



Universiteit
Leiden

The Netherlands

**Discovery of dormancy associated antigens of
Mycobacterium tuberculosis : novel targets for the
development of post-exposure or therapeutic tuberculosis
vaccines**

Lin, M.Y.

Citation

Lin, M. Y. (2009, December 15). *Discovery of dormancy associated antigens of Mycobacterium tuberculosis : novel targets for the development of post-exposure or therapeutic tuberculosis vaccines*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14507>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/14507>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse Samenvatting

Algemene inleiding

Tuberculose (TB) is een infectieziekte die wordt veroorzaakt door de bacterie *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). In de volksmond wordt TB ook wel de 'tering' of de 'witte pest' genoemd. *M. tuberculosis* komt verspreid over de gehele wereld voor. In totaal is bijna één derde van de wereldbevolking (ruwweg 2 miljard mensen) besmet met de tuberkel bacil. Jaarlijks ontwikkelen ongeveer negen miljoen mensen daadwerkelijk de ziekte TB.

TB eist ongeveer 2 miljoen doden per jaar, vooral in Azië, Afrika en Latijns-Amerika, en in toenemende mate in Oost-Europa. TB is met AIDS en malaria de infectieziekte die wereldwijd de meeste dodelijke slachtoffers eist.

TB is een ziekte die in principe alle organen kan aantasten maar longtuberculose is de meest voorkomende vorm. Andere getroffen lichaamsdelen zijn bijvoorbeeld de gewrichten, botten, hersenen en lymfeklieren.

Na de infectie, die zich via de luchtwegen verspreid, zorgt de bacterie ervoor dat er kleine ontstekingen ontstaan in het lichaam: er worden kleine knobbeltjes (granulomas) gevormd die kenmerkend zijn voor TB. In deze knobbeltjes bevinden zich 'slapende' ofwel latente bacteriën. De meeste mensen (90%) die besmet zijn vertonen geen ziektesymptomen en zullen deze ook niet ontwikkelen; zij dragen de ziekte latent met zich mee en vormen derhalve geen besmettingsbron. De overige 5-10% van de geïnfecteerde mensen worden wel ziek. Het ziekteproces treedt in een klein deel (1%) al vrij snel op na de infectie terwijl de rest op een later moment in hun leven ziek wordt na een aanvankelijk latente periode van infectie; deze 'reactivatie' van infectie kan zelfs na 50 jaar nog optreden. Tijdens de 'actieve' ziekte (open TB) is de patiënt een zeer besmettelijke bron van bacteriën.

De precieze factoren die kunnen voorspellen of verklaren wanneer iemand actieve ziekte ontwikkelt of welke markers (zogenaamde 'biomarkers') juist typerend zijn voor de latente fase van infectie, zijn helaas nog grotendeels onbekend. Wel is bekend dat een verzwakte afweer, bijvoorbeeld als gevolg van besmetting met het Humaan Immundeficiëntie Virus (HIV), een groot risico vormen voor het ontwikkelen van TB. De samenloop van TB met de huidige HIV-pandemie en het verschijnen van steeds meer (extreem) antibiotica ongevoelige TB stammen zorgt helaas voor nog meer slachtoffers. Deze situatie vraagt om nieuwe, effectievere medicijnen en vaccins waarmee we TB reactivatie kunnen voorkomen, (latente) TB beter kunnen behandelen en de ziekte daarmee kunnen indammen.

