

DNA-ROKOTUS TEHOSTAA BACILLUS CALMETTE-GUERIN –
ROKOTTEEN MYKOBAKTEERI-INFEKTIOTA VASTAAN
ANTAMAA SUOJAA SEEPRAKALASSA

Maarit Ahava
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö
Joulukuu 2016

Sisällysluettelo

1 TIIVISTELMÄ	3
2 KIRJALLISUUSKATSAUS: Seeprakala prekliinisenä mykobakteeri-infektio- ja rokotemallina	4
2.1. Johdanto	4
2.2. Koe-eläinmallit tuberkuloositutkimuksessa	5
2.3. Seeprakalamalli ja mykobakteeri-infektion patogeneesi	6
2.4. Rokotekokeet seeprakaloilla	7
2.5. Kehitteillä olevat tuberkuloosirokotteet suhteessa BCG:hen	8
3 LÄHTEET	10

Tampereen yliopisto
Lääketieteen yksikkö/BioMediTech
Kokeellisen immunologian tutkimusryhmä

MAARIT AHAVA: DNA-ROKOTUS TEHOSTAA BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN –
ROKOTTEEN MYKOBAKTEERI-INFEKTIOTA VASTAAN ANTAMAA SUOJAA
SEEPRAKALASSA

Ohjaajat: Professori Mika Rämet, FM Kaisa Oksanen

Tiivistelmä artikkelista: DNA-rokotus tehostaa Bacillus Calmette-Guérin –rokotteen mykobakteeri-infektiota vastaan antamaa suojaa seeprakalassa (DNA vaccination boosts Bacillus Calmette-Guérin protection against mycobacterial infection in zebrafish, *Developmental and Comparative Immunology*, Tammikuu 2016.)

Tuberkuloosi on infektioauti, joka huolimatta kehittyneistä antibioottihoidoista ja laajalti käytetystä rokotteesta, aiheuttaa edelleen 8,6 miljoonan ihmisen sairastumisen ja 1,3 miljoonaa kuolemantapausta vuodessa. Tuberkuloosin aiheuttaja *Mycobacterium tuberculosis* on solunsisäinen bakteeri, joka aiheuttaa useimmissa terveissä yksilöissä latentin, oireettoman infektion. On arvioitu, että jopa kolmannes maailman väestöstä kantaa latenttia tuberkuloosi-infektiota.

Bacillus Calmette-Guérin (BCG-rokote) on tällä hetkellä ainoa käytössä oleva rokote tuberkuloosia vastaan. Se suojaa tehokkaasti lapsia *M. tuberculosis* aiheuttamalta aivokalvontulehdukselta ja disseminoituneelta (laajalle elimistöön levinneeltä) tuberkuloosilta. Sillä on kuitenkin varsin vaatimaton teho aikuisten keuhkotuberkuloosiin eikä se estä tuberkuloositartunnan saamista eikä latentin tuberkuloosi-infektion uudelleen aktivoitumista.

Seeprakala soveltuu hyvin koe-eläimeksi pienen kokonsa, pitkälle kehittyneen immuunipuolustuksensa sekä verrattain matalien ylläpitokustannustensa ansiosta. Lisäksi *M. tuberculosis* sukulainen *Mycobacterium marinum* on kaloille luontainen taudinaiheuttaja.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin BCG-rokotteen tehoa mykobakteeri-infektioon seeprakalamallissa. Aiemmissä tutkimuksissa seeprakalan on osoitettu soveltuvan sekä aktiivisen, että latentin mykobakteeri-infektion mallintamiseen ja käytettäväksi myös DNA-rokotteiden tutkimiseen.

Tutkimuksemme osoittaa, että BCG-rokote ei kokonaan estä mykobakteeri-infektiota seeprakalassa, mutta se antaa vaihtelevan asteisen suojan aktiivista infektiota vastaan. Vatsaonteloon annettu BCG-rokote pienensi kalojen kuolleisuutta suurella bakteeriannoksella aiheutettuun kokeelliseen mykobakteeri-infektioon. Toisessa koeasetelmassa käytettiin pientä mykobakteeriannosta, jolloin BCG:llä rokotetuilla kaloilla havaittiin parempi kyky rajata infektiota kuin verrokkiryhmällä. Osoitimme myös, että BCG itsessään ei aiheuta infektiota kalassa. Lisäksi tutkimuksemme osoittaa, että BCG-rokotteen suojaavaa vaikutusta voidaan tehostaa DNA-rokotteella. DNA-rokoteessa käyttämämme mykobakteerin geenit olivat *Ag85B*, *ESAT6* ja *RpfE*. Tuloksista voimme päätellä, että seeprakala soveltuu käytettäväksi BCG-rokotteen tehostamiseksi kehitettävien rokotteiden prekliinisiin tutkimuksiin.

