Bewässern dieser wurde mittels Azokarminlösung das Chromatin gefärbt. Hierfür wurden die Schnitte bei 60°C in der Färbelösung 15 Minuten lang inkubiert, darauffolgend für eine Minute abgekühlt und anschließend in Braunwasser gespült. Zur Differenzierung der Zellkerne wurden die Schnitte für einige Sekunden bis Minuten in Anilinalkohol gebadet und der Vorgang unter dem Mikroskop beobachtet. Ein Abstoppen des Prozesses erfolgte durch mit Eisessig gesäuertem 96% Ethanol. Eine darauffolgende Inkubation der Schnitte für zwei Stunden in einer 5% Phosphor-Wolfram-Säure Lösung diente zum Entfärben und Beizen. Anschließend wurden das Kollagen und Bindegewebe mittels eines 30-minütigen Bades in 1:3 verdünnter Anilin-Goldorange-Lösung angefärbt. Nach dem Spülen in zweifach destilliertem Wasser erfolgte eine Differenzierung der Schnitte in 96% Ethanol und eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Abschließend wurde ein Eindeckeln mit Entellan durchgeführt. Ausgewertet wurden die Schnitte mikroskopisch bzw. durch fotografische Dokumentation.

Tabelle 12: Materialien Trichromfärbung

Aqua B. Braun	Braun, Melsungen (D)
Anilinalkohol: 0,1 % Anilin in 90 % Ethanol (v/v)	
Anilin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Anilinblau-Goldorange: 0, 5% Anilinblau, 2 % Goldorangen G in Aqua dest. (w/v), 8 % Eisessig, aufkochen und filtrieren, vor Gebrauch 1:3 in Aqua dest. verdünnen	
Anilinblau,	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Orange G	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Azokarminlösung: 0,1 % Azokarmin in Aqua dest. (w/v), aufkochen und nach filtrieren 1 % Eisessig	
Azokarmin G	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Entellan	Merck, Darmstadt (D)
Essigsäure-Alkohol: 0,1 % Eisessig in 96 % Ethanol (v/v)	
Essigsäure 100%,	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Ethanol absolut zur Analyse, EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt (D)
Phosphor-Wolframsäure: 5% Phosphorwolfram-säure-Hydrat in Aqua dest. (w/v)	
Phosphorwolframsäure-Hydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

2.5.6 Ölrot-O-Färbung

Mit Hilfe der Ölrot-O-Färbung können neutrale Lipide und Lipidtröpfchen angefärbt werden. Die für diese Färbung verwendeten Materialien sind in Tabelle 13 aufgelistet. Vor Beginn der Färbung wurden die Kryoschnitte aufgetaut und getrocknet. Hierauf folgte eine Fixierung der Schnitte für 10 Minuten in eiskaltem, mit *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) auf 10% verdünntem Formalin. Dann wurden die Schnitte viermal 4 Minuten gewaschen und erneut für 10 Minuten getrocknet. Anschließend wurden sie in 60% 2-Propanol getaucht. Hierauf erfolgte eine 20-minütige Färbung in der Ölrot-O-Lösung. Eine Entfärbung wurde mit 60% 2-Propanol durchgeführt, an die sich ein 3-minütiger Waschschrift in Braunwasser anschloss. Gegengefärbt wurden die Schnitte für 5 Minuten mit Hämatoxylin.

Gebläut wurden sie unter Leitungswasser. Abschließend erfolgte die Eindeckelung mit Kaisers Glyceringelatine. Ausgewertet wurden die Schnitte mikroskopisch bzw. durch fotografische Dokumentation.

Tabelle 13: Materialien Ölrot-O-Färbung

Aqua B. Braun	Braun, Melsungen (D)
37% Formalin	Merck, Darmstadt (D)
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt (D)
Hämatoxylin nach Gill: 6 g/l Hämatoxylin, 0,6 g/l NaIO ₃ , 52,8 g/l Al ₂ (SO ₄) ₃ ·H ₂ O, 25 % Ethylenglykol, 6% Eisessig in Leitungswasser	
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
NaIO ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethylenglykol	Merck, Darmstadt (D)
Ölrot-O-Lösung: 60% Ölrot-O-Lösung in Aqua dest. (v/v), 10 Minuten inkubieren und vor Verwendung filtrieren	
Ölrot-O-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
60% 2-Propanol in Aqua dest. (v/v)	Carl Roth, Karlsruhe (D)

2.6 Laser-Mikrodissektion

Zur Gewinnung spezifischer Bereiche mittels *LCM* aus Kryoschnitten wurde der Palm Beam von Zeiss mit der Software Palm Robo 4.6 verwendet. Um hierbei möglichst viel RNA zu erhalten, erfolgte ein am Handbuch „*RNA Handling*“ der Firma aus dem Jahr 2012 orientiertes Vorgehen (23). Die Energie des Lasers wurde vorab mittels Autokalibrierung des Gerätes und anschließender fein Adjustierung über dem jeweiligen Gewebe bestimmt. Sie lag zwischen 48 und 55 auf einer von der Software vorgegebenen Skala von 1 bis 100. Die Geschwindigkeit, mit der dissektiert wurde, lag zwischen 40 und 46 Prozent. Gelasert wurde in 10-facher Vergrößerung. Die bei der *LCM* verwendeten Materialien und Geräte sind in Tabelle 14 aufgelistet.

2.6.1 Gewinnung von Material aus Milz- bzw. Lungenschnitten

Bei -80°C einzeln in Plastikröhrchen gelagerte Objektträger wurden ausgefroren, aus dem Röhrchen herausgenommen und anschließend für weitere 20 bis 30 Minuten in Silica Gel getrocknet. Hierauf wurden sie in den Palm Beam eingespannt und die zu lasernden Bereiche eingezeichnet. Anschließend erfolgte das Lasern. Es wurden so lange neue Objektträger mit sequentiellen Schnitten eines Gewebes ausgefroren und bearbeitet, bis sich eine vordefinierte Menge im Deckel des Reagenzgefäßes befand. Zur besseren Haftung der gelaserten Elemente war zuvor eine geringe Menge Öl (<1 µl) auf den Deckel des Reagenzgefäßes aufgetragen worden. Nach der Dissektion wurden 350 µl eines im Verhältnis 1:100 angemischten RTL-Puffer-2-Mercaptoethanol-Gemisches in das Reagenzgefäß gegeben, dieses auf den Kopf gedreht und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine Durchmischung mittels Schüttelgerät und eine Anzentrifugation. Hierauf wurde die Probe mit Hilfe einer sterilen Kanüle der Stärke G20 aufgeschlossen. Es erfolgte eine erneute Anzentrifugation und ein Lagern der Proben bei -80°C. Handelte es sich bei den Objektträgern um PFA-fixierte, wurde nach der Dissektion direkt mit den ersten Schritten der unten beschriebenen RNA-Isolation gemäß des Protokolls „*Purification of Total RNA from Microdissected FFPE Tissue Sections*“ aus dem Handbuch „*RNeasy FFPE Handbook*“ des Jahres 2014 der Firma Qiagen begonnen (144).

2.6.2 Gewinnung von Probenmaterial aus unstrukturierten Läsionen und strukturierten Granulomen

Nach dem Ausfrieren eines in einem Flacon eingefrorenen Slides erfolgte ein 2-minütiger Wasser-Waschschritt zur Entfernung des Eindeckmediums. An diesen schloss sich eine 30-sekündige Dehydrierung in 100% Ethanol sowie eine Trocknung in Silica Gel an. Gesammelt wurde das Material von zwei auf einen Objektträger gezogenen Gefrierschnitten. Katapultiert wurde es in einen mit 0,5 µl eines RNase-Inhibitors sowie 0,5 µl eines im Verhältnis 1:100 angemischten RTL-Puffer-β-Mercaptoethanolgemisches präparierten Tube-Deckel. Nach Abschluss des Laserns wurden weitere 75 µl des RLT-Puffer-β-Mercaptoethanolgemisches

auf das dissektierte Material gegeben und das Ganze für eine Minute gevortext. Daraufhin wurde das Tube sofort in flüssigen Stickstoff gegeben und nachfolgend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Gelasert wurden sequentielle Schnitte. Zur Differenzierung der zu dissektierenden Bereiche wurden zu den mikrodisektierten Schnitten sequentielle Trichrom- bzw. CD-68⁺-Ziehl-Neelsen-Kombi gefärbte Schnitte herangezogen. So konnten die strukturierten nekrotischen Granulome identifiziert werden, die über ihre fibrotische Kapsel, einen Ring aus Schaummakrophagen und eine Anreicherung von Mykobakterien charakterisiert wurden. Unstrukturierte Läsionen wurden als reine, die Lungenstruktur aufbrechende Zellansammlung definiert. Vier bis sieben Objektträger wurden so zur Gewinnung von Material aus unstrukturierten Läsionen und zehn bis 26 Objektträger zur Gewinnung von Material aus strukturierten Granulomen im Zeitraum von 70 bis 130 Minuten bearbeitet. Material von drei bis vier Objektträgern wurde gesammelt, um Proben uninfizierter Tieren zu generieren.

Tabelle 14: Materialien Laser Mikrodisektion

β-Mercaptoethanol, Bio Ultra, ≥99.0% (GC)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethanol absolut zur Analyse, EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt (D)
Mineralöl, REF 400-5	Trinity Biotech, Bray (IRL)
Palm Beam mit Software Palm Robo 4.6	Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen (D)
RNase Inhibitor Murine, 40.000 U/ml	New England Bio Labs, Ipswich (USA)
RLT-Puffer aus RNeasy Micro Kit	Quiagen, Venlo (NL)
Silica Gel Orange, 2-5mm, mit Indikator, Perlform	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Stickstoff	Hausanschluss

2.7 RNA-Aufbereitung

2.7.1 RNeasy Micro Kit

Hier kamen zwei Varianten zum Einsatz. Die hierfür verwendeten Materialien und Geräte sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Variante 1: Die RNA-Isolation der Proben erfolgte mittels RNeasy Micro Kit von Qiagen anhand des entsprechenden Protokolls „*Purification of Total RNA from Microdissected Cryosections*“ des „*RNeasy® Micro Handbook*“ aus dem Jahr 2014 (145). Nach dem Auftauen der Proben aus -80°C wurde mit der RNA-Isolation ab Schritt 3 des Protokolls begonnen und danach strikt nach diesem vorgegangen. Auf einen Verdauungsschritt mittels DNase I wurde verzichtet. Die isolierte RNA wurde schließlich bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

Variante 2: Die RNA-Isolation der Proben erfolgte mittels RNeasy Micro Kit von Qiagen anhand des entsprechenden Protokolls für mikrodisektierte Kryoschnitte (145). Um mit der RNA-Isolation der Proben starten zu können, mussten abweichend vom Protokoll nach dem Auftauen vorab alle korrespondierenden mikrodisektierten Proben eines Lungenstücks in einem Reagenzgefäß zusammengepoolt werden. Darauf folgend wurde das Volumen der unterschiedlichen, gepoolten Proben mittels Zugabe des RLT- β -Mercaptoethanol-Gemisches nivelliert. Beim folgenden Schritt 5 des Herstellerprotokolls wurde eine den Probenvolumina entsprechende Menge von 70% Ethanol hinzugefügt. Nach ausreichender Vermischung wurden die MinElute Spin Säulen des Kits mit 700 μl beladen und für 15 Sekunden mit $11180 \times g$ bei 25°C zentrifugiert. Nach Verwerfung des Durchflusses wurden die zwei vorherigen Schritte so oft wiederholt, bis die gesamte Menge der Proben durch die Säulen gelaufen waren. Nach der Zugabe von 700 μl RW1-Puffer und erneutem Zentrifugieren für 15 Sekunden mit $11180 \times g$ wurde das Sammelrohr verworfen und mit den Schritten 11 bis 14 gemäß dem Herstellerprotokoll fortgefahren. So konnten 14 μl RNA gewonnen werden. Diese wurde schließlich bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

2.7.2 FFPE-Kit

Bei der RNA-Isolation mittels des FFPE-Kits erfolgte beim Vorgehen eine Orientierung am Protokoll „*Purification of Total RNA from FFPE Tissue Sections*“, beschrieben in „*RNeasy® FFPE Handbook*“ aus dem Jahr 2014 des Herstellers Qiagen (144). Die hierfür verwendeten Materialien und Geräte sind in Tabelle 15 aufgelistet. Die RNA-Isolation setzte bei mikrodisssektierten Proben direkt nach der Dissektion an, bei direkt in ein Reagenzgefäß gegebenen Schnitten nach der Abnahme der Fixierungsflüssigkeit. In jedem Fall wurde, anders als im Protokoll angegeben, mit der Zugabe von 150 µl PKD-Pufferlösung, dem 6. Protokollschritt, gestartet. Bei den mikrodisssektierten Proben wurden allerdings von diesen 150 µl PKD-Pufferlösung bereits 40 µl in den Reagenzgefäßdeckel gegeben, in den die Sammlung der Gewebestücke erfolgte. Die Zugabe der restlichen 110 µl erfolgte dann nach der Laser-Mikrodisssektion. Nach der Zugabe der Pufferlösung und Mischen mittels Vortexer wurden alle Proben für eine Minute mit 11180 x g anzentrifugiert. Hierauf wurden protokollgemäß 10 µl Proteinkinase hinzugemischt und alle Proben für je 15 Minuten mit 4020 x g bei 56°C und bei 80°C inkubiert. Hierauf folgte ein 3-minütiger Kühlschritt auf Eis, sodann ohne Reagenzgefäßwechsel eine Zentrifugation für 15 Minuten mit 20370 x g. Auch die Schritte 12 bis 15 erfolgten nach Protokoll. Nach der Zugabe von 320 µl RBC-Puffer wurden die Proben schließlich bei -20°C gelagert und an einem anderen Tag dem Protokoll konform mit der weiteren RNA-Isolation fortgefahren. So konnten 14 µl RNA gewonnen werden. Diese wurde schließlich bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

Tabelle 15: Materialien RNA-Isolation

RNeasy Micro Kit	Quiagen, Venlo (NL)
RNeasy FFPE Kit	Quiagen, Venlo (NL)
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen (D)

2.7.3 RNA-Qualitätssicherung

Zur Sicherung einer guten RNA-Qualität erfolgte ein an den „*DOs and DON'Ts of handling RNA*“ in „*RNA handling*“ von Februar 2012 der Firma Zeiss orientiertes Vorgehen (23).

2.7.4 RNA-Qualitätsbestimmung

Die Bestimmung der extrahierten RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Nano Drops aus je 1,4 µl der extrahierten RNA. Fotometrisch wurden Absorptionen im UV-Bereich bei 260 und 280 nm gemessen und die RNA-Konzentration mittels des Lambert-Beer-Gesetzes bestimmt. Zusätzlich wurde die 260/280-Ratio zur Beurteilung von Verunreinigungen z.B. durch Proteine betrachtet. Eine reine RNA sollte hier Werte zwischen 1.8 und 2.1 erbringen (54). Die Integrität der RNA wurde mittels automatisierter Elektrophorese im Bioanalyzer 2100 sowie dem Agilent RNA 6000 Nano Kit bestimmt. Es wurde sich bei der Vorbereitung, der Durchführung sowie beim Material strikt nach den Vorgaben des „*Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide*“ aus dem Jahr 2016 gehalten (3). Bei der Messung im Bioanalyzer kam der Assay „*Eukaryote Total RNA Nano*“ zur Verwendung. Die Bioanalyzer-Software gibt den Grad der Degradierung der RNA mit Nummern zwischen eins und zehn an. Eins steht hierbei für eine vollkommen fragmentierte und damit degradierte, zehn für eine intakte RNA. Die zur Qualitätsbestimmung verwendeten Materialien und Geräte sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Materialien Qualitätsbestimmung RNA

Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Bioanalyzer Software, B.02.08.SI648	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Chip Priming Station	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
NanoDrop 2000	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
RNA Nano Chips	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
RNaseZAP™	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Thermocycler, Biometra TPersonal	Analytik Jena GmbH, Jena (D)
Vortex Mixer, Model MS3	Ika, Staufen (D)

2.7.5 Reverse-Transkription

Die Herstellung von cDNA aus der extrahierten RNA erfolgte orientiert an der Produkt Information „*Thermo Scientific RevertAid H Minus Reverse Transcriptas*“ des Herstellers Thermo Fisher aus dem Jahr 2016 (177). Verwendet wurden die in Tabelle 17 aufgelisteten Materialien und Geräte. Aufgrund geringer Volumina wurde die extrahierte RNA in ihrer Gänze transkribiert. Zu Beginn wurden die Proben auf eine Menge von 11,5 µl mit H₂O adjustiert. Nach der Zugabe von 1 µl Random Hexamer Primer und gutem Schütteln wurden die Proben 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis wurden diese mit dem Reverse-Transkriptionsmix (20% 5x Reaktionspuffer v/v, 1 mM dNTPs, 20 U RiboLock und 200 U RevertAid) versetzt. Hierauf erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 25°C und für eine Stunde bei 42°C sowie eine Erhitzung für 10 Minuten auf 70°C zum Abstoppen der Reaktion. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die transkribierten Proben bei 4°C gelagert.

Tabelle 17: Materialien Reverse Transkription

dNTP Mix 10mM each	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Random Hexamer Primer, 100 μ M	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Reaction Buffer 250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25 °C), 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT	Thermo Fisher, Waltham (USA)
RevertAid H Minus M-MuL V Reverse Transkriptase	Thermo Fisher, Waltham (USA)
RiboLock Ribonuclease Inhibitor, 40 U/ μ L,	Thermo Fisher, Waltham (USA)

2.8 Genexpressionsmessung mittels *LightCycler*

Die quantitative Analyse der Genexpression erfolgte mittels der Verwendung eines *LightCyclers*, spezifischer Primerpaare sowie des *Universal ProbeLibrary* (UPL)-Sonden-Systems (Tabelle 20). Die Bestimmung erfolgte auf Mikrotiterplatten. Pro Kavität wurden 9 μ l LC-Mastermix (2-fach konzentrierter LC 480 Probes Master, 6,25 μ M Primer sense, 6,25 μ M Primer antisense, 1% UPL-Sonde in Aqua B. Braun (Tabelle 20)) und 1 μ l cDNA aufgetragen. Nach Zentrifugation der Mikrotiterplatte mit 259 x g für zwei Minuten erfolgte direkt die qPCR nach folgendem Schema:

Tabelle 18: qPCR-Schema

Zyklen	Analyse-Modus	Temperatur Ziel (°C)	Anzahl der Fluoreszenz-messungen	Zeit (hh:mm:ss)	Aufheiz-Rate (°C/s)
Denaturierung					
1	Keine	95	Keine	00:05:00	4.40
Amplifikation					
55	Quantifizierung	95	Keine	00:00:10	4.40
		60	Keine	00:00:20	2.20
		72	Einmalig	00:00:01	4.40
Kühlung					
1	Keine	40	Keine	00:00:30	2.20

Alle Messungen erfolgten inklusiv einer Kontroll-Kavität ohne hinzugefügter Probe. Die sich anschließende quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe der LC® 480 Software. Verglichen wurden so insbesondere über die Second-Derivate-Maximum-Methode bestimmte *Crossing-Point (CP)*-Werte, also jene Punkte, bei denen die Fluoreszenz der Proben erstmals über jene des Hintergrunds tritt. Je mehr cDNA eingesetzt wird, desto weniger Zyklen werden benötigt, um an diesen Punkt zu kommen. Kam es zu keinem Signal während der eingegebenen Zyklenzahl wurde der CP-Wert der entsprechenden Probe auf 55 gesetzt. Wurden mehrere *LightCycler* Messungen an einer und derselben Probe mit unterschiedlichen Primern und Sonden durchgeführt und sollte eine relative Quantifizierung erfolgen, wurde als interner Standard eine serielle Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:2, 1:8, 1:32, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024) einer Probe, gewonnen aus einer mit H37Rv infizierten und am Tag 89 nach Infektion getöteten IL-13^{tg}-Maus, zur Hilfe genommen. Hiermit wurden Standardkurven ermittelt, deren Steigungen Rückschlüsse auf die Effizienz der durchgeführten qPCR zuließen. Idealerweise sollte die Effizienz einer qPCR bei 2,0 liegen. Allerdings wurden Effizienzen bis 1,8 akzeptiert. Der auf Basis der Standardkurve durch die Software ermittelte Error sollte bei <0.05 liegen. Zur relativen Quantifizierung wurde *Hprt* als Referenzgen und ein mono-color Experimentansatz gewählt. Mit Hilfe dieses Referenzgenes wurden ein Zielgen/Referenzgen-Ratio mittels E-Methode durch die *LightCycler*-Software

berechnet. Dieser Wert wurde dann auf die mikrodissizierte Fläche bezogen, die insgesamt für eine gepoolte Probe gelasert wurde. Lagen von einer Probe mehrere *LightCycler*-Messungen vor, wurde jener Lauf ausgewertet, der näher an der idealen Effizienz von zwei lag und den kleineren Error-Wert vorzeigen konnte. Zusätzlich wurden stetig auch *LightCycler*-Läufe mit 1:10 verdünnten Proben durchgeführt, um Inhibitionseffekte auszuschließen. Tabelle 19 zeigt alle für die *LightCycler*-Messungen verwendeten Materialien und Geräte auf.

Tabelle 19: Materialien *LightCycler*-Messungen

Aqua B. Braun	Braun, Melsungen (D)
LC 480 Probes Master (2x Conc.)	Roche, Basel (CH)
<i>LightCycler</i> 480	Roche, Basel (CH)
<i>LightCycler</i> -Software, LCS480 1.5.162	Roche, Basel (CH)
UPL-Sonden	Roche, Basel (CH)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hannau (D)

Tabelle 20: Primer- und Sondensequenz für die quantitative *Real-Time* PCR

Gene	Refseq* Code/ GenBank Code	Primer	Sondennummer
			Amplicongröße
<i>Acc2</i>	NM_133904.2	sense: GAT-TCC-CAG-TTT-GGG-CAC-T	2
		antisense: CCT-TCA-AAG-CCA-CTA-CCA-TGT	79 bp
<i>Acs14</i>	NM_001033600.1	sense: GAA-ATT-CAC-AGC-ATG-CAA-TCA-G	17
		antisense: TCT-ACT-TGG-AGG-AAC-GCT-CAA	72 bp
<i>Arg1</i>	NM_007482.3	sense: CCT-GAA-GGA-ACT-GAA-AGG-AAA-G	2
		antisense: TTG-GCA-GAT-ATG-CAG-GGA-GT	72 bp
<i>CD68⁺</i>	BC_021637.1	sense: GCT-GTT-CAC-CTT-GAC-CTG-CT	27
		antisense: TCA-CGG-TTG-CAA-GAG-AAA-CA	92 bp
<i>Dgat2</i>	NM_026384.3	sense: TAC-TCC-AAG-CCC-ATC-ACC-A	42
		antisense: GGC-ATG-GTA-CAG-GTC-GAT-GT	93 bp
<i>Fabp3</i>	NM_010174.1	sense: ATC-CAT-GTG-CAG-AAG-TGG-AA	51
		antisense: CAC-TGC-CAT-GAG-TGA-GAG-TCA	91 bp
<i>Hprt</i>	NM_013556.2	sense: TCC-TCC-TCA-GAC-CGC-TTT-T	95
		antisense: CCT-GGT-TCA-TCA-TCG-CTA-ATC	90 bp
<i>Plin2</i>	NM_007408.3	sense: CCT-CAG-CTC-TCC-TGT-TAG-GC	79
		antisense: CAC-TAC-TGC-TGC-TGC-CAT-TT	62 bp

*Reference Sequences, www.ncbi.nlm.nih.gov

2.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mittels GraphPad Prism Version 9.3.1. Bei $n < 4$ wurde eine rein deskriptive Auswertung vorgenommen. Bei immer wieder auftretenden Ausreißern bei empfindlichen RNA-Messungen lag hier der Fokus auf der Betrachtung der Mediane einer Gruppe. Korrelationen wurden mittels dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman eingeordnet. Bei einem $n \leq 4$ wurden nicht-parametrische Testverfahren angewendet. Wurden zwei unabhängige Gruppen betrachtet, wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney-Test verwendet. Sollten abhängige Stichprobengruppen verglichen werden, wurde der Friedman-Test mit einem Vergleich der mittleren Ränge herangezogen. Bei Auftreten von Signifikanz kam der Dunn's Post hoc Test zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurde hierbei stetig auf 5% festgelegt. Zur weiteren Einordnung wurde außerdem die Differenz der Mediane studiert. Eine statistische Beratung am Institut für Medizinische Biometrie und Statistik wurde zur Absicherung des statistischen Vorgehens einmalig im Umfang von ca. einer Stunde nach Beendigung der Laborarbeit in Anspruch genommen.