Nieuwe anti-TB vaccins omvatten niet alleen betere preventieve vaccins maar ook nieuwe vaccins die werkzaam zijn in de reeds geïnfecteerde mens. Veel nieuwe actieve TB gevallen zijn afkomstig uit de groep van latent geïnfecteerde personen. Zogenaamde 'post-exposure' of therapeutische vaccins zouden kunnen verhinderen dat de latente infectie reactiveert. Het vaccin zou immers het lichaam kunnen helpen de infectie onder controle te houden, of beter nog, de latente infectiehaard op te ruimen. Tot op heden bestaan er geen post-exposure vaccins tegen TB, noch betrouwbare biomarkers die specifiek zijn voor latente TB. Bovendien weten we nog

niet precies welke afweerreacties er echt toe doen tijdens de natuurlijke bescherming tegen reactivatie TB. Het enige beschikbare vaccin tegen TB is een verzwakte vorm van de runder TB bacil, en heet *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG). BCG is beschermend en effectief in kinderen tegen ernstige vormen van TB. BCG biedt helaas onvoldoende bescherming tegen longtuberculose en is niet werkzaam in mensen die al geïnfecteerd zijn met *M. tuberculosis*.

Een vaccin heeft als doel het immuunsysteem te leren effectief te reageren tegen bepaalde stukjes eiwit (antigenen) van een bacterie of virus. Wanneer het afweersysteem dat eenmaal geleerd heeft kan het de echte ziekteverwekker snel en effectief uitschakelen.

Er zijn diverse benaderingen om geschikte vaccinkandidaten te vinden. Deze moeten echter ook geschikt zijn voor de ontwikkeling van post-exposure / therapeutische vaccins zoals wij die voor ogen hebben. Eén benadering is het bestuderen van karakteristieke genen die door *M. tuberculosis* veel gebruikt worden of hoog afgeschreven (geëxprimeerd) worden tijdens de latente, 'slapende' fase van de infectie. Deze genen, die vertaald worden naar eiwitten (antigenen), zouden kunnen worden gebruikt als doelwit voor het afweersysteem, en aldus betrokken kunnen zijn bij het voorkomen van TB reactivatie. Een nieuw vaccin zou hiervan gebruik kunnen maken en het afweersysteem helpen de tuberkel bacterie te herkennen nog gedurende de latente fase van infectie, en op die manier de bacterie kunnen stoppen. Een goed vaccin moet er in elk geval voor zorgen dat diverse witte bloedcellen (de T cellen) deze latente antigenen goed herkennen.

Dit proefschrift

De genen van het DosR ('dormancy') regulon zijn een specifieke set van genen die door *M. tuberculosis* hoog geëxprimeerd worden in modellen die de latente fase van infectie nabootsen. Dit regulon bestaat uit een set van 48 genen, die wordt gereguleerd door de dormancy respons master regulator, DosR. Bij het bestuderen van de genexpressie profielen van de bacterie tijdens deze simulaties werd de genexpressie van het gehele dormancy regulon sterk opgereguleerd. Deze set genen vormen het onderwerp van ons onderzoek.

Centraal in dit proefschrift staat het bestuderen van de DosR gereguleerde genen met betrekking tot het vermogen om afweerreacties te induceren en het zoeken naar biomarkers voor latente TB infectie. In de eerste instantie werd gekeken of de genen van het DosR regulon als eiwitten een immuunrespons kunnen induceren in de mens (**Hoofdstuk 2**). In totaal werden 25 van de 48 dormancy genen geselecteerd en vertaald naar het bijbehorende eiwit. Deze 25 behoorden tot de genen die het sterkst tot expressie kwamen in *M. tuberculosis*. Diverse cellen werden getest op herkenning van de 25 dormancy eiwitten. De cellen waren afkomstig van mensen met: latente TB infectie, actieve TB infectie of geen TB infectie. Uit de resultaten bleek dat alle geteste antigenen herkend werden door minstens één, maar vaak meerdere donoren. Bovendien herkende de groep van personen met een latente TB infectie meer dormancy antigenen dan de groep met actieve TB: een sterke en brede respons op de

dormancy antigenen leek zodoende geassocieerd te zijn met een goede natuurlijke afweer tegen *M. tuberculosis*.