Kirjallisuuskatsaus: Seeprakala prekliinisenä mykobakteeri-infektio ja -rokotemallina

Johdanto

Mycobacterium tuberculosis -bakteeri aiheuttaa tuberkuloosia, joka tappaa lähes kaksi miljoonaa ihmistä vuosittain. Nykyinen Bacillus Calmette-Guérin –rokote (BCG-rokote) ei ole riittävän tehokas ja sen käyttöön liittyy vakavia haittavaikutuksia. Antibiootit ovat tehostomia resistenttejä kantoja vastaan. (1, 2) Tuberkuloosin hoidon ja tutkimuksen haasteellisuutta lisää taudin monimutkainen patogeneesi. Tyypillisesti tuberkuloosin eteneminen on jaettu oireettomaan latenttiin vaiheeseen, jolle ominaista on granuloomien muodostus, sekä taudin reaktivoitumiseen. Pienelle osalle *M. tuberculosis* altistuneista ihmisistä kehittyy välittömästi primaari aktiivinen tuberkuloosi. Jako näihin kolmeen vaihtoehtoon (primaaristi aktiivinen, latentti ja reaktivoitunut tuberkuloosi) saattaa olla kuitenkin liian yksinkertaistava ja tätä ajattelutapaa joudutaan mahdollisesti muokkaamaan, kun tieto latentin infektion monimuotoisuudesta lisääntyy (3).

Mykobakteerit ovat solunsisäisiä bakteereja; sen sijaan, että makrofagit onnistuisivat tuhoamaan fagosytoimansa mykobakteerit, mykobakteerit voivat elää ja lisääntyä makrofagien sisällä ja aiheuttavat lopulta isäntäsolun kuoleman (4). Granuloomat muodostuvat puolustusolujen (T- ja B-lymfosyyttien, fibroblastien sekä makrofagien) kerääntyessä mykobakteereja sisältävän makrofagin ympärille. Granulooman sisällä makrofagit kuolevat ja mykobakteerit siirtyvät metabolisesti hyvin inaktiiviseen tilaan, dormanssiin, ja syntyy tuberkuloosille tyypillinen granulooma. (5)

Dna-rokote on yksi mahdollisista tuberkuloosin ennaltaehkäisy- ja hoitokeinoista tulevaisuudessa. Se on nykytiedon mukaan turvallinen tavanomaisiin rokotemenetelmiin verrattuna ja erityisen toiveikkaasti suhtaudutaan sen mahdollisuuksiin indusoida soluvälitteistä immunitettä (6). Nimenomaan soluvälitteinen immunitetti on keskeisessä roolissa tuberkuloosin torjunnassa (2). BCG-rokote, joka on ainoa nykyisin käytössä oleva tuberkuloosirokote, on tyypiltään elävä, heikennetty patogeeni: se sisältää *Mycobacterium bovis* –bakteeria, joka aiheuttaa tuberkuloosia nautaeläimissä (7). Koska kyseessä on elävä, vaikkakin heikennetty, bakteeri, BCG-rokotteen antamiseen liittyy riskejä, ja erityisesti immuunipuutteisille henkilöille se on itsessään potentiaalinen taudinaiheuttaja. BCG-rokotetta ei voida turvallisesti käyttää esimerkiksi HIV-positiivisille henkilöille tai elinsiirtopotilaille, mikä tekee sen käytöstä enenevässä määrin ongelmallista. (1) DNA-rokotteet eivät toimi taudinaiheuttajina, vaan niiden suojausteho perustuu

yksittäisten antigeenien koodaamiseen hyväksikäyttäen kohde-eliön solujen omaa proteiinisynteesiä. Kun DNA-rokote on injisoitu, solut alkavat tuottaa rokotteen koodaamia antigeeneja ja nämä saavat elimistössä aikaan halutun immuunivasteen ilman, että eliötä tarvitsee altistaa kokonaisille tautia aiheuttaville organismeille. DNA annostellaan joko sellaisenaan tai useimmin liitettynä turvalliseen virusvektoriin, joka parantaa DNA:n kulkeutumista isäntäsoluun ja jolla itselläänkin voi olla immunomodulatorisia vaikutuksia. (8)