2.10 Arbeitsverteilung innerhalb des Promotionsprojektes

2.10.1 Laborpraktische Tätigkeiten

Die Haltung, Infektion und Tötung der in diesem Projekt verwendeten Tiere erfolgte im Jahr 2016 durch die Arbeitsgruppe Infektionsimmunologie um Dr. Christoph Hölscher im FZB. Alle weiteren Arbeiten, die zu einem späteren Zeitpunkt im BSL3-Labor erfolgen mussten, wurden von Johanna Volz, technische Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Infektionsimmunologie des FZB, durchgeführt. Außerhalb des BSL3 Labors übernahm sie ebenfalls anteilig Färbungen der Gewebeschnitte. Der andere Anteil sowie die Durchführung der *Laser Capture Microdissection*, die RNA-Aufbereitung, die Bestimmung ihrer Qualität, die Transkription und Analyse und Auswertung mittels qPCR erfolgten als Eigenleistung. Die Einarbeitung am Micro Palm Beam erfolgte hierbei durch Franziska Beyersdorf, technische Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe chronische Lungenerkrankungen des FZB. Die Einarbeitung in

die Schritte der RNA-Isolation bis hin zur Auswertung von qPCR-Daten wurde von Alexandra Hölscher, technische Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Infektionsimmunologie des FZB, durchgeführt. Eine Erläuterung des Vorgehens am Bioanalyser wurde von Dörte Nitschkowski, wissenschaftliche Mitarbeiterin der Pathologie des FZB, vorgenommen.

2.10.2 Theoretisch konzeptionelle Tätigkeit

Die in diesem Projekt durchgeführten Versuche wurden in ihrer Planung und Auswertung durch Dr. Christoph Hölscher betreut. Bei der Thematik „*Laser Capture Microdissection*“ erfolgte anfänglich eine Beratung durch Dr. Kathrin Kalies, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für Anatomie der Universität zu Lübeck. In der Thematik „RNA-Qualität“ wurde Prof. Dr. Carsten Goldmann, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Pathologie des FZB, beratend tätig. Regelmäßiges konzeptionelles Feedback und gedanklicher Input ergaben sich bei internen Treffen der Arbeitsgruppe Infektionsimmunologie des FZB sowie Veranstaltungen der *IRTG (International Research Training Group) 1911* des Instituts für systematische Entzündungsforschung der Universität zu Lübeck.

3 Ergebnisse

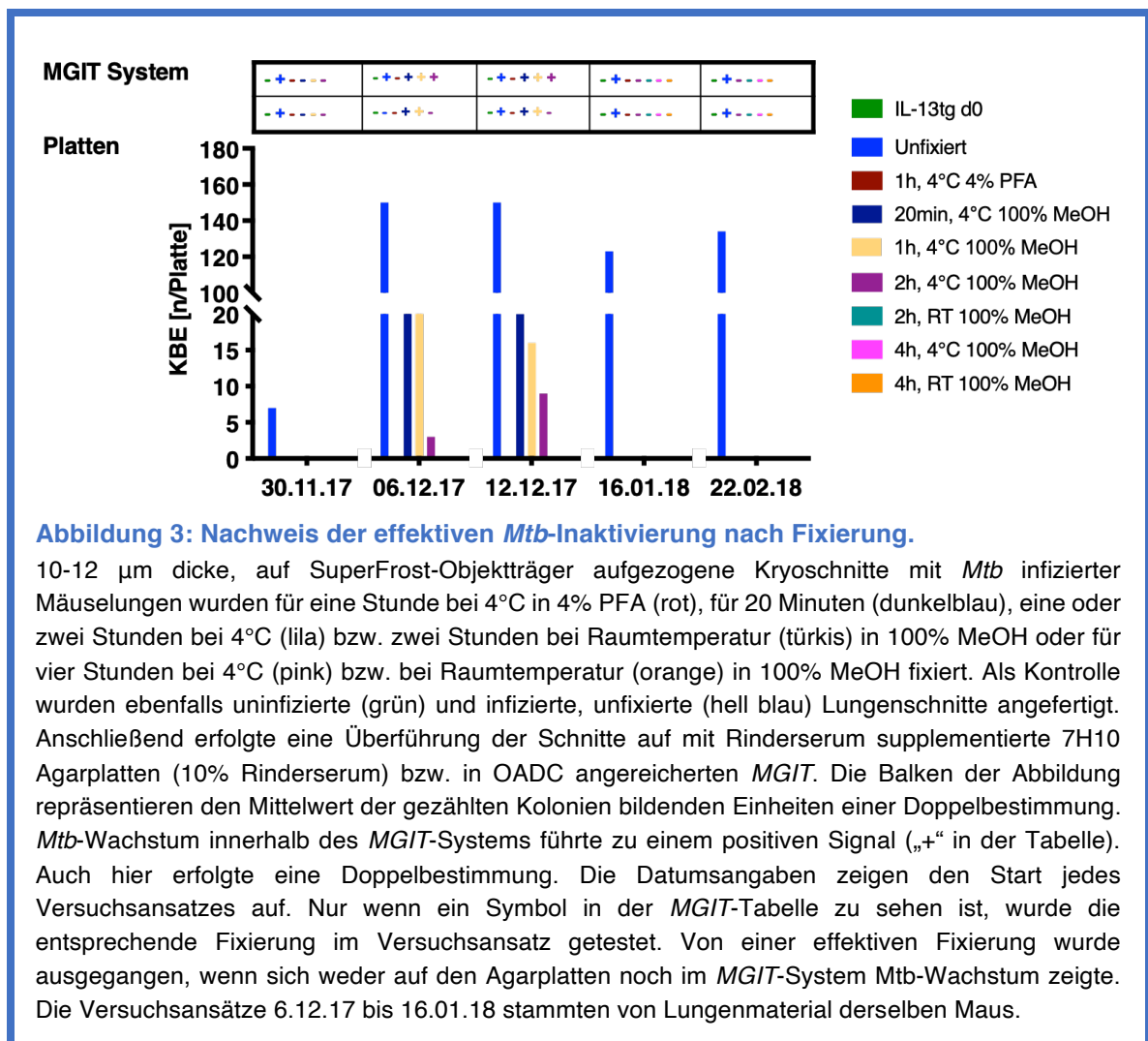
3.1 Methodenetablierung zur Gewinnung von RNA aus infiziertem, kryokonserviertem Lungengewebe mittels Laser-Mikrodissektion

Die im Folgenden beschriebenen Versuche dienten der Klärung der Frage, welche Fixierungslösung das Kriterium der effektiven *Mtb*-Inaktivierung bei gleichzeitigem RNA-Erhalt am besten erfüllt. Die Ergebnisse der drei nachfolgenden Punkte gesammelt betrachtet, führten zu der Entscheidung, infiziertes Probenmaterial mittels einer vierstündigen Methanol-Behandlung bei Raumtemperatur zu fixieren. Auch wenn sowohl die Fixierung in 4% PFA für eine Stunde als auch in 100% Methanol für 4 Stunden ein Wachstum der Mykobakterien verhinderten, schnitt Letztere, sofern sie bei Raumtemperatur durchgeführt wurde und die Proben mittels *LCM* akquiriert wurden, bei Messungen der isolierten RNA im *LightCycler* besser ab. Zusätzlich konnten Methanol fixierte Proben mittels des RNeasy Kits verarbeitet werden, welches nicht nur tendenziell bessere Ergebnisse erzielte, sondern auch praktikabler und weniger zeitaufwendig bei den sich an die Mikrodissektion anschließenden Protokollschritten war.

3.1.1 Nachweis effektiver *Mtb*-Inaktivierung durch verschiedene Fixierungen

Um eine Fixierung zu finden, die *Mtb* effektiv in Kryo-Gewebeschnitten inaktiviert, wurden verschiedene Fixierungsmöglichkeiten getestet. Wie Abbildung 3 aufzeigt, kam es nach einer Fixierung mit 100% MeOH für 20 Minuten bzw. für eine Stunde bei 4°C bei in acht von zwölf auf Agarplatten bzw. im *MGIT*-System zu einer Vermehrung von *Mtb*. Bei einer Fixierung für zwei Stunden bei 4°C war dies bei sechs von zwanzig Ansätzen der Fall. Die Zahl der Kolonien-bildenden Einheiten (KBE) auf den Agarplatten war jedoch im Vergleich zu jenen von unfixierten Proben reduziert und eine zunehmende Länge der Fixierungszeit verstärkte diesen Effekt. Bei der Fixierung in 100% MeOH bei 4°C für 4 Stunden kam es hingegen bei keinem

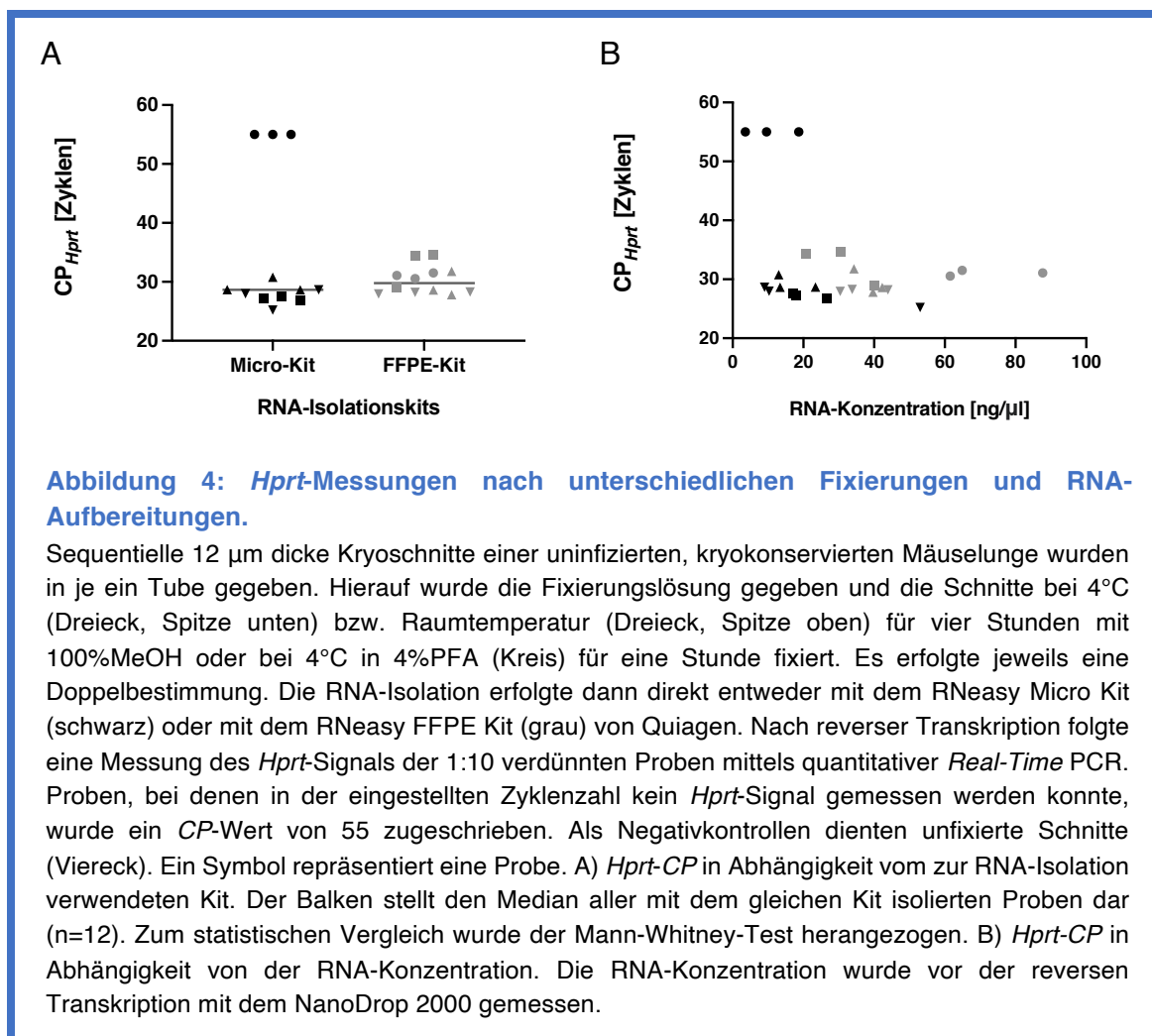
der angesetzten Versuche zu einem *Mtb*-Wachstum. Auch Proben von Kryogewebeschnitten, die bei Raumtemperatur für zwei bzw. vier Stunden in 100% MeOH fixiert wurden, zeigten im Beobachtungszeitraum keine reproduktive Aktivität der Mykobakterien. Eine PFA-Fixierung bei 4°C für eine Stunde führte in allen Versuchsansätzen zu einer Inhibition des Wachstums in beiden Testsystemen.



3.1.2 RNA-Isolation trotz Fixierung möglich

Zur Klärung der Frage, ob trotz Fixierung eine RNA-Isolation aus Gewebeschnitten weiterhin möglich ist, wurden zwei RNA-Isolationskits der Firma Quiagen (RNeasy Micro Kit und FFPE-Kit) getestet und miteinander über die Bestimmung von Signalen des Haushaltsgen *Hprt* im *LigthCycler* verglichen. Bei beiden kommerziellen Kits ließ sich aus Gewebeschnitten trotz vorheriger Fixierung RNA

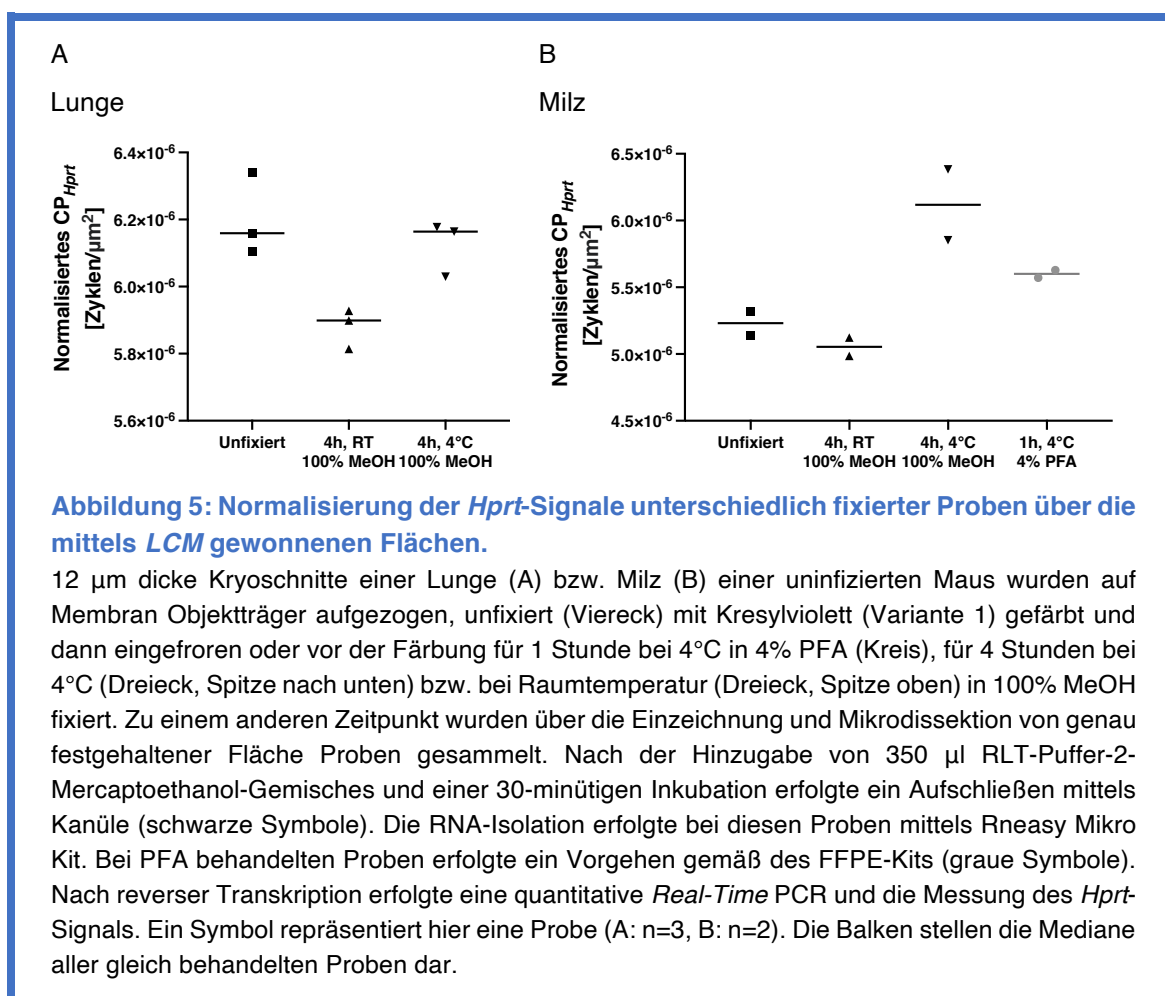
isolieren (Abbildung 4). Eine Ausnahme stellte die RNA-Isolation aus PFA fixierten Proben mit Hilfe des RNeasy Micro Kits dar. Bei diesen Proben konnte keine RNA akquiriert werden, die eine Signal-Messung mittels *LightCycler* zuließ. Wurden diese Proben mit Hilfe des FFPE-Kits aufbereitet, war eine *Hprt*-Bestimmung allerdings möglich. Jedoch waren höhere Zyklenzahlen im Vergleich zu jenen anderer Fixierungen nötig. Mit Blick auf die in Abbildung 4 A aufgezeigten Mediane führte eine Aufbereitung mit dem RNeasy Micro Kit im Gegensatz zur Aufbereitung mit dem FFPE-Kit tendenziell zu früheren *Hprt*-Signalen. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant (Mann-Whitney-Test $p=0.51$). Die RNA-Ausbeuten variierten insgesamt stark (Abbildung 4 B). Hierbei zeigten die *Hprt*-Signale der mit dem RNeasy Micro Kit aufbereiteten Proben eine moderate negative Korrelation bezogen auf die gemessene RNA-Konzentration (Spearman Rank $r=-0.56$). Wurde die RNA-Isolation mit dem FFPE-Kit durchgeführt, zeigte sich keine Korrelation (Spearman Rank $r=-0.07$).



3.1.3 MeOH-Fixierung bei Raumtemperatur am geeignetsten für mittels LCM gewonnene Proben

Mit Hilfe der Mikrodissektion konnten definierte Mengen einer vorab fixierten oder unfixierten Probe gesammelt werden. Die Angabe der Größe der gelaserten Fläche wurde verwendet, um im *LightCycler* gemessene *Hprt*-Signale zu normalisieren. Hierdurch zeigte sich, dass Proben, bei denen die Gewebeschnitte vorab bei Raumtemperatur für vier Stunden in 100% MeOH fixiert worden waren, besser als unfixierte bzw. für vier Stunden bei 4°C in 100% MeOH fixierte, mikrodisektierte Proben abschnitten (Abbildung 5). Beim Vergleich der normalisierten Werte zeigte sich, dass bei Proben, die aus bei Raumtemperatur fixierten Gewebeschnitten gewonnen wurden, das durch die Größe der ausgelaserten Fläche normalisiertes *Hprt*-Signal geringer war. Diese Tendenz war sowohl bei Proben aus

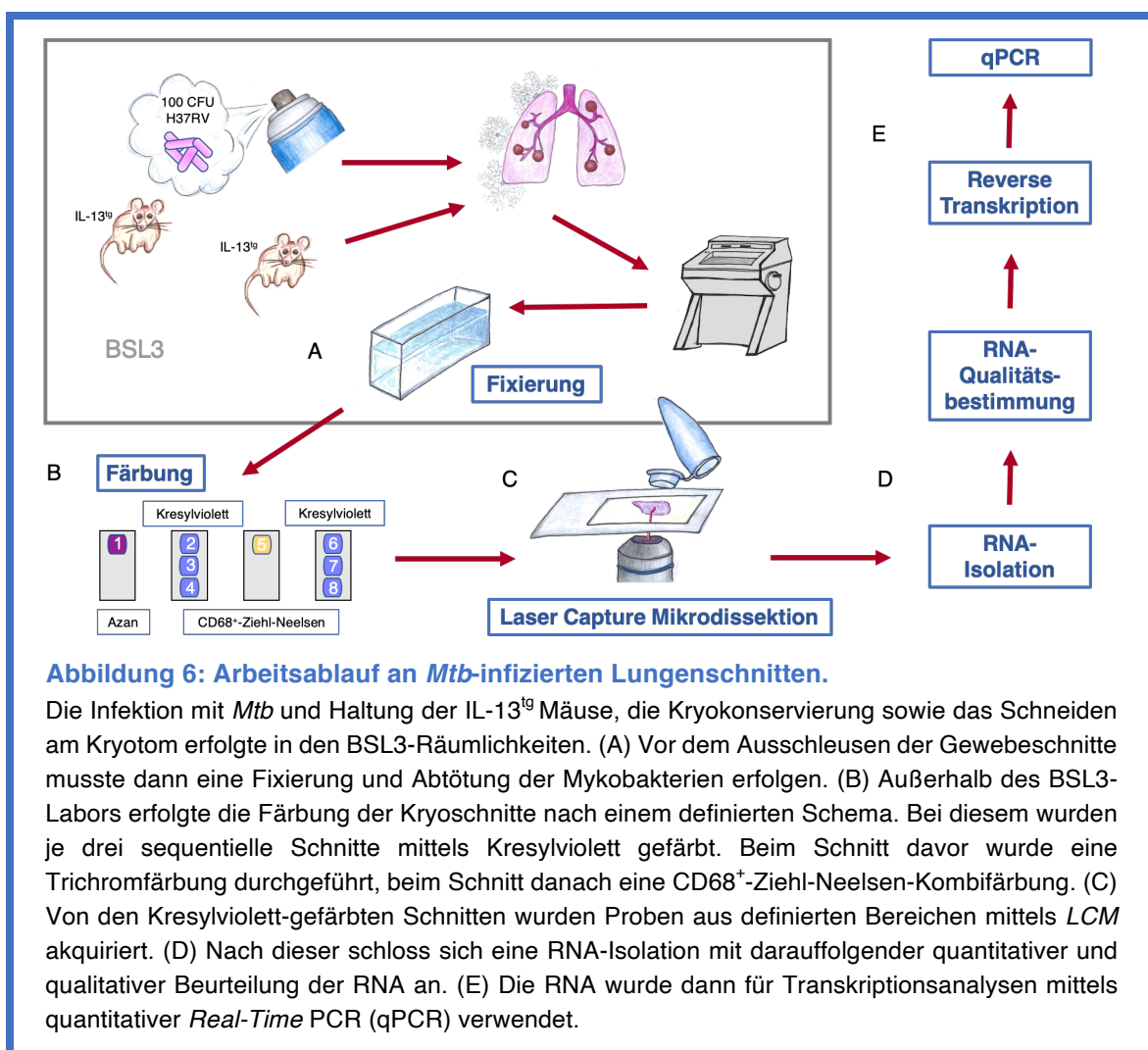
Lungenschnitten als auch bei Proben aus Milzschnitten, die sich aufgrund einer höheren Zelldichte durch einen größeren Probeninput pro Fläche charakterisierten, erkennbar. Wurden die auf die ausgelaserte Fläche bezogenen CP_{Hprt} -Werten von Proben, die bei 4°C mit 4% PFA fixiert und mit dem FFPE-Kit isoliert wurden, mit den normalisierten CP -Werten von Proben, die mit dem Rneasy Kit isoliert wurden, verglichen, zeigten die PFA-fixierten Proben schlechtere Werte als die unfixierten bzw. für vier Stunden bei 4°C in 100% MeOH-fixierten Proben (Abbildung 5 B).