Hierna onderzochten we in detail welke witte bloedcellen reageerden op de dormancy antigenen. **Hoofdstuk 3** beschrijft de reacties van twee soorten witte bloedcellen, CD4⁺ en CD8⁺ T cellen, op *M. tuberculosis* dormancy antigenen. Ook bestudeerden we welke brokstukjes van deze antigenen (peptiden) deze immuunreactie induceerden. Relatief veel peptiden bleken in staat om T cel responsen uit te lokken; sommige peptiden bleken door CD4⁺ T cellen herkend te worden, andere door CD8⁺ T cellen en een kleiner aantal door beide subsets van T cellen.

De precieze afweerreacties die ten grondslag liggen en karakteristiek zijn voor de beschermende immuniteit tegen TB, en het gebrek daaraan bij BCG vaccinatie zijn nog grotendeels onbekend. In **Hoofdstuk 4 en 5** hebben we gekeken of de DosR antigenen een rol hebben in de immuunreactie die volgt na BCG vaccinatie. Verrassend was dat BCG vaccinatie in zowel humane cellen als muizencellen niet in staat leek een afweerreactie op te wekken tegen de *M. tuberculosis* dormancy antigenen! Dit bleek niet te kunnen worden verklaard door genetische deletie van deze genen in BCG, noch door een gebrekkige capaciteit van BCG om genen van het DosR regulon *in vitro* tot expressie te brengen. Kennelijk leidt BCG vaccinatie in de mens dus niet tot een adequate reactie tegen *M. tuberculosis* dormancy antigenen.

Een andere onverwachte bevinding was het voorkomen van afweerreacties op de dormancy antigenen in sommige gezonde, niet *M. tuberculosis* geïnfecteerde mensen. De *M. tuberculosis* dormancy genen bleken niet uniek voor *M. tuberculosis*: ze komen ook voor in andere (minder gevaarlijke) mycobacteriën en soms ook in bacteriën die men vrij veel aantreft in het milieu. Dit laten we zien in **Hoofdstuk 6**. Hier beschrijven we dat mensen die niet besmet zijn met *M. tuberculosis* maar met een verwante minder gevaarlijke mycobacterie ook kunnen reageren op de dormancy antigenen van *M. tuberculosis*. Dit laat zien dat dormancy antigenen van *M. tuberculosis* en omgevings mycobacteriën kruisreactief zijn. Eerder onderzoek heeft laten zien dat kruisreactiviteit van omgevingsmycobacteriën met het BCG vaccin niet altijd een positieve invloed had op de werking van BCG, hoewel de precieze mechanismen daarvan nog onbekend zijn. Toekomstig onderzoek zal moeten uitwijzen wat de invloed en relatie is van kruisreactiviteit van omgevingsmycobacteriën met de *M. tuberculosis* dormancy antigenen.

DNA vaccins zijn bijzonder goed in het induceren van sterke, beschermende afweerreacties. In **Hoofdstuk 7** bestudeerden we het eiwit Rv1733c, één van de meest potente dormancy antigenen, als DNA vaccin. In muizen bleek dit inderdaad een goede afweerreactie te induceren. Rv1733c als DNA vaccin kon nog krachtiger worden gemaakt door een specifieke formulering toe te passen (met nanopartikel-moleculen) en het direct toe te dienen via de luchtwegen (het doelwitorgaan van *M. tuberculosis*) i.p.v. de huid.

Conclusies

Onze hypothese was dat *M. tuberculosis* dormancy eiwitten potentiële antigenen zouden kunnen zijn voor het menselijk afweersysteem en daarmee nieuwe kandidaten zijn voor de ontwikkeling van nieuwe post-exposure / therapeutische vaccins tegen TB.