DNA-rokotteiden tuottaminen on halpaa ja nopeaa (6), minkä vuoksi ne soveltuvat hyvin uusien rokoteantigeenien seulontaan. Tutkimuksessa seulottuja antigeeneja voidaan hyödyntää myös peptidirokotteiden kehitystyössä (9). DNA-rokotteiden potentiaalia tutkitaan paitsi tautien ehkäisyssä, niin myös hoidossa. Erityisesti autoimmuuni- ja syöpätautien saralla terapeuttiset DNA-rokotteet ovat jatkuvan kehitystyön alaisena. (10) Toimivan; ennaltaehkäisevän tai terapeuttisen, DNA-rokotteen kehittäminen edellyttää kuitenkin vielä paljon työtä perustutkimuksen tasolla, vaikka lupaavia edistysaskeleita on otettu monien muiden tautien (esim. HIV, malaria, hepatiitti B) sekä eläinlääketieteen piirissä (6). Ongelmana on toistaiseksi ollut lähinnä rokotteiden riittämätön teho (6, 9). BCG-rokotuksen tehostaminen (*"boosting"*) uudella rokotteella, mahdollisesti DNA- tai peptidipohjaisella, on yksi vaihtoehto tulevaisuuden rokotusstrategiaksi ja onkin aktiivisen tutkimustyön kohteena (11).

Tässä kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan tutkimuksia, joissa on osoitettu seeprakalan soveltuvan mykobakteeri-infektion mallinnukseen ja arvioitu seeprakalan käyttökelpoisuutta prekliinisiin mykobakteerirokotetutkimuksiin.

Koe-eläinmallit tuberkuloositutkimuksessa

Koe-eläinmallit ovat ainakin toistaiseksi olleet välttämättömiä ja korvaamattomia tuberkuloositutkimukselle. Parhaiten ihmisten keuhkotuberkuloosia voidaan mallintaa makakiapinoissa (12, 13). Myös lehmät ovat osoittautuneet arvokkaaksi tuberkuloosimalliksi (14). Suurikokoiset nisäkkäät ovat kuitenkin vaativia ylläpitää ja soveltuvat näin ollen huonosti laajoihin seulontatutkimuksiin, joita esimerkiksi tehokas uusien rokotekandidaattien etsiminen edellyttää.

Hiiri, marsu ja kani ovat laajalti käytettyjä koe-eläimiä tuberkuloositutkimuksissa: niillä on käytännölliseltä kannalta huomattavia etuja lehmiin ja kädellisiin nisäkkäisiin verrattuna, sillä ne ovat pienempiä sekä helpompia ja edullisempia ylläpitää. Valitettavasti hiirien, marsujen ja kaniin käyttökelvottomuutta vähentää niillä saatujen tutkimustulosten rajallinen yleistettävyyden (15, 16, 17).

Seeprakala (*Danio rerio*) on osoittautunut sopivaksi koe-eläimeksi tuberkuloositutkimukseen (9, 18). Sillä on sekä luonnollinen että hankinnainen immuniteetti, ja lisäksi *Mycobacterium marinum* seeprakalalle aiheuttamalla infektiolla on paljon yhteistä *Mycobacterium tuberculosis* ihmiselle aiheuttaman infektiota kanssa (9). Ihmisen tavoin seeprakalalle kehittyy latentti mykobakteeri-infektio, joka voidaan reaktivoida immunosuppressiivisella käsittelyllä, esimerkiksi gamma-säteilyllä (19). Histologisesti ihmisen ja seeprakalan infektiot muistuttavat toisiaan granuloomamuodostuksen osalta. (20) Näiden seikkojen vuoksi seeprakala on rajoitteistaan huolimatta houkutteleva malli mykobakteeri-infektioita tutkimaan.

Myös eettiset näkökohdat on aina huomioitava eläinkokeiden yhteydessä ja eläinten mahdollinen kärsimys on aina pyrittävä minimoimaan. Russell ja Burch esittivät jo 50-luvulla periaatteet, joihin koe-eläinten tarkoituksenmukainen ja eettinen käyttö edelleen perustuu. (21) Keskeisimpiä näistä periaatteista on niin kutsuttu 3R, joka viittaa sanoihin korvaaminen (*replacement*), vähentäminen (*reduction*) ja kohentaminen (*refinement*), ja jonka systemaattisella soveltamisella pyritään siis eläinkokeiden korvaamiseen muilla menetelmillä silloin, kun se on mahdollista, eläinkokeissa käytettävien eläinten määrien vähentämiseen silloin, kun se on tutkimuksen laatua heikentämättä mahdollista sekä koe-eläinten hyvinvoinnin turvaamiseen ja kärsimyksen vähentämiseen parantamalla tutkimusmenetelmiä, käytäntöjä ja eläinten elinolosuhteita. Suomen koe-eläinlainsäädäntö pohjautuu EU:n koe-eläindirektiiviin, joka puolestaan pohjautuu vahvasti edellä mainittuihin periaatteisiin. (22)

Seeprakalamalli ja mykobakteeri-infektioita patogeneesi

Seeprakala on tuottanut koe-eläimenä lisää tietoa mykobakteeritautien patogeneesistä, vaikka tulosten suoraa yleistettävyyttä toki rajoittavat monet ilmeiset eroavaisuudet kalojen fysiologian sekä kalojen taudinkuvan ja nisäkkäiden tyypillisen keuhkotuberkuloosin välillä.