3.2 Anwendung der Laser-Mikrodissektion zur Untersuchung der Stoffwechsellage in Granulomen der infizierten IL-13^{tg} Maus

Um lokal die Stoffwechsellage in infiziertem Gewebe der IL-13^{tg} Maus zu analysieren, wurde der in Abbildung 6 dargestellte Arbeitsablauf etabliert. Nach

einer Fixierung mittels 100% MeOH bei Raumtemperatur im BSL3-Labor (Abbildung 6 A) schlossen sich Färbeschritte sequentieller Kryoschnitte an. Abbildung 6 B stellt dabei das verwendete Färbeschema dar, bei dem neben für die *LCM* vorgesehenen, Kresylviolett gefärbten Schnitten, jeder erste und fünfte Schnitt in Vergleichsfärbungen Anwendung fand. Diese dienten zur klaren Differenzierung der zu lasernden Bereiche. Nach *LCM* erfolgte eine RNA-Isolation zusammengepoolter Proben (Abbildung 6 D). Hieran schloss sich dann eine RNA-Qualitätsbestimmung, eine reverse Transkription und Analysen mittels qPCR an (Abbildung 6 E). Die Wahl der Tiere, aus denen Proben akquiriert wurden, erfolgte wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben.



Bei den RNA-Qualitätsmessungen der Proben aus strukturierten Granulomen, die nachfolgend aufgezeigt werden, ergab sich, dass lediglich die RNA der aus dem

Randbereich gewonnen Proben vollständig integer war (Kapitel 3.2.1). Die sich anschließenden qPCR-Analysen bestätigten dann die *LCM* als differenzierende Methodik. Sie zeigten insbesondere bei der *Arg1*-Expression ein dem der immunhistochemischen Färbungen deckungsgleiches Bild (Kapitel 3.2.2). Des Weiteren zeigte sich eine Hochregulation der untersuchten Gene des Lipidstoffwechsels innerhalb der Läsionen mit gehäuft starker Ausprägung im nekrotischen Zentrum (Kapitel 3.2.3).

3.2.1 RNA-Qualitätseinschränkungen in zwei Granulombereichen

Zur Kontrolle der Qualität der gewonnenen RNA und damit des Arbeitsablaufs wurden an den aus strukturierten Granulomen gewonnenen Proben Qualitätsmessungen durchgeführt. Die aus dissektiertem Probenmaterial gewonnene RNA wurde als integer betrachtet, wenn sie eine RIN (*RNA Integrity Number*) >6 aufzeigte. Bei den in Tabelle 21 aufgelisteten Messungen stellte sich heraus, dass aus dem nekrotischen Zentrum und der Schaummakrophagenzone gewonnene Proben dieses Kriterium nicht erreichten, obgleich das Ausgangsmaterial noch die entsprechende Qualität aufwies. Proben, die von den selben Schnitten aber aus dem Randbereich der strukturierten Granulome akquiriert wurden, präsentierten eine ausreichende RNA-Integrität. Diese war bei der Betrachtung aller untersuchten Proben nicht klar abhängig von der insgesamt gelaserten Fläche oder der gemessenen RNA-Konzentration bzw. 269/280-Ratio. Die Verwendung größerer Materialmengen ging so nur bei den Proben aus der Schaummakrophagenzone und dem Randbereich mit einer erhöhten RIN einher.

Tabelle 21: Proben aus nekrotischen Zentrum und Schaummakrophagenzone mit geringer RNA-Integrität.

Sequentielle, 12 µm dicke Kryoschnitte von Lungen zweier am Tag 100 nach Infektion mit *Mtb* getöteten IL-13^{tg} Mäusen wurden auf Membran Objektträger aufgezogen, für vier Stunden bei Raumtemperatur in 100% MeOH fixiert und in eisgekühltem Kresylviolett (Variante 2) gefärbt. Mittels *LCM* wurden anschließend Proben aus dem nekrotischen Zentrum, dem Schaummakrophagensaum und dem Randbereich strukturierter Granulome gewonnen. Pro Lasersitzung wurden je zwei Gewebeschnitte bearbeitet. Die farblich gleichen Zeilen markieren die korrespondierenden Proben einer Maus. Um in den letztendlich gemessenen Proben ausreichend Material vorzufinden, erfolgte ein Zusammenpoolen mehrerer Lasersitzungen während der RNA-Isolation. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mittels NanoDrop 2000, die Analyse der RNA-Integrität mittels Bioanalyzer. Zur Bestimmung der Integrität des gesamten Lungenstücks wurde ein Kryoschnitt direkt in ein Reagenzgefäß gegeben, fixiert und sofort die RNA isoliert.

Gelaserter Bereich	Anzahl der insgesamt gelaserten Elemente	Insgesamt gelaserte Fläche (µm ²)	RNA-Konzentration (ng/ µl)	260/280	RIN des Lungenstückes	RIN nach Mikrodissektion	RNA integer
Nekrotisches Zentrum	133	8011515	72,6	1,82	6,6	2,4	nein
	249	18537565	132,1	1,82	6,2	2,3	
Schaummakrophagenzone	238	4467595	13,7	1,92	6,6	1,2	nein
	618	10001034	17,0	1,79	6,2	3,6	
Randbereich	116	7946051	22,5	1,91	6,6	6,4	ja
	279	18573102	28,4	1,93	6,2	7,1	

3.2.2 Nachweis über die Möglichkeit der räumlich differenzierenden Genanalyse in Granulomen mittels Laser-Mikrodissektion

Die nun folgenden Analysen dienen der Klärung der Frage, ob die *LCM* zur räumlichen differenzierten Betrachtung der Stoffwechsellage in der IL-13^{tg} Maus beitragen kann. Um dies zu klären, wurden den mittels *LCM* gewonnenen qPCR-Daten immunhistochemische Färbungen vergleichend gegenübergestellt.

Bei IL-13^{tg} Mäusen, die am Tag 49 bzw. 56 nach der Infektion mit *Mtb* getötet wurden, zeigten sich bei der lichtmikroskopischen Untersuchung zum größten Teil unstrukturierte, nicht stratifizierte Läsionen in Form von Ansammlungen von Lymphozyten und CD68⁺ positiven Zellen (Abbildung 7 C und D). Stellenweise konnten auch größere leicht stratifizierte Zusammenlagerungen von CD68⁺

positiven Makrophagen gefunden werden. Die mittels Ziehl-Neelsen-Färbung demarkierten Mykobakterien befanden sich vor allem innerhalb jener unstrukturierten Läsionen an deckungsgleichen Orten wie die CD68⁺ positiven Makrophagen (Abbildung 7 E). Mittels Arginase-1 Färbungen ließ sich ebenso ein positives Signal an den CD68⁺ positiven Bereichen kongruenter Stellen aufzeigen (Abbildung 7 F). Diese wiesen ebenfalls eine Ansammlung von Lipidtröpfchen auf (Abbildung 7 G). Wurden mittels Laser Mikrodisektion die unstrukturierten Läsionen herausgetrennt und *CD68⁺* und *Arginase1(Arg1)*-Signale im *LightCycler* gemessen, konnte eine verstärkte Expression dieser Gene in den unstrukturierten Läsionen gegenüber uninfizierten Mäuselungen herausgearbeitet werden (Abbildung 8 A und B). In beiden Fällen war der Unterschied statistisch signifikant (*CD68⁺*: $p=0,029$, Differenz der Mediane: $3,17 \times 10^{-8}$; *Arg1*: $p=0,029$, Differenz der Mediane: $3,68 \times 10^{-8}$).

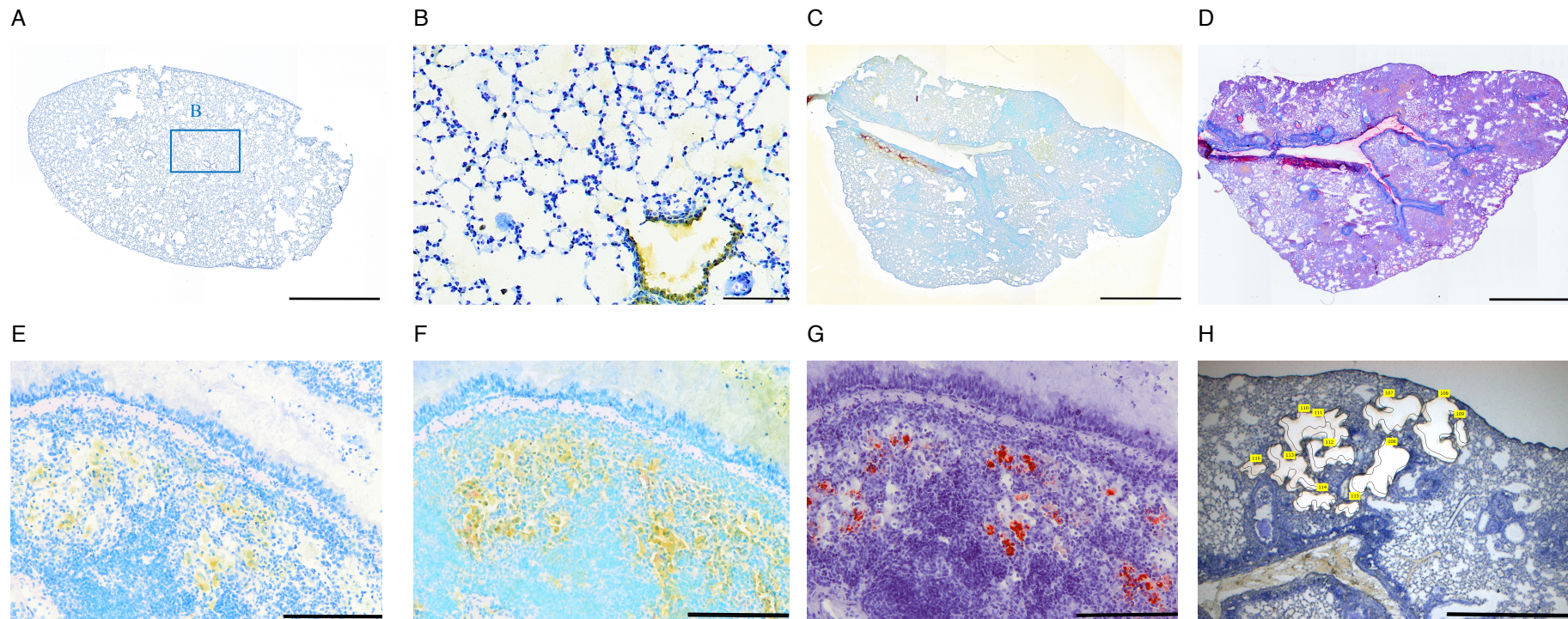
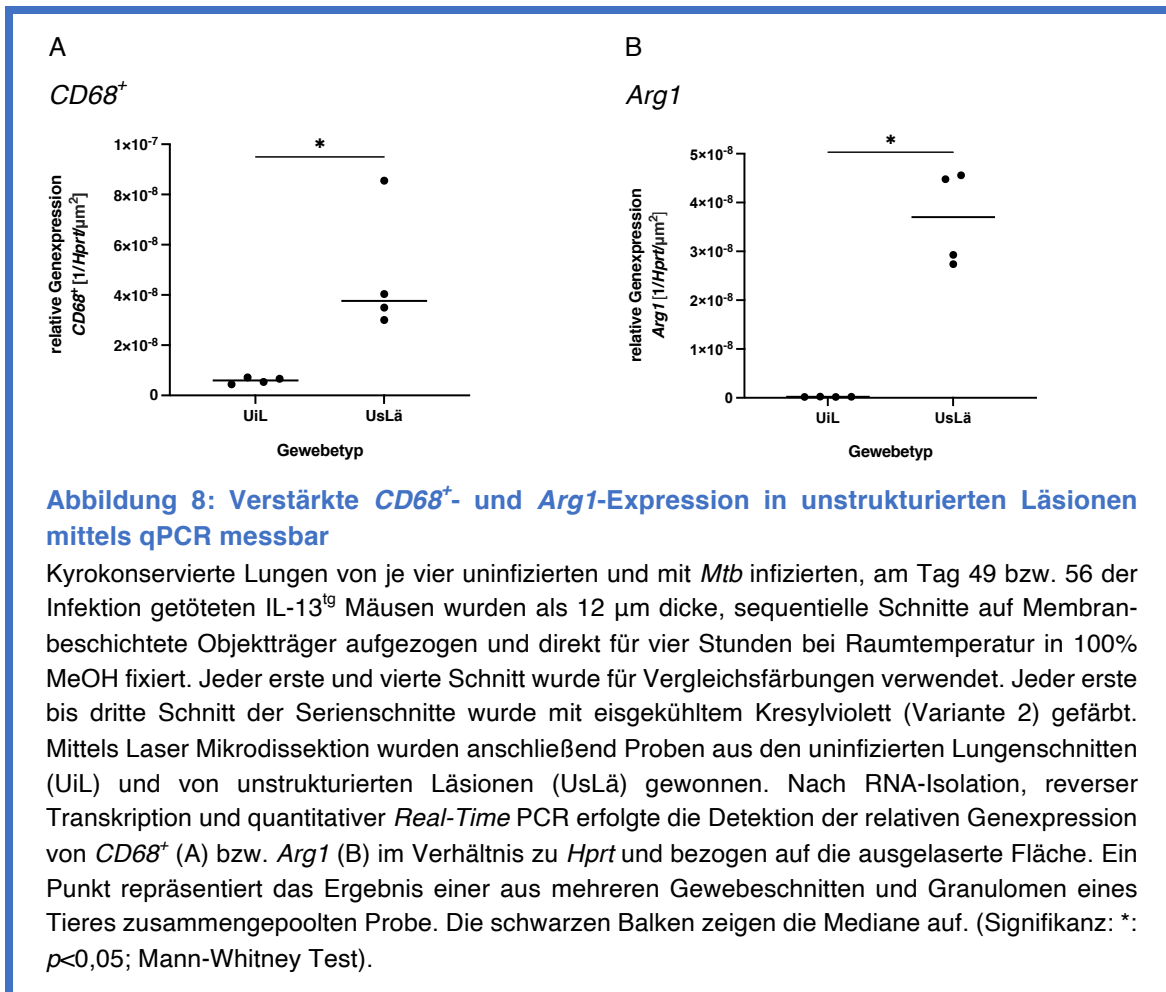


Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis über die Hochregulation der $CD68^+$ - und $Arg1$ -Expression in unstrukturierten Läsionen.

Kyrokonservierte Lungen von je vier uninfizierten und mit *Mtb* infizierten, am Tag 49 bzw. 56 der Infektion getöteten IL-13^{tg} Mäusen wurden als 12 μm dicke, sequentielle Schnitte auf Objektträger aufgezogen und direkt für vier Stunden bei Raumtemperatur in 100% MeOH fixiert. Jeder erste und vierte Schnitt wurde für Vergleichsfärbungen verwendet. Repräsentative Darstellung eines $CD68^+$ -Ziehl-Neelsen gefärbten Lungenschnitts eines uninfizierten Tieres (A) sowie eines 20x vergrößerten Ausschnittes dieses Gewebes (B). Repräsentative Darstellung eines $CD68^+$ -Ziehl-Neelsen (C) und Trichrom (D) gefärbten Lungenschnitts eines infizierten Tieres. Von dem gleichen Tier stammend wurden Schnitte mittels 4% PFA Lösung eine Stunde bei 4°C fixiert und mittels $CD68^+$ -Ziehl-Neelsen- (E), Arginase-1-Ziehl-Neelsen- (F) und Ölrot-O-Färbung (G) behandelt. ((A, C, D) Größenbalken: 2 mm, (B): 100 μm , (E, F, G): 200 μm , (H): 1mm). Jeder erste bis dritte Schnitt der Serienschnitte wurde mit eisgekühltem Kresylviolett (Variante 2) gefärbt. Mittels Laser Mikrodisektion wurden anschließend Proben gewonnen. (H): Repräsentative Darstellung der Probenakquise mittels LCM.



Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von am Tag 100 bzw. 107 nach der Infektion getöteten IL-13^{tg} Mäusen wurden vermehrt sehr große, strukturierte, zentral nekrotisierende Granulome gefunden, die oft aufgrund der Porosität des Gewebes beim Schneiden im Kryotom einrissen. Das nekrotische Zentrum dieser Granulome wurde von einem Saum aus $CD68^+$ positiven (Abbildung 9 B und E) und $Arg1$ exprimierenden Zellen umgeben (Abbildung 9 C), welche von einem fibrotischen Ring (Abbildung 9 A und G) von den umgebenden Lymphozyten abgegrenzt wurden. Innerhalb der Granulome war ein großer Anteil der angefärbten Mykobakterien lokalisiert (Abbildung 9 C und E). Lipidtröpfchen waren sowohl im Schaummakrophagensaum als auch im nekrotischen Zentrum detektierbar (Abbildung 9 D). Mykobakterien- $CD68^+$ -Makrophagenpakete waren aber auch im umliegenden Gewebe (Abbildung 9 B) vorzufinden. Auch zeigten sich Granulome, die nicht den vordefinierten Kriterien für nekrotische Granulome entsprachen (Abbildung 9 A).

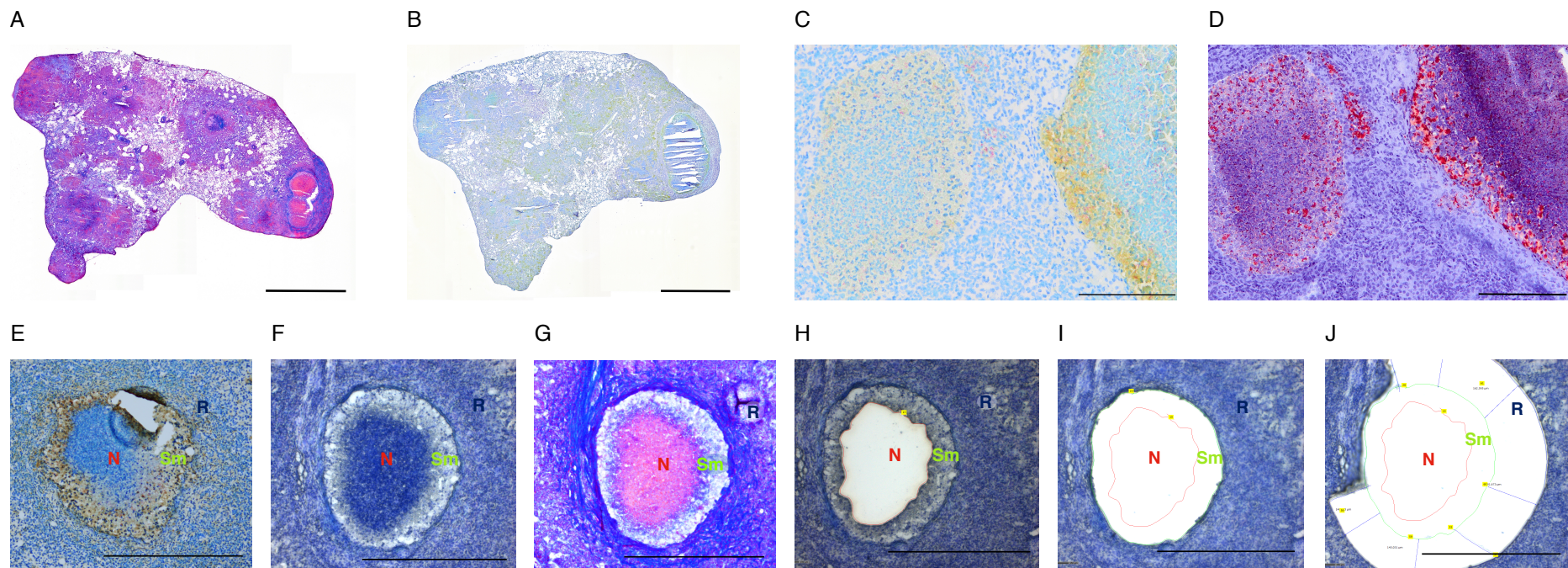
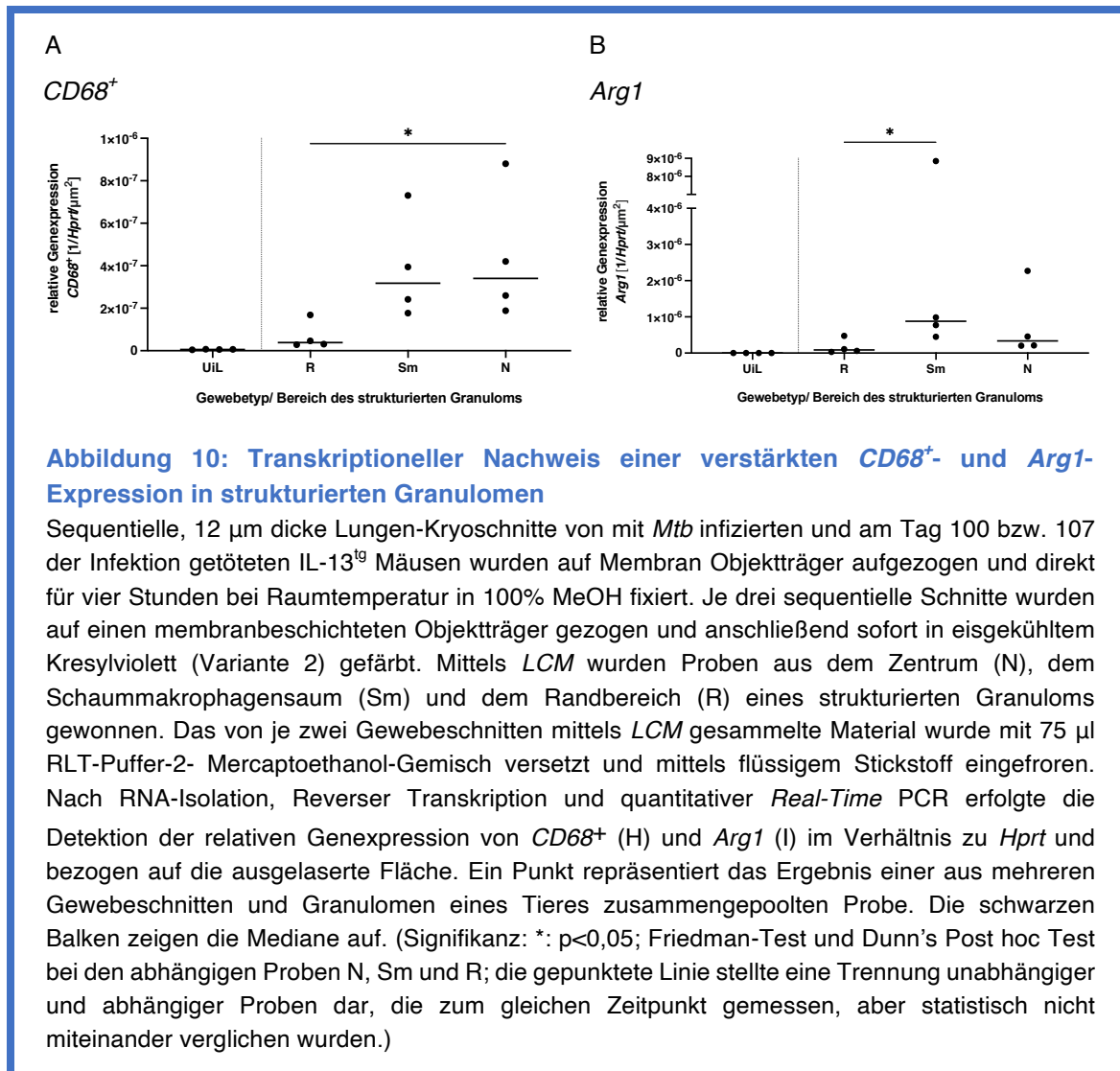


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis einer verstärkten *CD68*⁺- und *Arg1*-Expression in strukturierten Granulomen

Sequentielle, 12 µm dicke Lungen-Kryoschnitte von mit *Mtb* infizierten und am Tag 100 bzw. 107 der Infektion getöteten IL-13^{tg} Mäusen wurden auf Membran-Objektträger aufgezogen und direkt für vier Stunden bei Raumtemperatur in 100% MeOH fixiert. Je drei sequentielle Schnitte wurden auf einen membranbeschichteten Objektträger gezogen und anschließend sofort in eisgekühltem Kresylviolett (Variante 2) gefärbt. Sie wurden später mittels LCM weiterbearbeitet. (F, H-J). Je ein Schnitt davor und danach wurden auf einen Objektträger gezogen und zu einem späteren Zeitpunkt mit einer CD-68⁺-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung (B, E) bzw. Trichromfärbung (A, G) behandelt. Auf diese Weise wurden komplette Lungenlappen aufgeschnitten. (C): Arginase-1-Ziehl-Neelsen-Kombifärbung. (D): Ölrot-O-Färbung. (H-J): Repräsentative Darstellung der Proben Akquise mittels LCM aus dem Zentrum (N), dem Schaummakrophagensaum (Sm) und dem Randbereich (R) eines strukturierten Granuloms. ((A, B): Größenbalken: 2 mm, (E, F, G, H): Größenbalken: 500 µm, (C, D): 200 µm).