Onze experimenten tonen aan dat *M. tuberculosis* DosR regulon gecodeerde dormancy eiwitten daadwerkelijk herkend worden door het afweersysteem van mensen die geïnfecteerd zijn (geweest) met *M. tuberculosis*. Ten tweede, een sterkere en bredere afweerreactie tegen de dormancy antigenen lijkt geassocieerd te zijn met een natuurlijke bescherming tegen *M. tuberculosis*. Deze afweerreactie kan wellicht een rol spelen bij het voorkomen van reactivatie van latente TB naar actieve TB. Omgevingsmycobacteriën bleken ook in staat om reacties te induceren tegen *M. tuberculosis* dormancy antigenen, waarschijnlijk als gevolg van kruisreactiviteit met de *M. tuberculosis* dormancy antigenen. Daar tegenover staat het opmerkelijke gebrek van BCG om maar enige reactie te induceren tegen de dormancy antigenen, terwijl de gensequenties van de DosR regulon genen tussen BCG en *M. tuberculosis* zo goed als 100% overeenkomen, en BCG *in vitro* ook het DosR regulon tot expressie kan brengen.

Deze bevindingen vormen de eerste stap op weg naar de ontwikkeling van nieuwe TB vaccins en van biomarkers die kenmerkend zijn voor de diverse fasen van TB infectie. Toekomstig onderzoek zal uiteraard rekening moeten houden met de verschillende immuunreactieprofielen die aanwezig zijn in verschillende etnische groepen. Grootschalige studies die de immuunreacties in de tijd volgen kunnen belangrijke en doorslaggevende antwoorden geven op de vraag of *M. tuberculosis* dormancy antigenen geschikte vaccin kandidaten zijn tegen TB. Grote populatiestudies zoals uitgevoerd in Afrika door het 'Grand Challenges in Global Health Initiative' zullen hier een belangrijke rol in spelen. Gecombineerd met het definiëren van beschermende immuniteit, is het in principe een kwestie van tijd voordat het duidelijk is welk antigen -of juist meerdere antigenen- geselecteerd zal worden voor opname in toekomstige TB-vaccins. Dit werk zal ook rekening moeten houden met het voorkomen en de verspreiding van verschillende *M. tuberculosis* stammen, die wellicht kunnen verschillen in de expressieniveaus van DosR regulon antigenen. Het zal ook mogelijk zijn DosR antigenen te combineren met andere antigenen die belangrijk zijn gedurende de *verschillende* fasen die *M. tuberculosis* infectie doorloopt in tijd (vroeg infectie, latente infectie, actieve ziekte). Vaccins bestaande uit de belangrijkste antigenen van iedere fase van de infectie worden ook wel multi-stage vaccins genoemd, en zouden als groot voordeel hebben dat ze niet alleen post-exposure / therapeutisch maar ook preventief gebruikt kunnen worden.

Vervolgonderzoek zal moeten uitwijzen wat de exacte rol is van de *M. tuberculosis* dormancy antigenen in relatie tot de bescherming tegen reactivatie van latente TB, en hoe deze kennis kan worden uitgebuit in de vorm van betere vaccins en biomarkers van TB.

Acknowledgements (Dankwoord)

Na 5 ½ jaar is mijn proefschrift af! Dit was allemaal niet mogelijk geweest zonder de hulp van vele verschillende mensen die ik hier graag wil bedanken.

Mijn (oud)collega's van de Ottenhoffjes! Bedankt voor de leuke tijd op het lab, op labuitjes, tijdens de lunch, (cake-) werkbeprekingen, en natuurlijk de gezelligheid buiten het werk! Een paar mensen wil ik in het bijzonder bedanken: Krista, dank je wel voor alles wat je me hebt geleerd, voor je belangstelling en de gezellige/serieuze gesprekken. Simone, bedankt voor al je wetenschappelijke en niet-wetenschappelijke feedback. Annemiek, dank je wel voor de samenwerking, discussies en het delen van je ervaringen. Kees en Annemieke, hoeveel mg eiwit hebben jullie wel niet geproduceerd voor mijn onderzoek? Bedankt! Jan, hebben we uiteindelijk nooit samen op een paper gestaan! Wie weet ooit in de toekomst? Susan, bedankt voor je oprechte belangstelling in het wel en wee van mijn promotie. Edhyana, 'ai, ai ai'.. vaak begonnen zo je mails aan mij. Later begreep ik waarom... onderzoek doen is niet makkelijk. Mijn reply's begonnen later ook met "ai ai ai.." Fijn dat we zoveel hebben kunnen delen tijdens onze PhD trajecten! Maytal, you have been very inspiring for me. Your enthusiasm, optimism and passion for research were dangerously infectious. I am grateful for our collaboration and friendship. Sheila, thank you for bringing bioinformatics closer to my research. Please let me know when you are ready for another episode of 'Chinatown' hunting in Vancouver...