Wurden aus den einzelnen Bereichen des nekrotischen Granuloms mittels Laser Mikrodissektion Proben gewonnen (Abbildung 9 H-J) und diese mit Hilfe des *LightCyclers* analysiert, zeigte sich bei der relativen Genexpression ein annähernd ähnliches Bild, wie bei den immunhistochemischen Färbungen (Abbildung 10 A und B). Während allerdings die *Arg1*-Expression im Schaummakrophagensaum gegenüber dem Randbereich statistisch signifikant erhöht war ($p=0,01$ adjustiert, Differenz der Mediane: $7,93 \times 10^{-7}$), war der Unterschied der *CD68⁺*-Expression im Randbereich und dem Schaummakrophagensaum nicht signifikant ($p=0,23$ adjustiert, Differenz der Mediane: $2,79 \times 10^{-7}$). Hier zeigte sich hingegen eine statistisch signifikant verstärkte Expression bei den Proben des nekrotischen Zentrums gegenüber jener des Randbereiches ($p=0,04$ adjustiert, Differenz der Mediane: $3,01 \times 10^{-7}$).



3.2.3 Explorative Betrachtung der Fettstoffwechsellage in Granulomen mittels Laser-Mikrodissektion

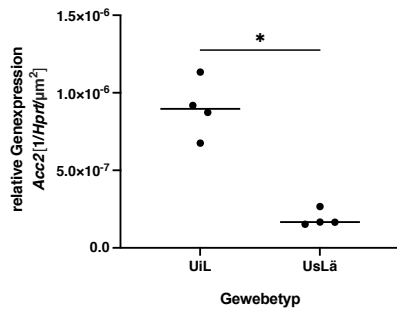
Nachdem histologisch gezeigt wurde, dass unstrukturierte Läsionen und strukturierte Granulome sehr lipidreich sind, wurde ergänzend die Stoffwechsellage auf transkriptioneller Ebene über die Untersuchung ausgewählter Gene des Fettstoffwechsels in mikrodissektierten Proben betrachtet. Wie Abbildung 11 und Abbildung 12 darstellen, zeigte sich, dass in unstrukturierten Läsionen die Expression von *Plin2* ($p=0,029$, Differenz der Mediane: $6,18 \times 10^{-8}$) und *Acs14* ($p=0,029$, Differenz der Mediane: $3,70 \times 10^{-8}$) statistisch signifikant erhöht, während die von *Acc2* ($p=0,029$; Differenz der Mediane: $7,30 \times 10^{-7}$) und *Fabp3* ($p=0,029$, Differenz der Mediane: $3,10 \times 10^{-7}$) gegenüber Proben aus uninfizierten Lungen

statistisch signifikant niedriger war. Bezogen auf die Expression von *Dgat2* zeigte sich kein statistisch relevanter Unterschied ($p=0,20$, Differenz der Mediane: $2,66 \times 10^{-8}$).

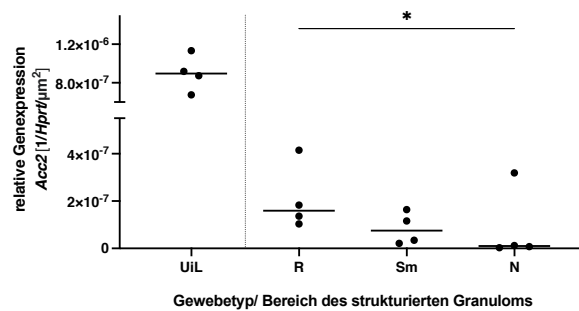
Beim Vergleich unterschiedlicher Bereiche strukturierter Granulome waren lediglich statistisch signifikante Unterschiede zwischen dem nekrotischen Zentrum und dem Randbereich detektierbar (Abbildung 11 und Abbildung 12). Messungen der aus der Schaummakrophagenzone gewonnenen Proben präsentierten zumeist Werte, die zwischen jenen der anderen zwei Bereiche lagen. Signifikant stärkere Genexpression im nekrotischen Zentrum gegenüber dem Randbereich trat sowohl bei der Messung von *Dgat2* ($p=0,040$ adjustiert, Differenz der Mediane: $5,77 \times 10^{-6}$) als auch von *Plin2* ($p=0,014$ adjustiert, Differenz der Mediane: $2,99 \times 10^{-6}$) und *Fabp3* ($p=0,014$ adjustiert, Differenz der Mediane: $1,31 \times 10^{-5}$) auf. Die Expression von *Acc2* war hingegen im nekrotischen Zentrum signifikant schwächer ($p=0,040$, Differenz der Mediane: $1,50 \times 10^{-7}$). Mit Blick auf *Acsf4* stellte sich diese in allen drei Bereichen annähernd gleich dar (Abbildung 12 A). Rein beschreibend, nicht statistisch vergleichend, konnte bei allen Genen mit Ausnahme von *Acc2* eine Hochregulation im strukturierten Granulom gegenüber uninfiziertem Lungengewebe festgestellt werden. Die Expression von *Acc2* schien dagegen im strukturierten Granulom herabgeregelt zu sein.

Acc2

A

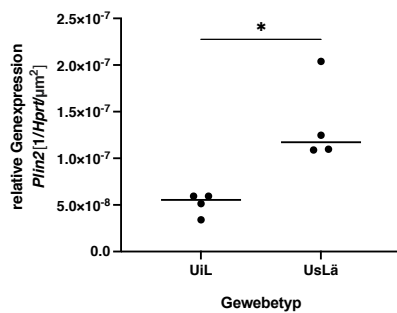


B

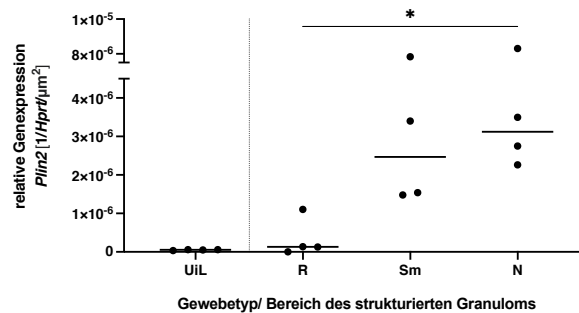


Plin2

C

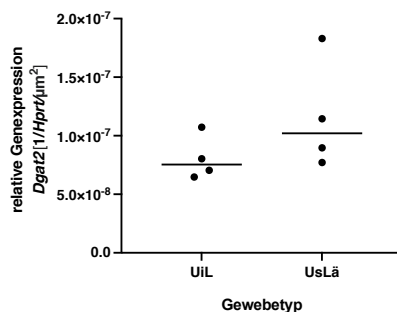


D



Dgat2

E



F

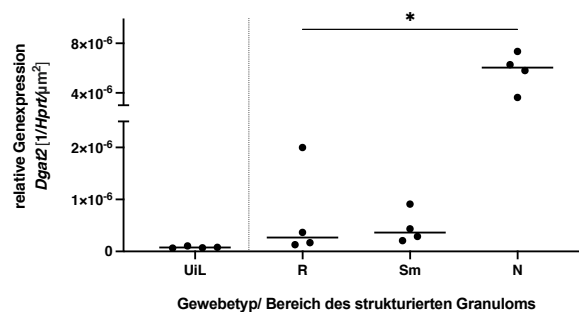
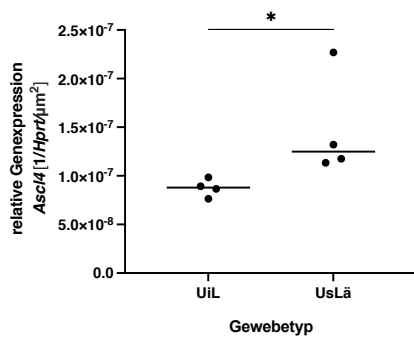


Abbildung 11: Differenzierte Betrachtung der Fettstoffwechsellage, Teil 1

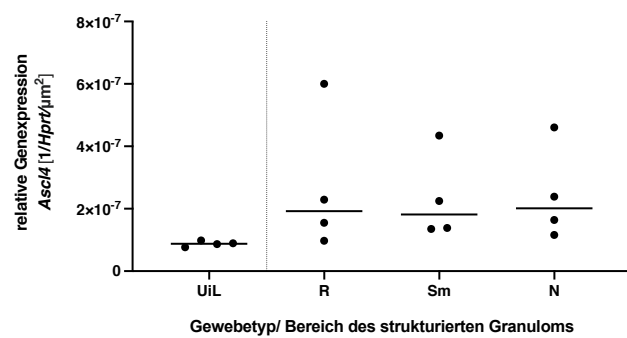
Sequentielle, 12 µm dicke Kryoschnitte von Lungen aus IL-13^{Tg} Mäusen wurden für vier Stunden bei Raumtemperatur in 100% MeOH fixiert und in eisgekühltem Kresylviolett (Variante 2) gefärbt. Mittels LCM wurden anschließend Proben uninfizierter Mäuse (UiL) sowie Proben aus unstrukturierten Läsionen (UsLä) von am Tag 49 bzw. 56 nach Infektion mit *Mtb* getöteten Tieren gesammelt (A, C, E). Ebenfalls wurden mittels Laser-Mikrodissektion aus dem Zentrum (N), dem Schaummakrophagensaum (Sm) und dem Randbereich (R) strukturierter Granulome von am Tag 100 bzw. 107 nach *Mtb*-Infektion getöteten Tieren akquiriert (B, D, F). Das von je zwei Gewebeschnitten gesammelte Material wurde mit 75 µl RLT-Puffer-2-Mercaptoethanol-Gemisch versetzt und mittels flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach RNA-Isolation gepoolter Proben, Reverser Transkription und quantitativer *Real-Time* PCR erfolgte die Detektion der relativen Genexpression von *Acc2* (A, B), *Plin2* (C, D), *Dgat2* (E, F) im Verhältnis zu *Hprt* und bezogen auf die ausgelaserte Fläche. (Signifikanz: *: $p < 0,05$; (A, C, E): Mann-Whitney Test, (B, D, F): Friedman-Test und Dunn's Post hoc Test bei den abhängigen Proben N, Sm und R; Die gepunktete Linie stellte eine Trennung unabhängiger und abhängiger Proben dar, die zum gleichen Zeitpunkt gemessen, aber statistisch nicht miteinander verglichen wurden.)

Acs14

A

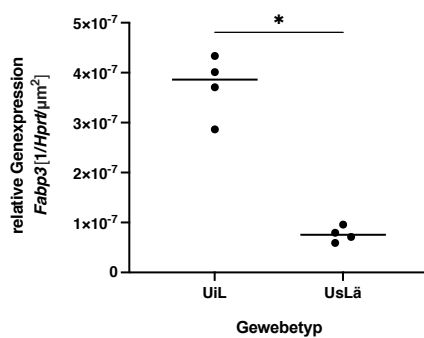


B



Fabp3

C



D

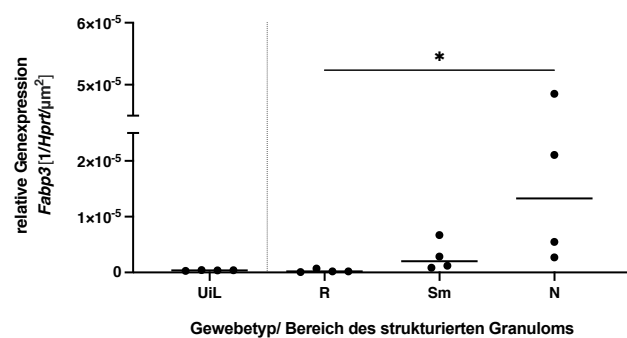


Abbildung 12: Differenzierte Betrachtung der Fettstoffwechsellage, Teil 2

Sequentielle, 12 μm dicke Kryoschnitte von Lungen aus IL-13^{tg} Mäusen wurden auf Membran Objektträger aufgezogen, für vier Stunden bei Raumtemperatur in 100% MeOH fixiert und in eisgekühltem Kresylviolett (Variante 2) gefärbt. Mittels LCM wurden anschließend Proben uninfizierter Mäuse (UiL) sowie Proben aus unstrukturierten Läsionen (UsLä) von am Tag 49 bzw. 56 nach Infektion mit *Mtb* getöteten Tieren gesammelt (A, C). Ebenfalls wurden mittels Laser-Mikrodissektion aus dem Zentrum (N), dem Schaummakrophagensaum (Sm) und dem Randbereich (R) strukturierter Granulome von am Tag 100 bzw. 107 nach *Mtb*-Infektion getöteten Tieren akquiriert (B, D). Das von je zwei Gewebeschnitten gesammelte Material wurde mit 75 μl RLT-Puffer-2-Mercaptoethanol-Gemisch versetzt und mittels flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach RNA-Isolation gepoolter Proben, Reverser Transkription und quantitativer *Real-Time* PCR erfolgte die Detektion der relativen Genexpression von *Acs14* und *Fabp3* im Verhältnis zu *Hprt* und bezogen auf die ausgelaserte Fläche. (Signifikanz: *: $p < 0,05$; (A, C): Mann-Whitney Test (B, D): Friedman-Test und Dunn's Post hoc Test bei den abhängigen Proben N, Sm und R; Die gepunktete Linie stellte eine Trennung unabhängiger und abhängiger Proben dar, die zum gleichen Zeitpunkt gemessen, aber statistisch nicht miteinander verglichen wurden.)

4 Diskussion

4.1 Methanol als erfolgsversprechende Fixierung

Bevor Versuche an infizierten, kryokonservierten Lungenschnitten der II-13^{tg} Maus stattfinden konnten, musste eine Fixierung etabliert werden, die sowohl *Mtb* inaktiviert also auch bestmöglichst die zu untersuchende RNA erhält. Eine Fixierung mit 100% MeOH kristallisierte sich hier in der Verwendung als besonders vorteilhaft heraus.

4.1.1 Temperatur- und Zeitabhängigkeit des Fixierungserfolges

In den bei diesem Projekt durchgeführten Vorversuchen zeigte sich mit Blick auf die Fixierung zur sicheren *Mtb*-Abtötung bei Methanol eine Zeitabhängigkeit. Auch eine Temperaturabhängigkeit des Prozesses ist nicht auszuschließen. Die Versuche konnten aufgreifen, was *Walz et al.* 2019 an ganzen Lungenlappen infizierter Balb/c-Mäuse bereits bewiesen (187): eine Fixierung in Methanol führt zu einer effektiven Inhibierung von *Mtb*-Wachstum. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass bei kryokonservierten Gewebeschnitten keine 24-stündige Fixierungszeit von Nöten ist, sondern bereits weniger Stunden für eine Sterilisation ausreichen. Sehr kurze Fixierungszeiten im Ein-Stunden-Bereich, wie sie bei der Fixierung mit Ethanol von mit *Mtb* angereichertem Sputum angewendet werden können, waren bei Gewebeschnitten allerdings nicht hinreichend erfolgreich (190). Dies könnte daran liegen, dass in kryokonservierten Schnitten deutlich dichteres organisches Material durchdrungen werden muss, welches eine Reduzierung der Effektivität des Alkohols mit sich bringt (13). Des Weiteren könnte ein Grund gewesen sein, dass in unseren Schnitten, anders als in den Sputum-Fixierungsversuchen Mykobakterien stellenweise intrazellulär zu finden sein sollten. Hier könnte die Kühlung der Fixierungslösung bei einer hohen Aktivierungsenergie des Methanols bezogen auf die Permeabilität von Membranen und damit verbundenen Temperaturabhängigkeit dieses Prozesses dazu beigetragen haben, dass zum Teil jene Mykobakterien bei kurzen Inkubationszeiten nicht ausreichend fixiert wurden (18). Dass in diesen Schnitten auch Mykobakterien extrazellulär und

damit mutmaßlich vulnerabler lokalisiert waren, könnte erklären, warum die Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten gegenüber der unfixierten Kontrollgruppe trotzdem reduziert war. Generell könnte die erniedrigte Temperatur der Fixierungslösung die antimykobakteriellen Effekte des Alkohols, wie die Veränderung von Membraneigenschaften und die Auslösung von oxidativem Stress, verlangsamt haben (10, 88). Sie könnte auch dazu geführt haben, dass die Mykolsäuren der Mykobakterienwand in Phasen vorlagen, die weniger methanolsensibel gewesen sein könnten (183). Nach der Feststellung, dass zweistündige Inkubationszeiten bei 4°C bei einer Fixierung mit Methanol nicht ausreichend waren, wurden in der vorliegenden Arbeit die Versuchsansätze um Gruppen mit längeren Fixierungszeiten und höheren -temperaturen ergänzt. Leider war kein Verfahren zur Sicherstellung einer standardisierten Bakterienkonzentration bei der Verwendung von Gewebeschnitten bekannt. Deshalb konnte bei diesen Versuchen in der nicht fixierten Kontrollgruppe, trotz der Verwendung des gleichen Lungenmaterials bzw. von Schnitten mit mutmaßlich hoher Bakterienkonzentration, nicht mehr eine gleich hohe Zahl Kolonien-bildender Einheiten reproduziert werden. Somit waren mutmaßlich auch die Ausgangskonzentrationen in den dann fixierten Gewebeschnitten geringer. Dies könnte dazu geführt haben, dass eine eventuell bestehende Differenz zwischen einer Fixierung bei 4°C und Raumtemperatur nicht herausgearbeitet werden konnte. Ein Beweis der Temperaturabhängigkeit des Fixierungserfolges bei der Verwendung von Methanol blieb also aus. Um trotzdem die Sicherheit der Labormitarbeitenden zu gewährleisten, wurde beschlossen, bei Methanol-Fixierungen eine vierstündige Fixierungszeit der zweistündigen vorzuziehen. Diese Entscheidung basierte auf dem Nachweis, dass eine längere Inkubationszeit mit einer verstärkten Wachstums-Inhibierung einherging.

4% PFA bei 4°C erwies sich auch in der vorliegenden Arbeit an kryokonservierten mit *Mtb*-infizierten IL-13^{tg}-Lungen, wie auch schon an Mykobakterien-Suspensionen und FFPE-Schnitten als durchgehend verlässliche, schnell ablaufende Fixierung (115, 161).

4.1.2 Einfluss der Fixierungen auf die RNA

Schlussfolgerungen über die Qualität der RNA und damit über den Einfluss der Fixierungen auf diese basierten in den ersten Versuchen auf der Annahme, dass sich RNA-Qualität bei qPCR Messungen bei nicht normalisierten Proben u.a. auch durch geringere CP -Werte äußert (54). RNA aus Methanol fixierten Proben ließ sich hierbei sowohl mit dem RNeasy Kit als auch mit dem FFPE-Kit isolieren. Gleichwohl lieferte Ersteres tendenziell bessere qPCR-Ergebnisse, sodass im Folgenden bei Methanol-fixierten Proben nur noch dieses Anwendung fand. Eine *LightCycler*-taugliche RNA-Isolation von PFA-fixierten Proben war unüberraschend nur mittels FFPE-Kit möglich. Da, wie hinlänglich bekannt, PFA als Polymer des Formaldehyds RNA-Modifikationen wie Methylol-Addition an Aminogruppen und Quervernetzungen erzeugt, ist eine Proteinase K-Verdauung wie sie im FFPE-Kit erfolgt, indiziert (121). Eine Behandlung mit Formalin führt des Weiteren zu einer Fragmentierung der RNA (140). Auch wenn Bussolati et al. zeigten, dass dieser Effekt bei Kühlung der Fixierungslösung geringer war, könnte dies gepaart mit der Tatsache, dass das FFPE-Kit weniger selektiv mRNA filtert, der Grund für erhöhte RNA-Konzentrationsmessungen der PFA fixierten Proben im NanoDrop gewesen sein (21). Denn bei diesem werden bei 260 nm nicht nur alle Nukleinsäuren absorbiert (dsDNA, RNA etc.), sondern auch einzelne Nukleotide (150). Umgekehrt könnte man nun schlussfolgern, da Methanol fixierte Proben stetig geringere RNA-Konzentrationen aufwiesen, dass diese weniger degradiert und fragmentiert waren.

RNA-Konzentrationsmessungen mittels NanoDrop stellten, wie zuvor beschrieben, kein geeignetes Mittel dar, um eine definierte Probenmenge zu transkribieren und im *LightCycler* zu messen. Auch waren sie kein geeigneter Parameter zur Normalisierung der gemessenen CP_{Hprt} -Werte im Nachhinein. Um trotzdem einen ausgeglichenen Vergleich vornehmen und eine Aussage darüber treffen zu können, welche Fixierung die RNA am besten erhält, wurden mittels Laser Mikrodisektion exakt bestimmbare Probenmengen gesammelt und die Angabe der gesammelten Fläche zur Normalisierung der CP_{Hprt} -Werte verwendet. Im mikrodisektierten Nierengewebe, welches deutlich zellreicher ist und die Situation infizierten Gewebes eher widerspiegelt, wurde die Methanol-Fixierung bei Raumtemperatur erneut als

besser geeignet bestätigt. Diese Ergebnisse griffen einen Vorteil von Alkohol-basierten Fixierungen bei für die Laser Mikrodisektion vorgesehenen Proben auf, auf den auch Goldsworthy et al. für Aceton und Ethanol bei allerdings kürzeren Fixierungszeiten hinwiesen (63). Interessanterweise zeigte sich bei den Messungen der vorliegenden Arbeit sogar ein RNA-erhaltender Vorteil von einer Fixierung bei Raumtemperatur gegenüber keiner Fixierung. Anders als aufgrund der Erkenntnisse von Bussolati et al. vorab vermutet wurde, ging eine Kühlung des Methanols allerdings nicht mit besseren RNA-Messungen einher (21).