(Oud)collega's van de INZI: de aio's en Jaap wil ik graag bedanken voor de leerzame en ontspannen aio meetings. Sandra, bedankt voor je samenwerking, interesse en waardevolle input. Corine, bedankt voor het prikken van bloed voor de verschillende projecten. Eliane, ik zie ons nog samen zitten in de flow met al onze platen, cellen en antigenen. Dank je wel voor de samenwerking! Ingrid en Nettie, dank jullie wel voor alle secretariële hulp tijdens mijn promotie.

(Oud)collega's van de IHB en uiteraard de FECO, bedankt voor de gezellige tijd en voor de korte/lange/grappige/serieuze gesprekken op de gangen en L3-brug.

(Oud)collega's van groep Koning, met een aantal van jullie heb ik jarenlang de kamer gedeeld. Er was altijd tijd voor een gesprek, een geintje, een liedje en natuurlijk de lunch. Dank jullie wel. In het bijzonder, Dariusz, bedankt voor de fijne en grappige tijd op L3-20 en bedankt dat ik jouw promotie vanuit de paranimf stoel mocht meemaken.

(Oud)collega's van de peptiden groep: bedankt voor de synthese van de vele peptiden! Diëne, bedankt voor je al je hulp in de afgelopen jaren. Anouk, na het werk hebben we samen met Cristina veel punches en kicks uitgedeeld; wat was dat altijd ontspannend na een dag werken!

Ook buiten het LUMC zijn er mensen die ik wil bedanken: Kris Huygen en collega's in Brussel, bedankt voor de prettige samenwerking! Research Centre PRIOR, we met in my 2nd PhD year and I got the chance to meet PRIOR very up-close in Tanzania. It was unfortunate that despite all our efforts, the project did not take off as we all had hoped. But the experience was priceless. My thanks go to Wil and Arnold and special thanks to Gibson and Liselotte: I really appreciate and enjoyed the close collaboration and contact with you!

Lieve vrienden en familie, johoe! Allen bedankt voor jullie vriendschap en steun. De Praedinius-gang, ik bewonder jullie allen voor jullie doorzettingsvermogen en jullie ambitie. Onze parallelle promotie-trajecten heb ik als bijzonder en inspirerend ervaren. Biomeiden, wanneer is onze volgende date? Aan Biomeiden Erica en Jenneke, ik ben dankbaar voor onze hechte band en voor jullie vriendschap. Maaike, Canada ligt helaas niet om de hoek maar de telefoon ligt gelukkig binnen handbereik! Dank je wel voor je vriendschap. Pei Sian, ik geniet elke keer weer van onze (eet)afspraken in Amsterdam of Leiden. Vrienden in Leiden, bedankt voor de gezelligheid, etentjes, tijd in de kroeg (al dan niet quizzend), citytrips, spelletjes avonden of gewoon de avondjes rondhangen. Jacobien, gezellig dat je ook naar Leiden kwam! Ik voel me zeer vereerd dat ik je paranimf mag zijn. Bedankt voor je gezelligheid, je steun en de ovenschotels! Mijn paranimfen, Annemieke en Cristina. Annemieke, jij hebt heel veel werk gehad aan het maken van de eiwitten voor mijn project. Cristina, als collega-aio wist je precies tegen welke problemen ik aanliep en konden we veel ervaringen delen. Jullie stonden beiden altijd klaar voor me. Ik ben heel blij dat jullie vandaag mijn paranimfen willen zijn!