4.2 Messungen von *CD68*⁺- und *Arg1*-Expression bestätigen Laser-Mikrodisektion als räumlich differenzierende Methodik in Granulomen der IL-13^{tg} Maus

Nach der Etablierung einer geeigneten Fixierungsmethode und dem Nachweis, dass trotz dieser unverändert eine RNA-Isolation möglich ist, sollte die Methodik an Lungen aus *Mtb*-infizierten IL-13^{tg}-Mäusen Anwendung finden. Auch hier zeigte sich, dass eine RNA-Isolation trotz vieler potenziell RNA-dezimierender Schritte weiterhin möglich war. Die *LightCycler* Messungen der *CD68*⁺- und *Arg1*-Expression mikrodisektierter unstrukturierter Läsionen und mikrodisektierter Flächen strukturierter Granulome dienten über den Vergleich mit immunhistochemischen Färbungen als Nachweis über die Möglichkeit der Differenzierbarkeit der Stoffwechsellage der verschiedenen Bereiche. Zusätzlich erlaubten sie quantifizierte Vergleiche, welche in den nächsten zwei Unterkapiteln genauer betrachtet und kontextualisiert werden.

4.2.1 *CD68*⁺, kein spezifischer Marker zur Beschreibung der Schaummakrophagenzone in der IL-13^{tg}-Maus

CD68⁺, ein Marker, der gerne zur Detektion von Monozyten und Makrophagen herangezogen und dem eine Rolle bei der Entstehung von Schaumzellen zugeschrieben wird, wurde in der vorliegenden Arbeit für Vergleichsfärbungen verwendet (27). Es gibt Hinweise, dass durch alkoholhaltige Fixierungen die

Anfärbung von CD68⁺ beeinträchtigt wird. Allerdings zeigte sich hier in strukturierten Granulomen infizierter IL-13^{tg}-Mäuse ein ähnliches CD68⁺-Verteilungsmuster, wie es auch schon bei PFA bzw. Formalin fixierten mit dem Erdman-Bakterienstamm infizierten C3HeB/FeJ Mäusen und in Lungen von TB-Patienten aufgezeigt worden war (83, 106, 169). Interessanterweise war bei *LightCycler* Messungen die höchste Expression im Bereich der Nekrose. Die grobe Evaluation immunhistochemischer Färbungen und die Theorie, dass CD68⁺ an der Bildung von Schaumzellen beteiligt ist, hätten anderes vermuten lassen (27). Allerdings hatten auch schon Choi et al. mittels morphometrischer Messungen an Granulomen aus Lungen infizierter TB-Patienten eine solch hohe Expression im nekrotischen Zentrum herausgearbeitet (28). Gehäuft wurde aufgezeichnet, dass die Nekrose innerhalb strukturierter Granulome mit einer durch *Mtb* getriggerten Apoptose bzw. Nekrose der umgebenden Makrophagen assoziiert ist (9, 49). Die hohe Expression von CD68⁺ im nekrotischen Bereich könnte nun als erster Nachweis auf Transkriptom-Ebene genommen werden, dass auch in IL-13^{tg} Mäusen Makrophagen eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Nekrose spielen. Da jedoch auch weitere Zellen wie Fibroblasten und Neutrophile CD68⁺ positiv sein können, wäre eine gezieltere Differenzierung der Zellen mittels weiterer, spezifischerer Zellmarker zur besseren Fundierung dieser Argumentation in Zukunft sinnig (5, 67).

4.2.2 Definierung der Schaummakrophagenzone auf Transkriptionsebene über die Expression von *Arg1*

Deutlich markanter die Schaummakrophagenzone definierend war sowohl bei den immunhistochemischen Färbungen als auch bei den *LightCycler* Messungen die Expression von ARG1 bzw. *Arg1*. Die vorliegende Arbeit zeigt also auf Transkriptom-Ebene, dass schon in unstrukturierten Läsionen Arginase-1 hochreguliert ist, mutmaßlich also alternativ aktivierte Makrophagen diese mitgestalten. Vor allem konnte aber auch die Bedeutung der Arginase-1 im Schaummakrophagensaum anhand der Transkriptomik konsolidiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die quantitative *Arg1*-Expression im Schaummakrophagensaum bedeutender zu sein scheint, als im Randbereich. Dies

bestätigt, was mittels immunhistochemischer Färbungen in der Dissertation von Heitmann gezeigt worden war. Mit diesen Färbungen hatte sich herauskristallisiert, dass alternativ aktivierte Makrophagen und nicht Fibroblasten für die Arginase-Produktion in zentral nekrotisierenden Granulomen der IL-13^{tg} Maus verantwortlich sind (76). Man könnte auf Basis dieser Färbungen und der Messungen der vorliegenden Arbeit spekulieren, dass insbesondere der Schaummakrophagensaum über die verstärkte ARG1-Expression ein Mikromilieu schafft, das für die Mykobakterien besonders förderlich ist. Allerdings fehlen in der vorliegenden Arbeit relativierende *Nos2*-Messungen, zumal Heitmann in ihrer Dissertation immunhistochemisch zeigte, dass Schaummakrophagen ARG-1 und NOS2 koexprimieren. Auch Mattila et al. beschrieben bei nekrotischen Granulomen von *Mtb*-infizierten Makaken eine größere NOS2 als ARG1-Expression in einem an die Nekrose angelagerten Bereich und spekulierten, dass dieser zur Abschirmung der Bakterien nach außen diene (122). Fundiert und sinnvollerweise kann hier an dieser Stelle über die *Arg1*-Messungen also nur konkludiert werden, dass sie über das Aufgreifen der immunhistochemischen Färbeergebnisse zeigen, dass die *LCM* auch am fixierten Granulom der IL-13^{tg} Maus zur differenzierten Betrachtung der Stoffwechsellage beiträgt.

4.3 Lipidstoffwechsellage in Granulomen der IL-13^{tg} Maus

Nachdem die vorliegende Arbeit zeigen konnte, dass mittels *LCM* differenziell Proben gewonnen werden können, die auf Transkriptom-Ebene das aufgriffen, was immunhistochemische Färbungen auf Proteom-Ebene nachgewiesen hatten, wurden als Beispiel der Anwendung in einem explorativen Rahmen Genexpressionsanalysen einzelner Gene durchgeführt. Hierbei wurde ein Fokus auf Gene gesetzt, die Anhaltspunkte über den Status des Lipidstoffwechsels geben können. Dem Lipidstoffwechsel wird eine zentrale Rolle in der Wirt-Pathogen-Interaktion zu gesprochen. Ein lipidreiches Milieu soll hierbei für das Überleben des Pathogens von Vorteil sein. Das ein solches lipidreiches Milieu in der IL-13^{tg} Maus in unstrukturierten Läsionen und in strukturierten Granulomen vorzufinden ist, wurde in der vorliegenden Arbeit, wie auch schon zuvor, histologisch gezeigt.

Untermauert wurde dies zusätzlich durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen. Es konnte gezeigt werden, dass zahlreiche der in diesem Projekt untersuchten Gene verstärkt in den Läsionen und Granulomen exprimiert werden. Im Folgenden wird aufgezeigt, dass die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen größtenteils sinnvoll in den aktuellen Forschungsstand eingeordnet werden können. Dies bestätigt weiter die hier angewendete Methodik der *LCM*. Gleichzeitig werden wir sehen, dass die reinen Genexpressionsanalyse-Daten keine eindeutige Einordnung der Stoffwechsellage der über den Schaummakrophagensaum untersuchten Makrophagen zu einem bestimmten in der Tuberkuloseforschung betrachteten Polarisierungstypen erlauben. Mit Blick auf das nekrotische Zentrum, welches sich bei den Genexpressionsanalysen zumeist absetzte, werden wir feststellen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine Rückschlüsse auf nekrotisch-ferroptotische Prozesse in der IL-13^{tg} Maus zulassen.

4.3.1 Makrophagen und ihr Stoffwechsel in der Tuberkulose-Infektion

Neben dem in der Einleitung beschriebenen Stoffwechsel von Schaummakrophagen werden in der Tuberkulose-Forschung als vereinfachende Kategorisierung zwei Polarisierungsformen und ihr Stoffwechsel unterschieden (164). Zum einen handelt es sich hier um die häufig erwähnten, über Th2-Zytokine polarisierte, alternativ aktivierte Makrophagen, auch antiinflammatorisch M2-Makrophagen (M2) genannt. Zum anderen treten proinflammatorische M1-Makrophagen (M1) auf, die über Th1-Zytokine sowie Lipopolysaccharide (LPS) stimuliert werden. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Lipidstoffwechseldaten greifen einzelne Aspekte unterschiedlicher Stoffwechselformen auf, erlauben jedoch keine eindeutige Zuordnung des Schaummakrophagensaums zu einer der Polarisierungstypen zugeordneten Stoffwechsellage.

Der Stoffwechsel von M1, denen gerne zugeschrieben wird, in der ersten Phase einer Infektion Pathogen-eindämmend hervorzutreten, zeichnet sich durch aerobe Glykolyse im Sinne des Warburg-Effekts mit Aktivierung der Phosphofruktokinase

(PFK2), schneller Produktion von ATP und Ausschüttung von Laktat aus (152, 164, 182). Auch der Pentosephosphatweg wird hochreguliert, während mitochondriale Prozesse wie der Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) runterreguliert werden (75, 152, 180). Dass sich der Warburg-Effekt in Makrophagen in Lungen von C57BL/6 Mäusen in den ersten Tagen einer Tuberkuloseinfektion abspielt, konnten Shi et al. über Hoch- und Runterregulationen entsprechender Gene zeigen (165). Auch Lipogenetische Prozesse spielen sich ab, da unter anderem Fettsäuren als Vorläufer von Lipid-Mediatoren wie Eicosanoiden benötigt werden (36, 59). Regulator dieses Stoffwechsels ist unter anderem HIF-1 α . Dieser wird durch die Stimulation von M1-polarisierenden Substanzen ausgeschüttet und einem sich anhäufenden Intermediat des Citratzyklus, Succinat, sowie dem Endprodukt der Glykolyse, Pyruvat, in einer pseudohypoxischen Situation stabilisiert (105, 114, 131, 163, 175).

Der Stoffwechsel von M2, denen oft eine Aufgabe bei Gewebereparatur und Inflammationsauflösung zugeordnet wird, ist im Gegenzug durch einen intakten, über die β -Oxidation gefütterten Citratzyklus und mitochondriale OXPHOS charakterisiert (66, 179, 152). Auch wenn der Citratzyklus genauso über Glucose bestückt werden kann, kann es bei M2 zu einem energiebringenden Abbau von Fettsäuren im Mitochondrium kommen (133, 180). Auf Transkriptionsebene wird dieser mitochondriale Prozess unter anderem über den Transkriptionsfaktor STAT6 und den Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor- γ -Coaktivator-1 β (PGC-1 β) sowie PPAR γ gesteuert (134, 181). Die IL4/STAT6-Achse dezimiert so die Ansammlung von Lipidtröpfchen (59). Auf posttranslationaler Ebene kann eine Hemmung der Carnitin-Palmitoyltransferase I (CPT1), die beim Transfer von langkettigen Fettsäuren zur β -Oxidation in Mitochondrien beteiligt ist, über Malonyl-CoA erfolgen (108). Malonyl-CoA ist ein Produkt der Acetyl-Coenzyme-A-Carboxylase 1 und 2 (ACC1+2). ACC1 agiert im Zytosol, die Produktion von Malonyl-CoA dient hier vornehmlich der Fettsäuresynthese (118). ACC2 ist in der äußeren mitochondrialen Membran in der Nähe von CPT1 lokalisiert, weshalb man hier insbesondere die hemmende Wirkung auf die β -Oxidation als vordergründige Aufgabe sieht (1, 2). Die in der vorliegenden Arbeit gemessene reduzierte Acc2-

Expression mit einer dann wahrscheinlich folgenden erhöhten β -Oxidation könnte also neben der Expression von *Arg1* Ausdruck einer M2-Stoffwechsellage im Schaummakrophagensaum sein. Brandenburg et al. bestätigten über die Gabe eines ACC2-Inhibitors und darauffolgender reduzierter Lactatdehydrogenaseaktivität den Zusammenhang zwischen β -Oxidation und ACC2 in *Mtb*-infizierten Makrophagen. Sie zeigten mit Immunhistochemischen Färbungen aber auch, dass in Granulomen von MDR-TB-Patient*innen, anders als die Messungen dieser Arbeit vermuten lassen, ACC2 verstärkt an deckungsgleichen Orten wie CD68⁺-Makrophagen, also in dem von uns definiertem Schaummakrophagensaum, auftritt (19). Dies könnte Ausdruck der in der IL-13^{tg} Maus über die IL-13-Achse hervorgerufene, besonders starke M2-Polarisierung sein und einen Unterschied zwischen humanen und Granulomen der IL-13^{tg}-Maus widerspiegeln oder auf der im Kapitel 4.4 aufgezeigten Problematik der verwendeten Proben basieren.

Der bisher beschriebene M2-Stoffwechsel wird durch eine direkte Interaktion mit *Mtb* in eine lipogenetische Richtung gedrückt. So können IL-4-polarisierte Makrophagen *in vitro* bei der Infektion mit *Mtb* eine schaumartige Morphologie entwickeln und die Morphe von Schaummakrophagen annehmen (59). Gleiches kann durch hypoxische Bedingungen eintreten (17). In einem strukturierten Granulom der IL-13^{tg}-Maus ist sowohl die Bedingung der Hypoxie als auch die der Kollokation mit *Mtb* vorzufinden. Das Ergebnis ist unter anderem die histologisch nachweisbare Ansammlung von neutralen Lipiden und Lipidtröpfchen. Diese sind umgeben von einer einschichtigen Phospholipidmembran, in die Proteine eingelagert sind (57, 101). Zu diesen Proteinen zählen auch die Perilipine (PLIN), von denen fünf Isoformen bekannt sind (16, 160). Dem hier untersuchten PLIN2 wird, neben PLIN3, eine besondere Rolle in der Lipidtröpfchenbildung zugeschrieben (87, 20). Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Hochregulation greift also auf Transkriptom-Ebene auch eine lipogenetische Stoffwechsellage auf. Die ihr damit zugeschriebene Bedeutung im Granulom der IL-13^{tg} Maus geht konform mit Untersuchungen von Kim et al.. Diese zeigten, dass in hoch

strukturierten, nekrotisch-käsigen Granulomen von TB-Patienten PLIN2 in makrophagenreichen Bereichen stark exprimiert wurde (97).

Ein anderes Protein, ACSL4, dem Poppelreuther et al. noch abgesprochen hatten von Signifikanz auf Lipidtröpfchen zu sein, scheint bei einer *Mtb*-Infektion auf Lipidtröpfchen von Makrophagen doch an Bedeutung zu gewinnen (124, 143). ACSL4, ist eine der fünf Acyl-CoA-Synthetasen, deren Aufgabe es ist, langkettige Fettsäuren zu aktivieren (168). ACSL4 wird hierbei zugeschrieben, in Makrophagen mit besonderer Vorliebe mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) wie Arachidonsäure zu aktivieren und damit zur Synthese von einem Großteil der Glycerophospholipide wie Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylinositol (PI) beizutragen (103). Die in der vorliegenden Arbeit generell gemessene Hochregulation von *Acs14* gegenüber uninfiziertem Lungengewebe war also erwartungsgemäß. Gleichzeitig zeigte sich, dass sie keine übergeordnete Rolle im Schaummakrophagensaum zu spielen scheint.

Auch wenn die genaue Biogenese von Lipidtröpfchen nicht bekannt ist, scheint der Ort, an dem sie sich abspielt das endoplasmatische Retikulum zu sein (95, 136). An diesem Ort und dynamisch auch in enger Nachbarschaft zu an das endoplasmatische Retikulum gelagerten Lipidtröpfchen wirkt die Diacylglycerol O-Acyltransferase 2 (DGAT2). Diese verestert Diacylglycerol (DAG) in einer Reaktion mit Acyl-CoA zu TAG (112, 171). DGAT2 und DGAT1 sind für einen Großteil der TAG-Bildung in Mäusen verantwortlich, wobei DGAT2 hier oft die dominantere Rolle zugeschrieben wurde (172). Dass diese bei einer *Mtb*-Infektion *Wnt6* abhängig involviert ist, zeigten Messungen von Brandenburg et al. an *BMDM* (19). Interessanterweise zeigten die Daten der vorliegenden Arbeit im Schaummakrophagensaum gegenüber dem Randbereich keine besonders ausgeprägte Hochregulation der Expression von *Dgat2*. Dies könnte einerseits daran liegen, dass in Makrophagen, anders als in Adipozyten, DGAT zwar wichtig aber nicht essentiell für die Bildung von TAG und Lipidtröpfchen ist (74). Andererseits könnte bei einer Tuberkulose-Infektion doch DGAT1 das bedeutendere Enzym sein. Untermauert wird dies durch eine Studie von Dawa et al., bei der sich in Lungenhomogenaten von mit *Mtb*-infizierten C3HeB/FeJ Mäusen

am Tag 14 nach der Infektion eine erhöhte *Dgat1*- bei einer nicht erhöhten *Dgat2*-Expression nachweisen ließ. Zusätzlich zeigten sich in dieser Studie nach einer Injektionsbehandlung des DGAT1-Inhibitors T863 deutlich geringere Ansammlungen von neutralen Lipiden in Granulomen der Tiere sowie eine Reduktion der Mykobakterienlast (32).

Das letzte bisher noch nicht besprochene, aber in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gen ist *Fabp3*. Zu der Familie der FABP gehören neun Mitglieder, die als Chaperone den Lipid-Transport innerhalb der Zelle erleichtern (58). FABP3 wird in Myokardzellen auch eine Rolle bei der Aufnahme von PUFA zu gesprochen (14). In murinen peritonealen Makrophagen führte ein Ausschalten von *Fabp3* nach LPS-Aktivierung zu einer verringerten Schaummakrophagenbildung und zu einer geringeren Expression von Rezeptoren wie CD36, die für die Lipidaufnahme zuständig sind (174). Ein Knockdown in Glioblastom-Zellen zeigte, dass die Bedeutung von FABP3 unter hypoxischen Bedingungen für die Lipidtröpfchenbildung noch verstärkt war (12). Die Autoren dieser Studie zeigten auch, dass unter hypoxischen Bedingungen vermehrt Fettsäuren aufgenommen wurden. Sie schlussfolgerten daraus, dass in der Hypoxie extrazelluläre Fettsäuren von größerer Relevanz bei der Bildung von Lipidtröpfchen sind. Im Bereich der Tuberkuloseforschung ist dieses Gen bisher wenig diskutiert. Nichtsdestotrotz ist die in dieser Arbeit gemessene Hochregulation im strukturierten Granulom kontextgerecht. Während alle anderen hier aufgezeigten Gene in unstrukturierten Läsionen eine ähnliche Tendenz zeigten wie die Messungen der Proben strukturierter Granulome, war die Dynamik der *Fabp3*-Expression eine andere. Bei diesem Gen war die Expression in unstrukturierten Läsionen gegenüber uninfiziertem Gewebe reduziert, während in strukturierten Granulomen eine verstärkte Expression messbar war. Der Grund hierfür könnte eben jener beschriebene Einfluss von Hypoxie auf die Bedeutung von FABP3 sein sowie die Abhängigkeit der Expression von *Fabp3* von Hif-1a (90). Während strukturierte Granulome diese Bedingung erfüllen, ist sie bei unstrukturierten Granulomen mutmaßlich nicht zu finden.

Zusammenfassend zeigte die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Transkriptomik Anzeichen für lipogenetische aber evtl. auch lipolytische Prozesse im nekrotischen Granulom von IL-13^{tg} Mäusen. An dieser Stelle kann allerdings nicht gelöst werden, ob die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Daten Ausdruck einer Repolarisierung von M2 zu M1, gefördert durch die Expression von HIF-1 α in einer hypoxischen Situation bzw. gefördert durch die Infektion mit *Mtb*, sind oder ob die Daten einen Graubereich und damit eine Stoffwechsellage „dazwischen“ widerspiegeln. Auch könnten die Daten eine Koexistenz von M2- und M1-polarisierten Makrophagen aufzeigen. Ein Grund für die fehlende Möglichkeit zur Konklusion auf eine der vorher genannten Optionen ist auch, dass posttranslationale Regulation bei den hier untersuchten Genen eine Rolle spielt (29, 73, 120, 192). Dass eine Repolarisierung grundsätzlich möglich ist, zeigten Van den Bossche et al. (180). Marino et al. zeichneten aber eher eine Koexistenz verschiedener Polarisierungsstadien auf und beschrieben einen Ring aus M2 um einen aus M1 polarisierten Makrophagen in einem strukturierten Granulom von nichtmenschlichen Primaten (119). Die von Heitmann in ihrer Dissertationsschrift veröffentlichten Daten, die neben Arginase-1 und iNOS einzelpositiven Zellen auch doppelpositive Zellen im Saum um die Nekrose zeigten, ließen alle drei Thesen in der IL-13^{tg} Maus zu (76).

4.3.2 Lipidstoffwechsel und Nekrose

Betrachtet man die Ergebnisse der *LightCycler*-Daten der Gene des Lipidstoffwechsels, die in der vorliegenden Arbeit gemessen wurden, fällt auf, dass sich der nekrotische Bereich häufig signifikant gegenüber dem Randbereich absetzt. Mit Blick auf den Schaummakrophagensaum können nur Tendenzen betrachtet werden. Interessanterweise zeigen auch die Ölrot O Färbungen Lipidansammlungen im Zentrum der strukturierten Granulome der IL-13^{tg} Maus. Publikationen von Peyron et al. und Russel et al. legen die Schlussfolgerung nah, dass sich in humanen Granulomen diese Anreicherung lediglich auf den Schaummakrophagensaum bezieht (141, 158). Neuere Daten mikrodisssektierten Materials von Guerrini et al. lassen aber die Annahme zu, dass auch in humanen

Granulomen die Nekrose TAG-reicher als das umliegende Gewebe ist und Kim et al. beschrieben eine starke Anreicherung von PLIN2 im Caseum, dem Zentrum von nekrotisch-verkäsenden Granulomen (70, 97). Guerrini und Gennaro zeichneten zu einem späteren Zeitpunkt auf, dass der Lipidreichtum des Granulomzentrums durch eine Ausschüttung des Zellinhaltes umliegender, absterbender Schaummakrophagen zu Stande kommen könnte (69). Die Daten der vorliegenden Arbeit widersprechen dieser Theorie nicht, suggerieren aber, dass auch im Zentrum eines strukturierten, nekrotischen Granuloms Stoffwechsel noch anteilig stattfindet.

Die oben durchgeführte Einordnung könnte man nun einfach übernehmen und herausarbeiten, dass sich die lipogenetische Stoffwechsellage im Zentrum deutlich ausgeprägter als der Schaummakrophagensaum vom Randbereich absetzt. Wir wollen es hierbei aber nicht belassen und uns an dieser Stelle auch einmal anschauen, ob die Daten der vorliegenden Arbeit nicht vielleicht auch eine nekrotische bzw., um präzise zu sein, eine ferroptische Stoffwechsellage aufgreifen. Ferroptose ist eine Form der regulierten Nekrose, bei der der Lipidstoffwechsel entscheidend involviert ist. Hier können durch ein Übergewicht an freiem Eisen über die sogenannte Fenton-Reaktion radikale Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt werden, die über eine Interaktion mit Membranlipiden Lipidperoxide generieren (37, 38). Normalerweise würden diese durch die Glutathion-Peroxidase 4 (Gpx4) über Glutathion-Oxidation reduziert (196). Bei einer Hemmung der Gpx4 durch beispielsweise den Inhibitor RSL3 kommt es deshalb zu unkontrollierter Anreicherung toxischer Peroxide, was Zelltod zur Folge hat (48, 170). Amaral et al. konnten im Rahmen einer *Mtb*-Infektion von C57BL/6 Mäusen einen Aktivitätsverlust von Gpx4 bei gleichzeitig erhöhten Mengen von freiem Eisen und von Lipidperoxidation nachweisen. Eine Unterdrückung der Letzteren über Ferrostatin-1 (Fer-1) führte hier zu einer Reduktion nekrotischen Zelltodes und zu einer reduzierten Mykobakterienlast. Die Autoren schlossen basierend auf ihren Ergebnissen auf ferroptische Vorgänge bei einer Tuberkuloseinfektion (6). Die Frage, ob sich auch in der zentralen Nekrose von Granulomen der IL-13^{tg} Maus ferroptische Prozesse ereignen, ist also durchaus berechtigt.