Lieve families: familie de Jager, bedankt voor alle gezelligheid en de gastvrijheid bij jullie thuis! Mijn tweede familie in Groningen: Carla, Ruud en Kim Chee, ik kan jullie niet genoeg bedanken voor jullie betrokkenheid, interesse en gezelligheid. Mijn broers See Loy, See Wing en zus Maysha, ik voel me heel rijk met jullie. Zonder jullie ben ik mijzelf niet en was ik nooit geworden wie ik ben. Lieve ouders: 亲爱的爸爸妈妈, 非常感谢你们一直以来对我们的悉心照顾和无私奉献。没有你们就不会有今天的我们, 没有你们, 我们更不能像现在一样自由地追逐着自己的梦想。

Tot slot, Bram, de laatste jaartjes van mijn promotie waren moeilijk en intensief maar gelukkig was jij er. Jouw relativeringsvermogen en nuchtere blik hebben een hele positieve invloed op mij gehad. Dank je wel voor je aandacht, zorgzaamheid, geduld en je hulp bij de laatste stappen ter voorbereiding op de promotie. Ik verheug me op onze volgende stappen samen!

Curriculum Vitae

De auteur van dit proefschrift werd geboren op 20 oktober 1978 te Groningen. In 1997 werd het VWO diploma aan het Praedinius Gymnasium in Groningen gehaald.

In hetzelfde jaar begon zij aan de studie Biologie aan de Rijksuniversiteit Groningen. Na het tweede studiejaar koos zij voor de hoofdrichting Medische Biologie. Voor deze hoofdrichting werden twee stages voltooid: de eerste wetenschappelijke stage werd gelopen op de afdeling Medische Microbiologie (sectie Moleculaire Virologie) van de Rijksuniversiteit Groningen onder begeleiding van Dr. Anke Huckriede en de tweede werd uitgevoerd de afdeling Neurowetenschappen (sectie Medische Fysiologie) aan de Rijksuniversiteit Groningen onder begeleiding van Dr. Sjef Copray.

Na het behalen van het doctoraal examen in 2002 begon zij in 2003 als promovenda op de afdeling Immunohepatologie en Bloedtransfusie en de afdeling Infectieziekten van het Leids Universitair Medisch Centrum. Hier werkte zij onder begeleiding van eerst Dr. M.R. Klein en later Prof. Dr. T.H.M. Ottenhoff aan het in dit proefschrift beschreven onderzoek.

Sinds mei 2009 is zij werkzaam als post-doctoraal onderzoeker onder begeleiding van Prof. Dr. J.P.M. van Putten op de afdeling Infectieziekten en Immunologie (sectie Infectiebiologie) aan de Universiteit Utrecht.