Ein Biomarker und Regulator für Ferroptose ist das in der vorliegenden Arbeit untersuchte ACSL4. Die von diesem Enzym abhängige Phospholipid-Komposition sowie die Expression generell führt zu einer erhöhten Anfälligkeit für Ferroptose (39). Kagan et al. arbeiteten heraus, dass insbesondere oxigeniertes PE von der Lipoxygenase weiter oxigeniert wird und in einen ferroptotischen Zelltod leitet (93). Auch die 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE), die über von ACSL4 aktivierte Arachidonsäure entsteht, trug durch ihre lipidtoxische Wirkung in der Leberzelllinie HepG2 und in der humanen Leukämie Zelllinie HL60 zur Ferroptose bei (197). Die Tatsache, dass ACSL4 zwar im strukturierten Granulom exprimiert wird, aber nicht übermäßig im nekrotischen Zentrum würde hier tatsächlich eher gegen ferroptotische Prozesse sprechen. Dies könnte dadurch begründet werden, dass Ferroptose durch Hypoxie und die Induktion von HIF-1a, die sich bei uns durch die Hochregulation von *Fabp3* ausdrückt, unterdrückt wird (56, 195). Aber auch ohne das Wirken von HIF-1a zeigte sich eine Dynamik der *Fabp3*-Expression als Reaktion auf Ferroptose. So führte die Applikation von RSL3 auf eine HT1080 Fibrosarkom-Zelllinie ohne HIF-1a-Expression zu einer verminderten *Fabp3*-Expression, welche nach der Behandlung mit Liproxstatin-1, einem Ferroptose-Hemmer, wieder anstieg (195). Unterdrückt wird Ferroptose auch durch die Aktivierung von Monophosphat aktivierte Protein-Kinase (AMPK) bei Glukosemangel. Diese phosphoryliert und damit inaktiviert ACC, was zur Regulation der Ferroptose beitragen soll (107). Da die Glukosesituation einer Zelle auch unabhängig von AMPK-Einfluss auf die Expression von *Acc2* hat, kann geschlussfolgert werden, dass auch die von uns gemessene Herabregulation im Granulom Ausdruck antiferroptotischer Vorgänge sein könnte (42). Weiterhin zeigte sich in Hepatozyten, dass eine vermehrte Lipidtröpfchenbildung und *Plin2*-Expression mit einer geringeren Lipidperoxidation einherging (7). Lipidtröpfchen wird deshalb eine protektive Wirkung in Bezug auf Ferroptose zugesprochen, was auch Bailey et al. untermauerten. Sie beschrieben, dass Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt seien, PUFAs zum Schutz vor Oxidation in Lipidtröpfchen lagerten (8). Die Hochregulation von *Dgat2* dürfte hier im gleichen Kontext verstanden werden können.

Es zeigten sich also in Granulomen der IL-13^{tg} Maus histologisch Anzeichen für eine nekrotische, aber auf Transkriptions-Ebene keine für eine ferroptische Stoffwechsellage. Im Gegenteil lassen die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Daten eher auf eine antiferroptische Situation schließen. Hier dürften also andere Mechanismen zum Zelltod führen. So könnte es sein, dass sich in der IL13^{tg} Maus eher pryoptotische Vorgänge abspielen. Theobald et al. zeigten kürzlich, dass IL-13^{tg} Mäuse gegenüber Wildtyp Mäusen am Tag 124 nach Infektion eine deutlich verstärkte Expression des *Nlpr3*-Gens aufwiesen, welches bei pryoptotischen Vorgängen eine Rolle spielt (176).

4.4 Problematik der Methodik am Granulomgewebe und analytische Limitationen der Arbeit

Bis zu diesem Punkt konnte gezeigt werden, dass mittels des in der vorliegenden Arbeit etablierten Arbeitsablaufes Daten generierbar sind, die im aktuellen Forschungsstand zu verorten sind. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Methode der *LCM* verwendet werden kann, um differenziell *in vivo* infiziertes Lungengewebe zu untersuchen. Nichtsdestotrotz weist die Methodik, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, Limitationen bezüglich der Qualität der gewonnenen RNA und möglichen Analyseverfahren auf. Die in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse sind deshalb eingeschränkt zu betrachten und sollten in jedem Fall durch zukünftige Studien untermauert und verbessert werden.

Zur Analyse der RNA-Qualität der mittels *LCM* gewonnen Proben aus Granulomen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Qualitätskontrolle mit dem Bioanalyzer durchgeführt. Hier zeigte sich, dass mit der Methodik der vorliegenden Arbeit aus dem stets zuletzt gelaserten Randbereich strukturierter Granulome integrale RNA gewonnen werden konnte. Dies bewies, dass mittels des etablierten Arbeitsablaufes Proben guter Qualität akquiriert werden konnten. Proben, die aus dem Schaummakrophagenbereich und dem nekrotischen Zentrum gewonnen wurden, wiesen jedoch geringe RIN auf. Im nekrotischen Bereich war dies nicht überraschend, führen nekrotische Prozesse doch zu auf RNA wirkenden oxidativen Stress sowie zu einem letztendlichen Stopp von Stoffwechselfvorgängen in Form

von Zelltod mit anschließender Zellfragmentierung (53, 89). Bei den aus dem Schaummakrophagenbereich gewonnenen Proben wären zwei Erklärungsansätze möglich, warum es zu einer Qualitätseinbuße gekommen war: erstens könnte dies ein Zeichen für beginnende nekrotische, RNA degradierende Prozesse in dieser Zone sein. Zweitens könnte aber auch die Laserenergie und die damit verbundene Erhitzung der Objektträgermembran zur Degradierung der RNA beigetragen haben (43). Gerade der Schaummakrophagenbereich ist sehr schmal, sodass, anders als beim Randbereich, sehr viele kleine Elemente statt weniger großer ausgelasert werden mussten. Dies könnte zu einer größeren Laserexposition beigetragen haben. Das Sammeln größerer Mengen Materials, welches sich als RIN-Wert steigernd gezeigt hatte, war aufgrund der Endlichkeit der Granulome pro Tier nur bedingt möglich. Die Akquise einer beliebig großen Fläche zeigte sich hier eingeschränkt.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich *LightCycler*-Messungen durchgeführt. Grund hierfür war auch, dass bei dieser Methodik kleine RNA-Mengen schon gute Ergebnisse liefern. Zusätzlich können durch Normalisierungen mittels Referenzgen und der Verwendung von Amplicons <100 bp die Auswirkungen nicht integrier RNA auf das Messergebnis nicht ausgeglichen, aber evtl. leicht reduziert werden (54, 137). Millier et al. stellten fest, dass die gemessene Genexpression in Proben nekrotischen Materials mutmaßlich jene der in den Proben vorhandenen intakten RNA widerspiegelt (125). Da Zelltod ein dynamischer Prozess ist, könnte die in den Proben aus nekrotischen Material gemessene Genexpression Ausdruck der Stoffwechselaktivität jener Zellen des Granulomzentrums sein, die noch nicht das Stadium des kompletten Zelltodes erreicht hatten (64). Hierbei ist dann die Möglichkeit zu beachten, dass sich in den gesammelten Proben, bezogen auf das gesamte nekrotische Zentrum, eventuell überproportional viele dieser intakteren Zellen befanden. Die Aussagekraft über die Gesamtheit des nekrotischen Zentrums ist also eventuell eingeschränkt. Grund hierfür ist, dass gerade besonders große nekrotische Granulome beim Erstellen der Gewebeschnitte aufgrund ihrer Porosität in ihrem Zentrum zerrissen und die Probenakquise aus dem verbliebenen noch in einem Verbund, häufig am Rand liegendem Gewebe erfolgte (Abbildung 13).

Zusätzlich ist auch der von Millier et al. herausgearbeitete Umstand zu bedenken, dass eine Normalisierung mittels Referenzgenen nur dann adäquate Ergebnisse liefert, wenn der Anteil fragmentierter RNA nicht die 50% überschreitet (125). In unseren Proben war der genaue Anteil fragmentierter RNA nicht bekannt. Auch verwendeten Millier et al. bei ihren Messungen eine digitale PCR, die als noch sensitiver gilt, sodass eine Übertragung der 50% Marke eventuell nicht uneingeschränkt möglich ist. Auf den Punkt gebracht, müssen also trotz vorhandener Argumente, die gesammelten Proben bei schlechter RNA-Integrität zu analysieren, die hier gemessenen Ergebnisse mit Vorsicht genossen werden. Insbesondere die herausgearbeiteten Gruppenunterschiede sind, auch wenn sie sich kontextualisieren lassen, aufgrund der unterschiedlichen RNA-Qualität der verglichenen Gruppen kritisch zu bewerten.

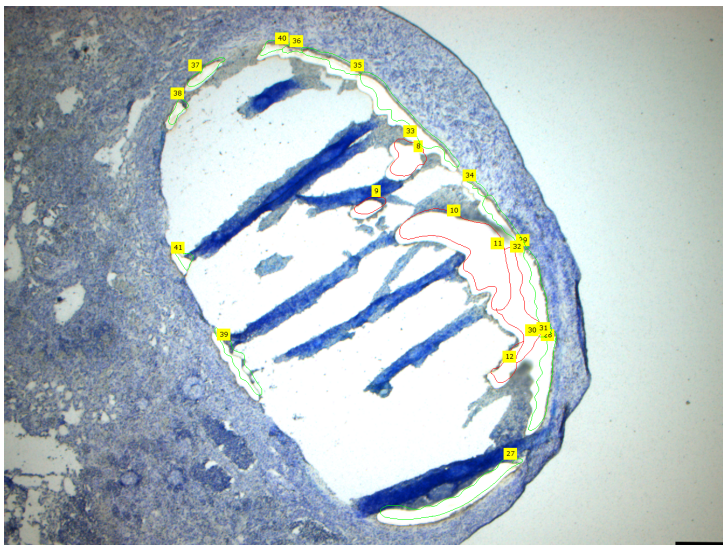


Abbildung 13: Lungschnitt nach Laser-Mikrodissektion.

12 μm dicker, Kresylviolett gefärbter Lungen-Kryoschnitt einer am Tag 107 nach der Infektion mit *Mtb* getöteten IL-13^{tg} Maus nach dem Sammeln von Probenmaterial mittels Laser-Mikrodissektion. Größenbalken: 300 μm .

In der vorliegenden Arbeit erfolgte lediglich ein Vergleich der unterschiedlichen Bereiche eines strukturierten Granuloms untereinander. Aufschlussreich wäre aber auch ein Vergleich der Genexpressionen zwischen unstrukturierten Läsionen und strukturierten Granulomen in ihrer Gesamtheit gewesen, um auch hier Schlussfolgerungen über verschiedene Mikromilieus und Stoffwechsellagen treffen

zu können. Ist ein solcher Vergleich in Zukunft geplant, sollte entweder die Probenakquise unstrukturierter Läsionen von denselben Objektträgern wie die strukturierten Granulome erfolgen oder eine Zusammenführung der gemessenen Ergebnisse der Schaummakrophagenzone und des nekrotischen Zentrums erfolgen. Nur dann könnte man zwei Gruppen gleicher Charakteristik gegenüberstellen und statistisch sauber arbeiten. Die Zusammenfassung der beiden Bereiche könnte in einem gewichteten Mittelwert erfolgen, der die verschiedenen großen Anteile der Bereiche an einem strukturierten Granulom beachtet. Zur Berechnung eines solchen sollte während der Probenakquise der Anteil der verschiedenen Bereiche in den strukturierten Granulomen miterfasst werden. Wären die Bedingungen stetig so wie in Abbildung 9 dargestellt, würde dies unproblematisch über die gelaserte Fläche aufgezeichnet. Da sich, wie bereits erwähnt, die Probenakquise von Granulomen der IL-13^{tg} Mäusen aber häufig wie in Abbildung 13 darstellt, müssten bei dem gesetzten Ziel der Gegenüberstellung strukturierter Granulome und unstrukturierter Läsionen zusätzliche Ausmessungen erfolgen.

Aufgrund des explorativen Charakters der vorliegenden Arbeit wurde mit sehr geringen Stichproben ($n \leq 4$) gearbeitet. Die Präzision der angewendeten statistischen Tests ist demnach ungenau und es ist gut möglich, dass Gruppenunterschiede auch aus statistischer Sicht nicht erkannt wurden. Ebenfalls bedingte die Versuchsgestaltung, dass die verwendeten uninfizierten Tiere nicht zum gleichen Zeitpunkt wie die infizierten Tiere gehalten und getötet wurden. Auch wenn sich die Haltungsbedingungen im Forschungszentrum Borstel nicht verändert hatten, sollte bei weiteren Analysen eine solche zeitliche Differenz vermieden werden.

4.5 Schlüsse der Arbeit und Ausblick

Tragen wir nun, wie es auch Abbildung 14 tut, die Erkenntnis des vorliegenden Projektes nochmal zusammen, können wir feststellen, dass eine Methode und ein Arbeitsablauf etabliert wurden, die es erlauben, Kryoschnitte von Lungen aus *Mtb*-infizierten Mäusen für eine Verwendung außerhalb des BSL3-Labores in 100%

Methanol zu fixieren und aus diesen mittels *LCM* RNA zu gewinnen. Die gewonnene RNA kann durch *LightCycler*-Messungen die Stoffwechselsituation unterschiedlicher Bereiche der heterogenen Tuberkulose-Pathologie beschreiben. Die hierbei generierten Ergebnisse lassen sich histologisch bestätigen und im Forschungsstand sinnvoll einordnen. Die Arbeit trägt somit zum Verständnis der Pathologie in *Mtb*-infizierten IL13^{tg}-Mäusen bei und kann anteilig eine gute Basis für hierauf aufbauende qPCR Analysen verschiedener Läsionstypen darstellen. Hierdurch kann zukünftig das Verständnis lokaler Ereignisse in TB-Läsionen ausgebaut werden.

Eine Einschränkung besonders für weiterführende Transkriptom-Analysen stellt hierbei aber die Qualität der gewonnenen RNA dar. Bei kommenden Projekten sollte deshalb eine Kausalitätsabklärung der RNA-Degradierung beispielsweise in Form eines Assays zur Bestimmung der räumlich differenzierenden RIN (sRIN) erfolgen, wie er von Kvastad et al. beschrieben wurde (104). Sollte sich hier herausstellen, dass das Lasern im Schaummakrophagensaum einen entscheidenden Anteil an der RNA Degradierung hat, sollte darüber nachgedacht werden, ob die Anwendung von *in situ*-Sequenzierung (ISS), räumlich differenzierende Transkriptomik und ähnlichen Methoden, die eine RNA-Sequenzierung vor Ort vornehmen, bzw. bei denen keine Laserenergie zur Anwendung kommt, wie bei der Methode Slide-Seq, sinnvoller sein könnten (96, 109, 153). Sollte sich herausstellen, dass die schlechte RNA Ausdruck beginnender nekrotischer Prozesse im Schaummakrophagensaum ist, und soll die Methodik weiter Anwendung finden, muss sie durch eine detailreichere Definition der die Läsionen bildenden Zelle, sowohl in Bezug auf die Makrophagen als auch andere beteiligte Zellen, verfeinert werden. Außerdem sollte bei zukünftiger Anwendung evaluiert werden, inwiefern eine Verknüpfung mit digitalen Bildverarbeitungsstrategien und künstlicher Intelligenz zur vereinfachten Probenakquise erfolgen könnte (43). Denn wie auch in Kapitel 2.6.2 nachvollzogen werden kann, ist die Methodik bisher mit einem großen Zeit-Input bei relativ geringem RNA-Output verbunden.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Genexpressionsdaten sprechen zusammen mit den histologischen Bildern für eine eher lipogenetische Situation in den Läsionen. Interessanterweise rückt beim quantitativen Vergleich das Zentrum des strukturierten Granuloms in eine gewichtete Position als der Schaummakrophagensaum. Folgt man der Argumentation, dass ein lipidreiches Milieu besonders Mykobakterien-freundlich ist, könnte also ersteres gegenüber letzterem ein vorteilhafteres Umfeld für die Mykobakterien darstellen. Gleichzeitig zeigten unsere Daten auch, dass Arginase-1 tendenziell stärker im Schaummakrophagensaum exprimiert wird. Dieser könnte also ausgeprägter durch promykobakterielle M2 Makrophagen bestimmt sein. Aufschlussreich wäre deshalb, bei zukünftigen Projekten aufbauend auf dem hier verwendeten Arbeitsablauf Mykobakterien-RNA zu isolieren. Mit dieser könnten dann Quantifizierungs- und Genexpressionsanalysen erfolgen. Diese könnten klären, ob die verstärkte Expression von lipogenetischen Genen mit einer vermehrten Ansammlung von Mykobakterien einhergeht oder sich eher ein Arginase-1 reicheres Milieu positiv auf die Mykobakterienzahl auswirkt. Gleichzeitig könnte mittels Genexpressionsanalysen der Frage nachgegangen werden, ob auch in *Mtb*-infizierten IL-13^{tg} Mäusen das lipidreiche Milieu den Übertritt der Mykobakterien in die Dormanz fördert und dormante Mykobakterien im Verlauf der Infektion auftreten.

Insgesamt könnten all diese Ansätze helfen, lokale Vorgänge in *Mtb*-infizierten IL-13^{tg} Mäusen zu verstehen, ihre Vor- und Nachteile als Tiermodell weiter herauszuarbeiten und damit Erkenntnisse über die Pathogenese der TB und mögliche Therapieansätze zu vertiefen

1

Etablierung der Methodik

Effektive Inaktivierung des *Mtb*-Stamm H37Rv in kryokonservierten Lungenschnitten durch Fixierung mittels 4% PFA bei 4°C und 100% MeOH bei 4°C und Raumtemperatur

- Fixierung mittels 100% MeOH stark zeitabhängig, 4-stündige Fixierungszeit zur effektiven Erregerinaktivierung notwendig

RNA-Isolation trotz Fixierung des Materials weiterhin möglich

- Aufbereitung mittels Rneasy Micro Kit gegenüber FFPE-Kit in der Handhabung und bei *LightCycler*-Messungen leicht überlegen

Fixierung mit 100% MeOH bei Raumtemperatur am geeignetsten, wenn auf die Fixierung eine Probenakquise mittels *Laser-Capture-Microdissection* erfolgt

- Fixierung mittels 100% MeOH RNA schonender als Fixierung mittels 4% PFA
- Keine Verbesserung der RNA-Qualität durch Kühlung des Methanols

2

Anwendung der Methodik an Gewebeschnitten der IL-13^{tg} Maus

➤ Erste inhaltliche Rückschlüsse

Möglichkeit der räumlich differenzierenden Genanalyse in infiziertem Lungengewebe der IL-13^{tg} Maus mittels *Laser-Capture-Microdissection*

- Etablierung der Methode an unstrukturierten Läsionen und strukturierten, nekrotischen Granulomen
- Heterogene RNA-Qualität der gewonnenen Proben, Beschränkung der Genexpressionsanalysen auf qPCR-Analysen
- Sinnvolle Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand möglich
- Inhaltliche Rückschlüsse:
 - Erneuter histologischer Nachweis eines lipidreichen Milieus in unstrukturierten Läsionen und strukturierten Granulomen
 - Mit Blick auf den Schaummakrophagensaum:
 - Auf Transkriptionsebene scheint CD68⁺ kein guter Marker zur Beschreibung der Schaummakrophagenzone zu sein
 - Immunhistochemischer und transkriptioneller Nachweis einer verstärkten Arginase-1 Expression
 - Keine eindeutige Zuordnung der Ergebnisse der qPCR-Analysen der Gene *Acc2*, *Plin2*, *Dgat2*, *Fabp3* und *Acs14* zu einer Stoffwechsellege, die die in der TB-Forschung beschriebenen Makrophagen-Polarisationstypen definiert
 - Mit Blick auf die Nekrose
 - Keine Anzeichen für eine ferroptotische Stoffwechsellege

Abbildung 14: Struktur der Arbeit, Teil 2: Antworten

5 Zusammenfassung

Die IL-13-überexprimierende (IL-13^{tg}) Maus entwickelt während einer Tuberkulose-Infektion eine Lungenpathologie, die der humanen sehr ähnelt. Ein besonderes Charakteristikum dieser Pathologie und ein Ort enger Wirt-Pathogen-Interaktion ist das strukturierte, nekrotische Granulom. Außerhalb aber auch innerhalb eines solchen Granuloms entstehen über die Wirt-Pathogen-Interaktion unterschiedliche lokale Mikromilieus. Ziel dieser Arbeit war es deswegen, die Methode der *Laser Capture Microdissection (LCM)* an kryokonservierten Lungenschnitten von mit *Mycobacterium tuberculosis* infizierten IL-13^{tg} Mäuse zu etablieren. Dies sollte ermöglichen, lokal differenzierende Stoffwechselanalysen durchzuführen und sich genauerer Beschreibungen eben jener Milieus zu nähern. In diesem Projekt wurde hierbei methodisch und inhaltlich folgendes herausgearbeitet:

- Die Fixierung kryokonservierter Lungenschnitte mit 4% Paraformaldehyd bei 4°C und 100% Methanol bei 4°C bzw. Raumtemperatur führte zu einer effektiven Inaktivierung des Erregers. Wurden Proben aus diesen Schnitten mittels *LCM* generiert, bewies sich die Fixierung mit 100% Methanol bei Raumtemperatur am praktikabelsten und am schonendsten für die RNA. Hierauf aufbauend ließ sich ein Arbeitsablauf zur Gewinnung von Proben aus unstrukturierten Läsionen und strukturierten, nekrotischen Granulomen etablieren. Trotz anteilig geringer RNA-Qualität der Proben aus strukturierten, nekrotischen Granulomen ließen sich qPCR-Analysen durchführen und deren Ergebnisse größtenteils sinnvoll im Forschungsstand verorten.
- Auch wenn die Hochregulation der *Arginase1*-Expression im Schaummakrophagensaum auf eine M2-Polarisierung dieser Makrophagen hindeutete, ließ sich diese Zuordnung mit Blick auf den Lipidstoffwechsel hier nicht treffen. Die gewonnenen Ergebnisse sprechen gegen ferroptotische Prozesse innerhalb strukturierter, nekrotischer Granulome.

Die in dieser Arbeit etablierte Methode könnte also trotz ihrer noch vorhandenen Schwächen helfen, lokale Vorgänge in der IL-13^{tg} Maus zu verstehen und ihre Vor- bzw. Nachteile als Tiermodell weiter herauszuarbeiten.

Literaturverzeichnis

1. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ (2000) The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci* 97: 1444–1449
2. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ (2001) Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 291: 2613–2616
3. Agilent Technologies (2016) Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide
4. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Töröcsik D, D'Ávila H, Dezsö B, Magalhães KG, Castro-Faria-Neto HC, Nagy L, Bozza PT (2009) Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin Infection Induces TLR2-Dependent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Expression and Activation: Functions in Inflammation, Lipid Metabolism, and Pathogenesis. *J Immunol* 183: 1337–1345
5. Amanzada A, Malik IA, Blaschke M, Khan S, Rahman H, Ramadori G, Moriconi F (2013) Identification of CD68(+) neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Pathol* 6: 561–570
6. Amaral EP, Costa DL, Namasivayam S, Riteau N, Kamenyeva O, Mittereder L, Mayer-Barber KD, Andrade BB, Sher A (2019) A major role for ferroptosis in Mycobacterium tuberculosis-induced cell death and tissue necrosis. *J Exp Med* 216: 556–570
7. Bai Y, Meng L, Han L, Jia Y, Zhao Y, Gao H, Kang R, Wang X, Tang D, Dai E (2019) Lipid storage and lipophagy regulates ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 508: 997–1003
8. Bailey AP, Koster G, Guillermier C, Hirst EMA, MacRae JI, Lechene CP, Postle AD, Gould AP (2015) Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of Drosophila. *Cell* 163: 340–353
9. Behar SM, Martin CJ, Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan H-X, Divangahi M, Remold HG (2011) Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunol* 4: 279–287
10. Belkin S, Smulski DR, Vollmer AC, Van Dyk TK, LaRossa RA (1996) Oxidative stress detection with Escherichia coli harboring a katG': lux fusion. *Appl Environ Microbiol* 62: 2252–2256
11. Belton M, Brilha S, Manavaki R, Mauri F, Nijran K, Hong YT, Patel NH, Dembek M, Tezera L, Green J, et al. (2016) Hypoxia and tissue destruction in pulmonary TB. *Thorax* 71: 1145–1153
12. Bensaad K, Favaro E, Lewis CA, Peck B, Lord S, Collins JM, Pinnick KE, Wigfield S, Buffa FM, Li J-L, et al. (2014) Fatty Acid Uptake and Lipid Storage Induced by HIF-1 α Contribute to Cell Growth and Survival after Hypoxia-Reoxygenation. *Cell Rep* 9: 349–365
13. Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kennedy ME (1990) Efficacies of selected disinfectants against Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 28: 2234–2239
14. Binas B, Danneberg H, McWhir J, Mullins L, Clark AJ (1999) Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *FASEB J* 13: 805–812
15. Blackwood KS, Burdz TV, Turenne CY, Sharma MK, Kabani AM, Wolfe JN (2005) Viability testing of material derived from Mycobacterium tuberculosis prior to removal from a Containment Level-III Laboratory as part of a Laboratory Risk Assessment Program. *BMC Infect Dis* 5: 4

16. Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Barber T, Coxey RA, Takeda T, Rondinone CM, Theodorakis JL, Greenberg AS, Londos C (1995) Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* 36: 1211–1226
17. Boström P, Magnusson B, Svensson P-A, Wiklund O, Borén J, Carlsson LMS, Ståhlman M, Olofsson S-O, Hultén LM (2006) Hypoxia Converts Human Macrophages Into Triglyceride-Loaded Foam Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1871–1876
18. Brahm J (1983) Permeability of human red cells to a homologous series of aliphatic alcohols. Limitations of the continuous flow-tube method. *J Gen Physiol* 81: 283–304
19. Brandenburg J, Marwitz S, Tazoll SC, Waldow F, Kalsdorf B, Vierbuchen T, Scholzen T, Gross A, Goldenbaum S, Hölscher A, et al. (2021) WNT6/ACC2-induced storage of triacylglycerols in macrophages is exploited by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 131: e141833
20. Bulankina AV, Deggerich A, Wenzel D, Mutenda K, Wittmann JG, Rudolph MG, Burger KNJ, Höning S (2009) TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol* 185: 641–655
21. Bussolati G, Annaratone L, Medico E, D'Armento G, Sapino A (2011) Formalin Fixation at Low Temperature Better Preserves Nucleic Acid Integrity. *PLOS ONE* 6: e21043
22. Cadena AM, Fortune SM, Flynn JL (2017) Heterogeneity in tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 17: 691–702
23. Carl Zeiss Microscopy (2012) LCM Protocols – RNA handling. URL:https://cfim.ku.dk/equipment/light-microscopes/palm/Zeiss_labprotocol_RNAhandling.pdf [Zugegriffen: 24. Oktober 2022]
24. Chakravarty SD, Zhu G, Tsai MC, Mohan VP, Marino S, Kirschner DE, Huang L, Flynn J, Chan J (2008) Tumor Necrosis Factor Blockade in Chronic Murine Tuberculosis Enhances Granulomatous Inflammation and Disorganizes Granulomas in the Lungs. *Infect Immun* 76: 916–926
25. Chedore P, Th'ng C, Nolan DH, Churchwell GM, Sieffert DE, Hale YM, Jamieson F (2002) Method for Inactivating and Fixing Unstained Smear Preparations of *Mycobacterium tuberculosis* for Improved Laboratory Safety. *J Clin Microbiol* 40: 4077–4080
26. Chen EA, Souaiaia T, Herstein JS, Evgrafov OV, Spitsyna VN, Rebolini DF, Knowles JA (2014) Effect of RNA integrity on uniquely mapped reads in RNA-Seq. *BMC Res Notes* 7: 753
27. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV (2017) CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 97: 4–13
28. Choi H-S, Rai PR, Chu HW, Cool C, Chan ED (2002) Analysis of Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine Expression in Human Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 178–186
29. Choi K, Kim H, Kang H, Lee S-Y, Lee SJ, Back SH, Lee SH, Kim MS, Lee JE, Park JY, et al. (2014) Regulation of diacylglycerol acyltransferase 2 protein stability by gp78-associated endoplasmic-reticulum-associated degradation. *FEBS J* 281: 3048–3060
30. Cohen SB, Gern BH, Delahaye JL, Adams KN, Plumlee CR, Winkler JK, Sherman DR, Gerner MY, Urdahl KB (2018) Alveolar Macrophages Provide an Early *Mycobacterium tuberculosis* Niche and Initiate Dissemination. *Cell Host Microbe* 24: 439-446.e4
31. Daniel J, Maamar H, Deb C, Sirakova TD, Kolattukudy PE (2011) *Mycobacterium tuberculosis* Uses Host Triacylglycerol to Accumulate Lipid Droplets and Acquires a Dormancy-Like Phenotype in Lipid-Loaded Macrophages. *PLOS Pathog* 7: e1002093

32. Dawa S, Menon D, Arumugam P, Bhaskar AK, Mondal M, Rao V, Gandotra S (2021) Inhibition of Granuloma Triglyceride Synthesis Imparts Control of Mycobacterium tuberculosis Through Curtailed Inflammatory Responses. *Front Immunol* 12: 722735
33. Day TA, Koch M, Nouailles G, Jacobsen M, Kosmiadi GA, Miekley D, Kuhlmann S, Jörg S, Gamradt P, Mollenkopf H-J, et al. (2010) Secondary lymphoid organs are dispensable for the development of T-cell-mediated immunity during tuberculosis. *Eur J Immunol* 40: 1663–1673
34. De Marchi T, Braakman RBH, Stingl C, van Duijn MM, Smid M, Foekens JA, Luider TM, Martens JWM, Umar A (2016) The advantage of laser-capture microdissection over whole tissue analysis in proteomic profiling studies. *PROTEOMICS* 16: 1474–1485
35. Del Portillo P, García-Morales L, Menéndez MC, Anzola JM, Rodríguez JG, Helguera-Repetto AC, Ares MA, Prados-Rosales R, Gonzalez-y-Merchand JA, García MJ (2019) Hypoxia Is Not a Main Stress When Mycobacterium tuberculosis Is in a Dormancy-Like Long-Chain Fatty Acid Environment. *Front Cell Infect Microbiol* 8: 449
36. Dennis EA, Deems RA, Harkewicz R, Quehenberger O, Brown HA, Milne SB, Myers DS, Glass CK, Hardiman G, Reichart D, et al. (2010) A Mouse Macrophage Lipidome. *J Biol Chem* 285: 39976–39985
37. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, et al. (2012) Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149: 1060–1072
38. Dixon SJ, Stockwell BR (2014) The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol* 10: 9–17
39. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I, Irmeler M, Beckers J, Aichler M, Walch A, et al. (2017) ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat Chem Biol* 13: 91–98
40. Domingo-Gonzalez R, Prince O, Cooper A, Khader SA (2016) Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection. *Microbiol Spectr* 4: 10.1128/microbiolspec.tbtb2-0018-2016
41. Douglas-Jones AG, Duddridge LR, Jenkins PA (1990) Killing of Mycobacterium tuberculosis in tissue by microwaves with simultaneous tissue fixation. *Tubercle* 71: 7–13
42. Du J, Chen Q, Takemori H, Xu H (2008) SIK2 Can be Activated by Deprivation of Nutrition and It Inhibits Expression of Lipogenic Genes in Adipocytes. *Obesity* 16: 531–538
43. von Eggeling F, Hoffmann F (2020) Microdissection—An Essential Prerequisite for Spatial Cancer Omics. *PROTEOMICS* 20: 2000077
44. Ehlers S, Schaible U (2013) The Granuloma in Tuberculosis: Dynamics of a Host–Pathogen Collusion. *Front Immunol* 3: 411
45. Emson CL, Bell SE, Jones A, Wisden W, McKenzie ANJ (1998) Interleukin (IL)-4–independent Induction of Immunoglobulin (Ig)E, and Perturbation of T Cell Development in Transgenic Mice Expressing IL-13. *J Exp Med* 188: 399–404
46. Esaki H, Ewald DA, Ungar B, Rozenblit M, Zheng X, Xu H, Estrada YD, Peng X, Mitsui H, Litman T, et al. (2015) Identification of novel immune and barrier genes in atopic dermatitis by means of laser capture microdissection. *J Allergy Clin Immunol* 135: 153–163
47. Evers DL, He J, Kim YH, Mason JT, O’Leary TJ (2011) Paraffin Embedding Contributes to RNA Aggregation, Reduced RNA Yield, and Low RNA Quality. *J Mol Diagn* 13: 687–694

48. Fan B-Y, Pang Y-L, Li W-X, Zhao C-X, Zhang Y, Wang X, Ning G-Z, Kong X-H, Liu C, Yao X, et al. (2021) Liproxstatin-1 is an effective inhibitor of oligodendrocyte ferroptosis induced by inhibition of glutathione peroxidase 4. *Neural Regen Res* 16: 561–566
49. Fayyazi A, Eichmeyer B, Soruri A, Schweyer S, Herms J, Schwarz P, Radzun HJ (2000) Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis. *J Pathol* 191: 417–425
50. Feja K, Saiman L (2005) Tuberculosis in Children. *Clin Chest Med* 26: 295–312
51. Fenhalls G, Stevens L, Moses L, Bezuidenhout J, Betts JC, Helden P van, Lukey PT, Duncan K (2002) In Situ Detection of Mycobacterium tuberculosis Transcripts in Human Lung Granulomas Reveals Differential Gene Expression in Necrotic Lesions. *Infect Immun* 70: 6330–6338
52. Fenhalls G, Stevens L, Moses L, Bezuidenhout J, Betts JC, Helden P van, Lukey PT, Duncan K (2002) In Situ Detection of Mycobacterium tuberculosis Transcripts in Human Lung Granulomas Reveals Differential Gene Expression in Necrotic Lesions. *Infect Immun* 70: 6330–6338
53. Fink SL, Cookson BT (2005) Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect Immun* 73: 1907–1916
54. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28: 1601–1613
55. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR (1995) Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* 2: 561–572
56. Fuhrmann DC, Mondorf A, Beifuß J, Jung M, Brüne B (2020) Hypoxia inhibits ferritinophagy, increases mitochondrial ferritin, and protects from ferroptosis. *Redox Biol* 36: 101670
57. Fujimoto T, Parton RG (2011) Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a004838
58. Furuhashi M, Hotamisligil GS (2008) Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 7: 489–503
59. Genoula M, Franco JLM, Maio M, Dolotowicz B, Ferreyra M, Milillo MA, Mascarau R, Moraña EJ, Palmero D, Matteo M, et al. (2020) Fatty acid oxidation of alternatively activated macrophages prevents foam cell formation, but Mycobacterium tuberculosis counteracts this process via HIF-1 α activation. *PLOS Pathog* 16: e1008929
60. Gideon HP, Phuah J, Myers AJ, Bryson BD, Rodgers MA, Coleman MT, Maiello P, Rutledge T, Marino S, Fortune SM, et al. (2015) Variability in Tuberculosis Granuloma T Cell Responses Exists, but a Balance of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines Is Associated with Sterilization. *PLOS Pathog* 11: e1004603
61. Gillespie JW, Best CJM, Bichsel VE, Cole KA, Greenhut SF, Hewitt SM, Ahrum M, Gathright YB, Merino MJ, Strausberg RL, et al. (2002) Evaluation of Non-Formalin Tissue Fixation for Molecular Profiling Studies. *Am J Pathol* 160: 449–457
62. Global tuberculosis report 2023. (2023). World Health Organization. Genf. URL:<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/373828/9789240083851-eng.pdf?sequence=1>
[Zugegriffen: 16. April 2024]

63. Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, Foley JF, Maronpot RR (1999) Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol Carcinog* 25: 86–91
64. Golstein P, Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32: 37–43
65. Gomez JE, McKinney JD (2004) M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis* 84: 29–44
66. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23–35
67. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peuker A, Müller A, Kastenberger M, Brockhoff G, Andreesen R, Kreutz M (2008) Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types. *Scand J Immunol* 67: 453–463
68. Gradmann C (2006) Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. *Microbes Infect* 8: 294–301
69. Guerrini V, Gennaro ML (2019) Foam Cells: One Size Doesn't Fit All. *Trends Immunol* 40: 1163–1179
70. Guerrini V, Prideaux B, Blanc L, Bruiners N, Arrigucci R, Singh S, Ho-Liang HP, Salamon H, Chen P-Y, Lakehal K, et al. (2018) Storage lipid studies in tuberculosis reveal that foam cell biogenesis is disease-specific. *PLOS Pathog* 14: e1007223
71. Guidelines on the Management of Latent Tuberculosis Infection. (2015) World Health Organization. Genf.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK293818/>
[Zugegriffen: 21. September 2022]
72. Guirado E, Schlesinger LS (2013) Modeling the Mycobacterium tuberculosis Granuloma – the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. *Front Immunol* 4: 98
73. Ha J, Daniel S, Broyles SS, Kim KH (1994) Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *J Biol Chem* 269: 22162–22168
74. Harris CA, Haas JT, Streeper RS, Stone SJ, Kumari M, Yang K, Han X, Brownell N, Gross RW, Zechner R, et al. (2011) DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* 52: 657–667
75. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, Knapp B, Haas R, Schmid JA, Jandl C, et al. (2012) The Sedoheptulose Kinase CARKL Directs Macrophage Polarization through Control of Glucose Metabolism. *Cell Metab* 15: 813–826
76. Heitmann L (2011) Die Interleukin-13/Interleukin-4 Rezeptor alpha-abhängige Granulomnekrone in Mycobacterium tuberculosis infizierten Mäusen als Modell der humanen post-primären Tuberkulose. *Naturwiss. Diss. Lübeck.*
77. Heitmann L, Abad Dar M, Schreiber T, Erdmann H, Behrends J, Mckenzie AN, Brombacher F, Ehlers S, Hölscher C (2014) The IL-13/IL-4R α axis is involved in tuberculosis-associated pathology. *J Pathol* 234: 338–350
78. Herman P, Fauville-Dufaux M, Breyer D, Vaerenbergh BV, Pauwels K, Thi CDD, Sneyers M, Wanlin M, Snacken R, Moens W (2006) Biosafety Recommendations for the Contained Use of Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates in Industrialized Countries. Scientific Institute of Public Health. Brüssel
79. Hölscher C, Heitmann L, Owusu-Dabo E, Horstmann RD, Meyer CG, Ehlers S, Thye T (2016) A Mutation in IL4RA Is Associated with the Degree of Pathology in Human TB Patients. *Mediators Inflamm* 2016: 4245028

80. Holzheimer M, Buter J, Minnaard AJ (2021) Chemical Synthesis of Cell Wall Constituents of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Rev* 121: 9554–9643
81. Horsburgh CR, O'Donnell M, Chamblee S, Moreland JL, Johnson J, Marsh BJ, Narita M, Johnson LS, von Reyn CF (2010) Revisiting Rates of Reactivation Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 420–425
82. Huang L, Ye K, McGee MC, Nidetz NF, Elmore JP, Limper CB, Southard TL, Russell DG, August A, Huang W (2020) Interleukin-2-Inducible T-Cell Kinase Deficiency Impairs Early Pulmonary Protection Against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Front Immunol* 10: 3103
83. Huang Z, Luo Q, Guo Y, Chen J, Xiong G, Peng Y, Ye J, Li J (2015) *Mycobacterium tuberculosis*-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro. *PLOS ONE* 10: e0129744
84. Hunter RL, Actor JK, Hwang S-A, Khan A, Urbanowski ME, Kaushal D, Jagannath C (2018) Pathogenesis and Animal Models of Post-Primary (Bronchogenic) Tuberculosis, A Review. *Pathogens* 7: 19
85. Hunter RL, Jagannath C, Actor JK (2007) Pathology of postprimary tuberculosis in humans and mice: Contradiction of long-held beliefs. *Tuberculosis* 87: 267–278
86. Hwang S-A, Ali Y, Fedotova E, Hunter RL, Brown RE (2020) Morphoproteomics Identifies the Foamy Alveolar Macrophage as an M2 Phenotype with PD-L1 Expression in the Early Lesion of Post-Primary Tuberculosis: Implications for Host Immune Surveillance and Therapy. *Ann Clin Lab Sci* 50: 429–438
87. Imamura M, Inoguchi T, Ikuyama S, Taniguchi S, Kobayashi K, Nakashima N, Nawata H (2002) ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 283: E775–E783
88. Ingram LO (1976) Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J Bacteriol* 125(2): 670–678
89. Ishii T, Sekiguchi M (2019) Two ways of escaping from oxidative RNA damage: Selective degradation and cell death. *DNA Repair* 81: 102666
90. Jadoon A, Cunningham P, McDermott LC (2015) Regulation of fatty acid binding proteins by hypoxia inducible factors 1 α and 2 α in the placenta: Relevance to pre-eclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 93: 25–29
91. Jamaati H, Mortaz E, Pajouhi Z, Folkerts G, Movassaghi M, Moloudizargari M, Adcock IM, Garssen J (2017) Nitric Oxide in the Pathogenesis and Treatment of Tuberculosis. *Front Microbiol* 8: 2008
92. Jensen PA, Lambert LA, Iademarco MF, Ridzon R (2005) Guidelines for Preventing the Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Settings, 2005. *MMWR* 2005 54: 1–141
93. Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JPF, Doll S, Croix CS, Dar HH, Liu B, Tyurin VA, Ritov VB, et al. (2017) Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol* 13: 81–90
94. Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, Mathema B, Ramaswamy SV, Walther G, Steyn LM, et al. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect Immun* 71: 7099–7108
95. Kassan A, Herms A, Fernández-Vidal A, Bosch M, Schieber NL, Reddy BJN, Fajardo A, Gelabert-Baldrich M, Tebar F, Enrich C, et al. (2013) Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains. *J Cell Biol* 203: 985–1001

96. Ke R, Mignardi M, Pacureanu A, Svedlund J, Botling J, Wählby C, Nilsson M (2013) In situ sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells. *Nat Methods* 10: 857–860
97. Kim M-J, Wainwright H, Lockett M, Bekker L-G, Walther G, Dittrich C, Visser A, Wang W, Hsu F-F, Wiehart U, et al. (2010) Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Mol Med* 2: 258–74
98. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P (1989) The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56: 731–740
99. Knight M, Braverman J, Asfaha K, Gronert K, Stanley S (2018) Lipid droplet formation in Mycobacterium tuberculosis infected macrophages requires IFN- γ /HIF-1 α signaling and supports host defense. *PLOS Pathog* 14: e1006874
100. Kokesch-Himmelreich J, Treu A, Race AM, Walter K, Hölscher C, Römpf A (2022) Do Anti-tuberculosis Drugs Reach Their Target?—High-Resolution Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging Provides Information on Drug Penetration into Necrotic Granulomas. *Anal Chem* 94: 5483–5492
101. Krahmer N, Hilger M, Kory N, Wilfling F, Stoehr G, Mann M, Farese RV, Walther TC (2013) Protein Correlation Profiles Identify Lipid Droplet Proteins with High Confidence *. *Mol Cell Proteomics* 12: 1115–1126
102. Kröncke K-D, Fehsel K, Kolb-Bachofen V (1995) Inducible Nitric Oxide Synthase and Its Product Nitric Oxide, a Small Molecule with Complex Biological Activities. *Biol Chem* 376: 327–356
103. Kuwata H, Nakatani E, Shimbara-Matsubayashi S, Ishikawa F, Shibamura M, Sasaki Y, Yoda E, Nakatani Y, Hara S (2019) Long-chain acyl-CoA synthetase 4 participates in the formation of highly unsaturated fatty acid-containing phospholipids in murine macrophages. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 1864: 1606–1618
104. Kvastad L, Carlberg K, Larsson L, Villacampa EG, Stuckey A, Stenbeck L, Mollbrink A, Zamboni M, Magnusson JP, Basmaci E, et al. (2021) The spatial RNA integrity number assay for in situ evaluation of transcriptome quality. *Commun Biol* 4: 1–8
105. Larsen H, Muz B, Khong TL, Feldmann M, Paleolog EM (2012) Differential effects of Th1 versus Th2 cytokines in combination with hypoxia on HIFs and angiogenesis in RA. *Arthritis Res Ther* 14: R180
106. Lavin RC, Tan S (2022) Spatial relationships of intra-lesion heterogeneity in Mycobacterium tuberculosis microenvironment, replication status, and drug efficacy. *PLOS Pathog* 18: e1010459
107. Lee H, Zhuang L, Gan B (2020) Energy stress inhibits ferroptosis via AMPK. *Mol Cell Oncol* 7: 1761242
108. Van der Leij FR, Kram AM, Bartelds B, Roelofsen H, Smid GB, Takens J, Zammit VA, Kuipers JR (1999) Cytological evidence that the C-terminus of carnitine palmitoyltransferase I is on the cytosolic face of the mitochondrial outer membrane. *Biochem J* 341: 777–784
109. Li Q, Zhang X, Ke R (2022) Spatial Transcriptomics for Tumor Heterogeneity Analysis. *Front Genet* 13: 906158
110. Lin PL, Ford CB, Coleman MT, Myers AJ, Gawande R, Ioerger T, Sacchettini J, Fortune SM, Flynn JL (2014) Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nat Med* 20: 75–79
111. Linsenmayer TF (1991) Collagen. In: Hay ED (Hrsg), *Cell Biology of Extracellular Matrix: Second Edition*. Springer US, Boston, MA S. 7–44