List of Publications

- 1.) **Lin MY**, van Meijgaarden KE, Friggen AH, Franken KLMLC, Geluk A, Drijfhout JW, Arend SM, Klein MR, and Ottenhoff THM. Identification of CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon encoded dormancy antigens and mapping of HLA class I and II restricted peptide-epitopes. *Manuscript in preparation*
- 2.) **Lin MY**, Reddy TBK, Arend SM, Friggen AH, Franken KLMLC, van Meijgaarden KE, Verduyn MJC, Schoolnik GK, Klein MR, and Ottenhoff THM. Cross-reactive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon-encoded antigens in individuals infected with environmental, non-tuberculous mycobacteria. *Infection and Immunity* 77(11):5071-5079, **2009**
- 3.) Bivas-Benita M*, **Lin MY***, Bal S, van Meijgaarden KE, Franken KLMLC, Friggen AH, Junginger HE, Borchard G, Klein MR, and Ottenhoff THM. Pulmonary delivery of DNA encoding *Mycobacterium tuberculosis* latency antigen Rv1733c associated to PLGA-PEI nanoparticles enhances T cell responses in a DNA prime/protein boost vaccination regimen in mice. *Vaccine* 27(30):4010-7, **2009**
- 4.) **Lin MY** and Ottenhoff THM. Not to wake a sleeping giant: new insights into host-pathogen interactions identify new targets for vaccination against latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Biological Chemistry* 389(5):497-511, **2008**
- 5.) **Lin MY** and Ottenhoff THM. Host-pathogen interactions in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: identification of new targets for tuberculosis intervention. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders-Drug-Targets* 8(1):15-29, **2008**
- 6.) **Lin MY**, Geluk A, Smith SG, Stewart AL, Friggen AH, Franken KLMLC, Verduyn MCJ, van Meijgaarden KE, Voskuil MI, Dockrell HM, Huygen K, Ottenhoff THM, and Klein MR. Lack of immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon proteins following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Infection and Immunity* 75(7):3523-3530, **2007**
- 7.) Geluk A, **Lin MY**, van Meijgaarden KE, Leyten EMS, Franken KLMLC, Ottenhoff THM, and Klein MR. T-cell recognition of the HspX protein of *Mycobacterium tuberculosis* correlates with latent *M. tuberculosis* infection but not with *M. bovis* BCG vaccination. *Infection and Immunity* 75(6):2914-2921, **2007**
- 8.) Roupie V, Romano M, Zhang L, Korf H, **Lin MY**, Franken KLMLC, Ottenhoff THM, Klein MR, and Huygen K. Immunogenicity of eight dormancy (DosR) regulon encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infection and Immunity* 75(2):941-949, **2007**

- 9.) Leyten EMS*, **Lin MY** *, Franken KLMC, Friggen AH, Prins C, van Meijgaarden KE, Voskuil MI, Weldingh K, Andersen P, Schoolnik GK, Arend SM, Ottenhoff THM, and Klein MR. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection* 8 (8):2052-2060, **2006**
- 10.) Klein MR, **Lin MY**, van Meijgaarden KE, Franken KLMC, Leyten EMS, and Ottenhoff THM. Methods and means for diagnostics, prevention and treatment of mycobacterium infections and tuberculosis disease. *European Patent Office*, Patent no. 05075748.3, 31-03-**2005**.
- 11.) Copray S, Küst B, Emmer B, **Lin MY**, Liem R, Amor S, de Vries H, Floris S, and Boddeke E. Deficient p75 low-affinity neurotrophin receptor expression exacerbates experimental allergic encephalomyelitis in C57/BL6 mice. *Journal of Neuroimmunology* 148 (1-2):41-53, **2004**

* These authors contributed equally

List of Abbreviations

Ag	antigen
APC	antigen presenting cell <i>and</i> allophycocyanin
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> bacille Calmette-Guérin
BLAST (p/n)	basic local alignment search tool (protein/nucleotide)
CFP-10	culture filtrate protein-10
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHP	conserved hypothetical protein
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DC	dendritic cell
DNA	deoxyribonucleic acid
Dormancy antigens	antigens encoded by the dormancy regulon
DosR	dormancy survival regulator (<i>encoded by Rv3133c</i>)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunosorbent spot
ESAT-6	early secreted antigenic target-6
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	foetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leucocyte antigen
HP	hypothetical protein
HspX	heat shock protein X
IFN γ	interferon gamma
IL	interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
Latency antigens	see Dormancy antigens
LPS	lipopolysaccharide
LST	lymphocyte stimulation test
LTBI	latent tuberculosis infection
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NO	nitric oxide
NRP	non replicating persistence
NTM	non tuberculous mycobacteria
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein
PLGA-PEI	poly (D, L-lactide- <i>co</i> -glycolide)-polyethyleneimine
PPD	purified protein derivative
PRR	pattern recognition receptors
RD	region of deletion
TB	tuberculosis
TCR	T cell receptor
Th	T helper cell

TLR	Toll-like receptor
TNF α	tumor necrosis factor alpha
TST	tuberculin skin test