112. Lipogenese: Synthese von Triacylglycerinen. Viamedici: Leichter Lernen - Mehr Verstehen.
URL:<https://viamedici.thieme.de/lernmodul/548747/538879/lipogenese+synthese+von+triacylglycerinen>
[Zugegriffen: 31. August 2022]
113. Liu Z, Gao Y, Yang H, Bao H, Qin L, Zhu C, Chen Y, Hu Z (2016) Impact of Hypoxia on Drug Resistance and Growth Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *PLOS ONE* 11: e0166052
114. Lu H, Forbes RA, Verma A (2002) Hypoxia-inducible Factor 1 Activation by Aerobic Glycolysis Implicates the Warburg Effect in Carcinogenesis. *J Biol Chem* 277: 23111–23115
115. Ly LH, Russell MI, McMurray DN (2007) Microdissection of the cytokine milieu of pulmonary granulomas from tuberculous guinea pigs. *Cell Microbiol* 9: 1127–1136
116. MacMicking J, Xie Q, Nathan C (1997) Nitric Oxide and Macrophage Function. *Annu Rev Immunol* 15: 323–350
117. Mahajan S, Dkhar HK, Chandra V, Dave S, Nanduri R, Janmeja AK, Agrewala JN, Gupta P (2012) *Mycobacterium tuberculosis* modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPAR γ and TR4 for survival. *J Immunol Baltim Md* 188: 5593–5603
118. Mao J, DeMayo FJ, Li H, Abu-Elheiga L, Gu Z, Shaikenov TE, Kordari P, Chirala SS, Heird WC, Wakil SJ (2006) Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci* 103: 8552–8557
119. Marino S, Cilfone NA, Mattila JT, Linderman JJ, Flynn JL, Kirschner DE (2015) Macrophage Polarization Drives Granuloma Outcome during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Infect Immun* 83: 324–338
120. Mashek DG, Li LO, Coleman RA (2006) Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. *J Lipid Res* 47: 2004–2010
121. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K (1999) Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res* 27: 4436–4443
122. Mattila JT, Ojo OO, Kepka-Lenhart D, Marino S, Kim JH, Eum SY, Via LE, Barry CE, Klein E, Kirschner DE, et al. (2013) Microenvironments in Tuberculous Granulomas Are Delineated by Distinct Populations of Macrophage Subsets and Expression of Nitric Oxide Synthase and Arginase Isoforms. *J Immunol* 191: 773–784
123. McCaffrey EF, Donato M, Keren L, Chen Z, Delmastro A, Fitzpatrick MB, Gupta S, Greenwald NF, Baranski A, Graf W, et al. (2022) The immunoregulatory landscape of human tuberculosis granulomas. *Nat Immunol* 23: 318–329
124. Menon D, Singh K, Pinto SM, Nandy A, Jaisinghani N, Kutum R, Dash D, Prasad TSK, Gandotra S (2019) Quantitative Lipid Droplet Proteomics Reveals *Mycobacterium tuberculosis* Induced Alterations in Macrophage Response to Infection. *ACS Infect Dis* 5: 559–569
125. Millier MJ, Stamp LK, Hessian PA (2017) Digital-PCR for gene expression: impact from inherent tissue RNA degradation. *Sci Rep* 7: 17235
126. Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K (1995) Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH 1 and TH 2 cytokines. *Eur J Immunol* 25: 1101–1104

127. Morris SM Jr (2007) Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge. *J Nutr* 137: 1602S-1609S
128. Morris SM Jr (2016) Arginine Metabolism Revisited. *J Nutr* 146: 2579S-2586S
129. Munder M, Eichmann K, Modolell M (1998) Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD4⁺ T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype. *J Immunol* 160: 5347–5354
130. Mylonis I, Simos G, Paraskeva E (2019) Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. *Cells* 8: 214
131. Nishi K, Oda T, Takabuchi S, Oda S, Fukuda K, Adachi T, Semenza GL, Shingu K, Hirota K (2008) LPS Induces Hypoxia-Inducible Factor 1 Activation in Macrophage-Differentiated Cells in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner. *Antioxid Redox Signal* 10: 983–996
132. Noguchi M, Furuya JS, Takeuchi T, Hirohashi S (1997) Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathol Int* 47: 685–691
133. Nomura M, Liu J, Rovira II, Gonzalez-Hurtado E, Lee J, Wolfgang MJ, Finkel T (2016) Fatty acid oxidation in macrophage polarization. *Nat Immunol* 17: 216–217
134. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, et al. (2007) Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447: 1116–1120
135. Oke AJ, Adeyemo AD, Oke AA (2013) Multidrug-resistant human mycobacterium tuberculosis strain resisted inactivation by 10% formalin. *West Afr J Med* 32: 206–209
136. Olzmann JA, Carvalho P (2019) Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 137–155
137. Opitz L, Salinas-Riester G, Grade M, Jung K, Jo P, Emons G, Ghadimi BM, Beißbarth T, Gaedcke J (2010) Impact of RNA degradation on gene expression profiling. *BMC Med Genomics* 3: 36
138. Paavilainen L, Edvinsson A, Asplund A, Hober S, Kampf C, Pontén F, Wester K (2010) The impact of tissue fixatives on morphology and antibody-based protein profiling in tissues and cells. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 58: 237–246
139. Parasa VR, Muvva JR, Rose JF, Braian C, Brighenti S, Lerm M (2017) Inhibition of Tissue Matrix Metalloproteinases Interferes with Mycobacterium tuberculosis-Induced Granuloma Formation and Reduces Bacterial Load in a Human Lung Tissue Model. *Front Microbiol* 8: 2370
140. Páska C, Bögi K, Szilák L, Tokés A, Szabó E, Sziller I, Rigó JJ, Sobel G, Szabó I, Kaposi-Novák P, et al. (2004) Effect of Formalin, Acetone, and RNAlater Fixatives on Tissue Preservation and Different Size Amplicons by Real-Time PCR from Paraffin-Embedded Tissue. *Diagn Mol Pathol* 13: 234–40
141. Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, Daffé M, Emile J-F, Marchou B, Cardona P-J, et al. (2008) Foamy Macrophages from Tuberculous Patients' Granulomas Constitute a Nutrient-Rich Reservoir for *M. tuberculosis* Persistence. *PLOS Pathog* 4: e1000204
142. Podinovskaia M, Lee W, Caldwell S, Russell DG (2013) Infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis* induces global modifications to phagosomal function. *Cell Microbiol* 15: 843–859

143. Poppelreuther M, Rudolph B, Du C, Großmann R, Becker M, Thiele C, Eehalt R, Füllekrug J (2012) The N-terminal region of acyl-CoA synthetase 3 is essential for both the localization on lipid droplets and the function in fatty acid uptake. *J Lipid Res* 53: 888–900
144. Quiagen (2014) RNeasy® FFPE Handbook
145. Quiagen (2014) RNeasy® Micro Handbook, 3. Aufl
146. Ramakrishnan L (2012) Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 12: 352–366
147. Rao SPS, Alonso S, Rand L, Dick T, Pethe K (2008) The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* 105: 11945–11950
148. Reece ST, Kaufmann SHE (2012) Floating between the poles of pathology and protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis? *Curr Opin Microbiol* 15: 63–70
149. RKI Tuberkulose. Robert-Koch-Institut.
URL:https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html;jsessionid=80560EAF4BD77BBB92FC5A9C2628FB12.internet092#doc2374486bodyText2
[Zugegriffen: 14. November 2022]
150. Rodríguez A, Duyvejonck H, Belleghem JDV, Gryp T, Simaey LV, Vermeulen S, Mechelen EV, Vanechoutte M (2020) Comparison of procedures for RNA-extraction from peripheral blood mononuclear cells. *PLOS ONE* 15: e0229423
151. Rodríguez JG, Hernández AC, Helguera-Repetto C, Aguilar Ayala D, Guadarrama-Medina R, Anzola JM, Bustos JR, Zambrano MM, González-y-Merchand J, García MJ, et al. (2014) Global Adaptation to a Lipid Environment Triggers the Dormancy-Related Phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* 5: e01125-14
152. Rodriguez-Prados J-C, G. Traves P, Moreno J, Rico D, Aragonés J, Martin-Sanz P, Cascante M, Boscá L (2010) Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. *J Immunol* 185: 605–614
153. Rodriques SG, Stickels RR, Goeva A, Martin CA, Murray E, Vanderburg CR, Welch J, Chen LM, Chen F, Macosko EZ (2019) Slide-seq: A scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. *Science* 363: 1463–1467
154. Rohde K, Yates RM, Purdy GE, Russell DG (2007) *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunol Rev* 219: 37–54
155. Rook GAW (2007) Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr Mol Med* 7: 327–337
156. Roy M, Ellis S (2010) Radiological diagnosis and follow-up of pulmonary tuberculosis. *Postgrad Med J* 86: 663–674
157. Russell DG (2007) Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol* 5: 39–47
158. Russell DG, Cardona P-J, Kim M-J, Allain S, Altare F (2009) Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 10: 943–948
159. Russell DG, VanderVen BC, Lee W, Abramovitch RB, Kim M, Homolka S, Niemann S, Rohde KH (2010) *Mycobacterium tuberculosis* Wears What It Eats. *Cell Host Microbe* 8: 68–76
160. Saka HA, Valdivia R (2012) Emerging Roles for Lipid Droplets in Immunity and Host-Pathogen Interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 411–437

161. Schwebach JR, Jacobs WR, Casadevall A (2001) Sterilization of Mycobacterium tuberculosis Erdman Samples by Antimicrobial Fixation in a Biosafety Level 3 Laboratory. *J Clin Microbiol* 39: 769–771
162. Selva E, Hofman V, Berto F, Musso S, Castillo L, Santini J, Dellamonica P, Hofman P (2004) The value of polymerase chain reaction detection of Mycobacterium tuberculosis in granulomas isolated by laser capture microdissection. *Pathology* 36: 77–81
163. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269: 23757–23763
164. Shi L, Jiang Q, Bushkin Y, Subbian S, Tyagi S (2019) Biphasic Dynamics of Macrophage Immunometabolism during Mycobacterium tuberculosis Infection. *mBio* 10: e02550-18
165. Shi L, Salamon H, Eugenin EA, Pine R, Cooper A, Gennaro ML (2015) Infection with Mycobacterium tuberculosis induces the Warburg effect in mouse lungs. *Sci Rep* 5: 18176
166. Singh V, Kaur C, Chaudhary VK, Rao KVS, Chatterjee S (2015) M. tuberculosis Secretory Protein ESAT-6 Induces Metabolic Flux Perturbations to Drive Foamy Macrophage Differentiation. *Sci Rep* 5: 12906
167. Von Smolinski D, Leverkoehne I, Von Samson-Himmelstjerna G, Gruber AD (2005) Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes. *Histochem Cell Biol* 124: 177–188
168. Soupene E, Kuypers FA (2008) Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Exp Biol Med* Maywood NJ 233: 507–521
169. St-Laurent J, Boulay M-E, Prince P, Bissonnette E, Boulet L-P (2006) Comparison of cell fixation methods of induced sputum specimens: An immunocytochemical analysis. *J Immunol Methods* 308: 36–42
170. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, Fulda S, Gascón S, Hatzios SK, Kagan VE, et al. (2017) Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* 171: 273–285
171. Stone SJ, Levin MC, Zhou P, Han J, Walther TC, Farese RV (2009) The Endoplasmic Reticulum Enzyme DGAT2 Is Found in Mitochondria-associated Membranes and Has a Mitochondrial Targeting Signal That Promotes Its Association with Mitochondria. *J Biol Chem* 284: 5352–5361
172. Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, Brown BE, Feingold KR, Elias PM, Farese RV (2004) Lipopenia and Skin Barrier Abnormalities in DGAT2-deficient Mice. *J Biol Chem* 279: 11767–11776
173. Subbian S, Tsenova L, Kim M-J, Wainwright HC, Visser A, Bandyopadhyay N, Bader JS, Karakousis PC, Murrmann GB, Bekker L-G, et al. (2015) Lesion-Specific Immune Response in Granulomas of Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Pilot Study. *PLOS ONE* 10: e0132249
174. Tan L, Lu J, Liu L, Li L (2021) Fatty acid binding protein 3 deficiency limits atherosclerosis development via macrophage foam cell formation inhibition. *Exp Cell Res* 407: 112768
175. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, Frezza C, Bernard NJ, Kelly B, Foley NH, et al. (2013) Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* 496: 238–242
176. Theobald SJ, Gräß J, Fritsch M, Suárez I, Eisfeld HS, Winter S, Koch M, Hölscher C, Pasparakis M, Kashkar H, et al. (2021) Gasdermin D mediates host cell death but not interleukin-1 β secretion in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *Cell Death Discov* 7: 1–14

177. Thermo Scientific (2016) Thermo Scientific RevertAid H Minus Reverse Transcriptase
178. Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, Jörg S, Pradl L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina N, Kaufmann SH (2004) Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol* 204: 217–228
179. Van den Bossche J, O'Neill LA, Menon D (2017) Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends Immunol* 38: 395–406
180. Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, van der Velden S, Neele AE, van den Berg SM, Luque-Martin R, Chen H-J, Boshuizen MCS, Ahmed M, et al. (2016) Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep* 17: 684–696
181. Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, Zhang L, Smith KL, Morel CR, Wagner RA, Greaves DR, Murray PJ, Chawla A (2006) Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab* 4: 13–24
182. Vaupel P, Multhoff G (2021) Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J Physiol* 599: 1745–1757
183. Villeneuve M, Kawai M, Kanashima H, Watanabe M, Minnikin DE, Nakahara H (2005) Temperature dependence of the Langmuir monolayer packing of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1715: 71–80
184. Volkman HE, Clay H, Beery D, Chang JCW, Sherman DR, Ramakrishnan L (2004) Tuberculous Granuloma Formation Is Enhanced by a *Mycobacterium* Virulence Determinant. *PLOS Biol* 2: e367
185. Walter K, Kokesch-Himmelreich J, Treu A, Waldow F, Hillemann D, Jakobs N, Lemm A-K, Schwudke D, Römpf A, Hölscher C (2022) Interleukin-13-Overexpressing Mice Represent an Advanced Preclinical Model for Detecting the Distribution of Antimycobacterial Drugs within Centrally Necrotizing Granulomas. *Antimicrob Agents Chemother* 66: e01588-21
186. Walther TC, Farese RV (2012) Lipid Droplets And Cellular Lipid Metabolism. *Annu Rev Biochem* 81: 687–714
187. Walz A, Lukka PB, Pearce C, Creissen E, Braunstein M, Hickey AJ, Meibohm B, Gonzalez-Juarrero M (2019) Sterilization of *Mycobacterium tuberculosis* infected samples using methanol preserves anti-tuberculosis drugs for subsequent pharmacological testing studies. *Tuberculosis* 117: 52–55
188. Wang N, Sarathy JP, Zimmerman M, Kaya F, Wang H, Dartois V, Carter CL (2021) On-Slide Heat Sterilization Enables Mass Spectrometry Imaging of Tissue Infected with High-Threat Pathogens Outside of Biocontainment: A Study Directed at *Mycobacterium tuberculosis*. *J Am Soc Mass Spectrom* 32: 2664–2674
189. WHO Tuberculosis (TB). World Health Organisation.
URL:<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
[Zugegriffen: 18. September 2022]
190. Williams DL, Gillis TP, Dupree WG (1995) Ethanol fixation of sputum sediments for DNA-based detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 33: 1558–1561
191. Wimmer I, Tröscher AR, Brunner F, Rubino SJ, Bien CG, Weiner HL, Lassmann H, Bauer J (2018) Systematic evaluation of RNA quality, microarray data reliability and pathway analysis in fresh, fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Sci Rep* 8: 6351

192. Xu G, Sztalryd C, Lu X, Tansey JT, Gan J, Dorward H, Kimmel AR, Londos C (2005) Post-translational Regulation of Adipose Differentiation-related Protein by the Ubiquitin/Proteasome Pathway *. *J Biol Chem* 280: 42841–42847
193. Yamaguchi F, Minakata T, Miura S, Suzuki T, Sagara H (2020) Heterogeneity of latent tuberculosis infection in a patient with lung cancer. *J Infect Public Health* 13: 151–153
194. Yang H, Sha W, Liu Z, Tang T, Liu H, Qin L, Cui Z, Chen J, Liu F, Zheng R, et al. (2018) Lysine acetylation of DosR regulates the hypoxia response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect* 7: 1–14
195. Yang M, Chen P, Liu J, Zhu S, Kroemer G, Klionsky DJ, Lotze MT, Zeh HJ, Kang R, Tang D (2019) Clockophagy is a novel selective autophagy process favoring ferroptosis. *Sci Adv* 5: eaaw2238
196. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, et al. (2014) Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell* 156: 317–331
197. Yuan H, Li X, Zhang X, Kang R, Tang D (2016) Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 478: 1338–1343
198. Zhu G, Xiao H, Mohan VP, Tanaka K, Tyagi S, Tsen F, Salgame P, Chan J (2003) Gene expression in the tuberculous granuloma: analysis by laser capture microdissection and real-time PCR. *Cell Microbiol* 5: 445–453
199. Ziegler R, Just H-M, Castell S, Diel R, Gastmeier P, Haas W, Hauer B, Loytved G, Mielke M, Moser I, et al. (2012) Infektionsprävention bei Tuberkulose – Empfehlungen des DZK. *Pneumologie* 66: 269–282
200. Zimmerman M, Blanc L, Chen P-Y, Dartois V, Prideaux B (2018) Spatial Quantification of Drugs in Pulmonary Tuberculosis Lesions by Laser Capture Microdissection Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCM-LC/MS). *J Vis Exp*: e57402

Anhänge

A Zusatzinformationen zu den normalisierten qPCR-Läufen

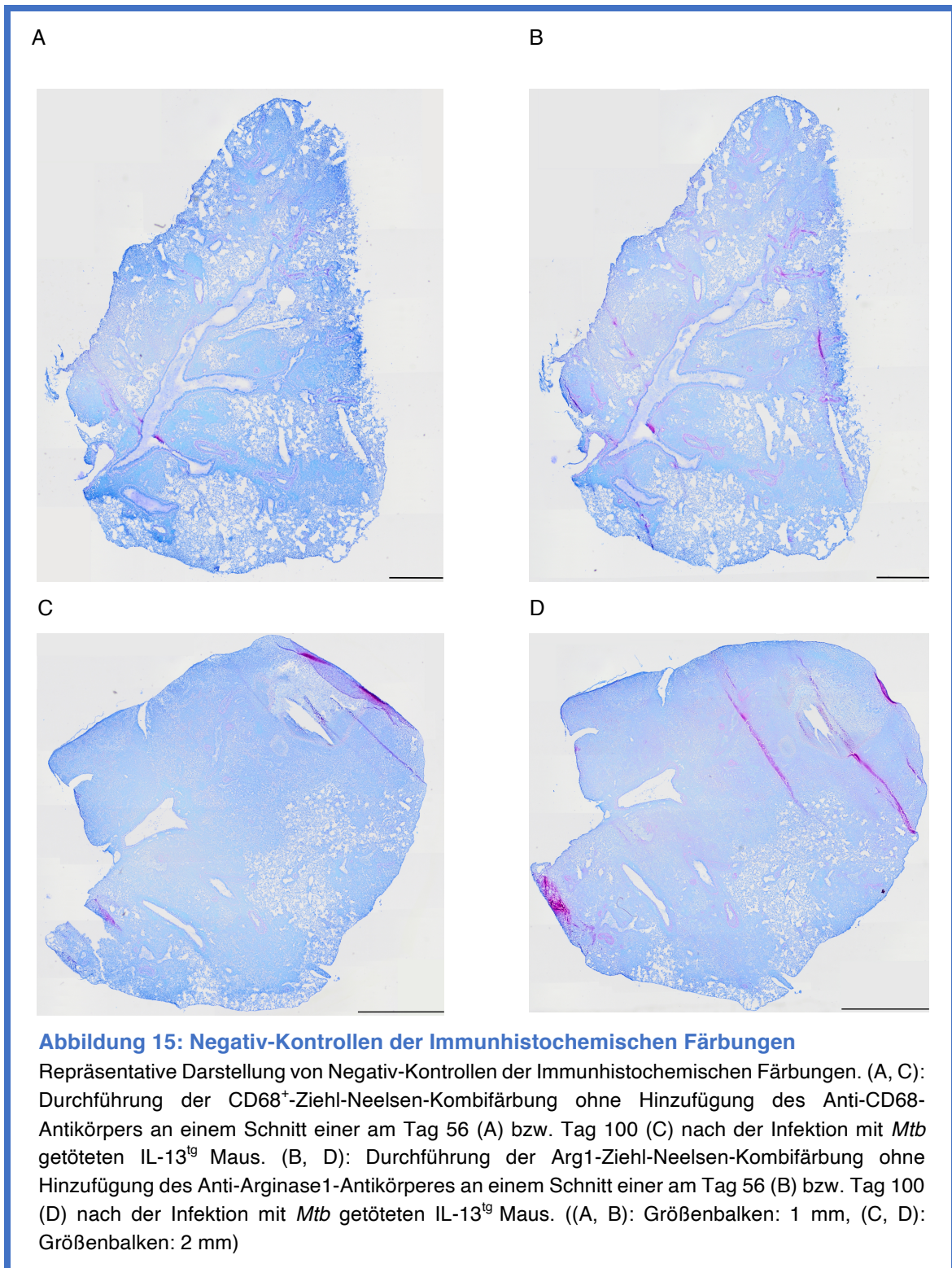
Die hier aufgeführte Tabelle zeigt die Effizienzen und *Errors* der qPCR Läufe auf, auf denen die in Kapitel 3.2 aufgeführten Analyse-Daten beruhen.

Tabelle 22: Zusatzinformationen zu den in Kapitel 3.2 dargestellten, auf qPCR-Daten beruhenden Analysen.

Gene	Error des zur Analyse verwendeten qPCR-Laufs	Effizienz des zur Analyse verwendeten qPCR-Laufs	Abbildung, in die qPCR-Daten einfließen
<i>Hprt</i>	0,0231	1.919	Als Referenzen zur Normalisierung aller qPCR-Läufe dieser Tabelle verwendet.
<i>CD68⁺</i>	0,0243	1,8880	Abbildung 8 A Abbildung 10 A
<i>Arg1</i>	0,0219	1,8610	Abbildung 8 B Abbildung 10 B
<i>Acc2</i>	0,0312	2.012	Abbildung 11 A, B
<i>Plin2</i>	0,0226	1,868	Abbildung 11 C, D
<i>Dgat2</i>	0,0212	1,8840	Abbildung 11 E, F
<i>Acs14</i>	0,0152	1.857	Abbildung 12 A, B
<i>Fabp3</i>	0,0161	1.839	Abbildung 12 C, D

B Negativ Kontrollen der Immunhistochemischen Färbungen

In Bezugnahme auf die in Kapitel 3.2.2 dargestellten immunhistochemischen Färbungen.



Danksagung

Mein Dank gilt:

- Prof. Dr. Ulrich Schaible für die Übernahme des Amtes des Doktorvaters
- Dem IRGT für die finanzielle und intellektuelle Förderung im Jahr 2017/18 und dem Schaffen strukturierter Rahmenbedingungen; hier insbesondere Dr. Julia Figge für die organisatorische Betreuung
- Dr. Christoph Hölscher für die intensive Begleitung des Projektes, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine stetige Erreichbarkeit und seine ruhigen, differenzierenden Erklärungen
- Dr. Katrin Kalies für Ihr Mitdenken bei Fragen der Methodik und im Rahmen der Initialisierung des Projektes
- J für all die Stunden, die sie am Kryotom schneidend und mit Färbungen experimentierend extrem sorgfältig Gewebeschnitte für mich aufbereitet hat und somit einen sehr wertvollen Beitrag geleistet hat
- A für Ihre tatkräftige Unterstützung im Labor, Ihre Struktur, Organisation und Energie im Hintergrund
- C, S und I für die gemeinsamen Stunden im Büro, Ihre kritischen Fragen und ihre helfenden kleinen Taten
- Der Arbeitsgruppe „Infektionsimmunologie“ in ihrer Gesamtheit für die herzliche, familiäre Aufnahme
- F für Ihre Einarbeitung am Micro Palm Beam
- D für Ihr wertvolles Mitdenken in Sachen RNA-Erhalt und ihre Einarbeitung am Bioanalyser, der dankenswerterweise von Prof. Dr. Torsten Goldmann zusammen mit inhaltlichen Überlegungen zur Verfügung gestellt wurde
- All den Podcasts und Hörbüchern, die die unzähligen Stunden in der kleinen Kammer vor dem Mikroskop abwechslungsreich gestaltet und spannend gefüllt haben
- All den Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich über die Jahre beim vorliegenden Projekt begleitet haben; hier gilt ein besonders großer Dank vor allem L für ihr Korrekturlesen sowie ihr sehr wertvolles Feedback im Rahmen des Schreibprozesses
- Und vor allem meinen Eltern, die mich in einem festen Glauben an mein Tun und mein Können, unhinterfragt und mit viel Energie unterstützen und mir so wahnsinnig viel ermöglichen