Seeprakalamallissa luontaisen ja hankitun immunitetin välistä ”työnjakoa” pystytään arvioimaan vertaamalla alkioiden ja aikuisten kalojen vasteita toisiinsa, sillä alkioilta puuttuu hankinnainen immunitetti eli niiden immuunivaste on kokonaan luontaisen immunitetin varassa (23). Nykytiedon valossa tuberkuloosi-infektion alkuvaiheiden puolustuksella on ratkaiseva merkitys taudin jatkokehityksen kannalta, joten seeprakalan alkioiden immuunivasteen tutkimisella, ja erityisesti sen peilaamisella aikuisten seeprakalojen immuunivasteeseen, voidaan tulevaisuudessa tuottaa hyvin tärkeää tietoa mykobakteerien ja luontaisten immunologisten mekanismien vuoropuhelusta (24).

Seeprakalalle mykobakteeri-infektiossa syntyvien granuloomien katsotaan mallintavan hyvin tuberkuloosigranuloomia ihmisellä (20, 25). Granuloomamuodostuksen on perinteisesti ajateltu olevan taudin kantajaa hyödyttävä prosessi, sillä granulooman sisällä olevat bakteerit ovat hyvin inaktiivisia ja on katsottu, että granuloomat ovat osoitus terveen elimistön immuunijärjestelmän kyvystä rajata taudinaiheuttaja mahdollisimman harmittomaan muotoon. On kuitenkin huomattava, että toisaalta granuloomat tarjoavat mykobakteereille turvallisen, immuunijärjestelmän soluilta suojatun ympäristön, jonka sisällä taudinaiheuttaja voi hyvin pitkiäkin aikoja, jopa vuosikymmeniä, odottaa otollista hetkeä uudelleen aktivoitumiselle.

Myös seeprakalamallissa on havaittu merkkejä granuloomien edullisuudesta bakteerin kannalta: granuloomamuodostus aktivoi seeprakalan makrofageissa epiteliaalisia yksiköitä, kun taas makrofagien epitelisaation esto häyttasi granuloomamuodostusta, mikä puolestaan edisti immuunipuolustuksen muuta toimintaa ja paransi koe-eläinten selviytymistä infektiosta (26).

Rokotekokeet seeprakaloilla

Seeprakala on osoittautunut hyödylliseksi infektiomalliksi ja näyttää soveltuvan hyvin

rokotetutkimukseen. Tampereen yliopiston kokeellisen immunologian ryhmä on mallintanut pneumokokki-infektiota (27) sekä aktiivista, että latenttia mykobakteeri-infektiota seeprakalassa ja tutkinut DNA-rokotusten potentiaalia mykobakteeri-infektion torjunnassa. Rokotusmenetelmä on optimoitu erikseen DNA-rokoteelle (9) ja BCG-rokotteelle (28): DNA-rokotteet on annosteltu lihaksen sisäisesti mikroinjektorineulaa käyttäen ja rokotteen ekspressiota on tehostettu elektroporaatiolla. BCG-rokote on puolestaan annosteltu kalojen vatsaonteloon. Tarkempien rokotusprotokollien ja muiden metodien suhteen viittaa alkuperäistutkimuksiin.

Tutkimuksissa havaittiin, että sekä DNA-rokotteella yksinään, että edeltävästi BCG-rokotetuilla ja sen jälkeen DNA-rokotetuilla kaloilla oli paremmat mahdollisuudet selviytyä kokeellisesta mykobakteeri-infektiosta kuin rokottamattomilla tai lumerokotteen saaneilla kaloilla. (9, 28) Rokotuksen tehossa oli kuitenkin laajaa variaatiota yksilöiden välillä, mikä toisaalta vastanee tilannetta ihmisten kohdalla, sillä erityisesti aikuisilla tehdyissä BCG-rokotustutkimuksissa on havaittu laajaa vaihtelua rokotteen tuottamassa immuunivasteessa (29). BCG-rokotteen tehoa seeprakaloissa tutkineen artikkelin qRT-PCR-analyysissä havaittiin, että BCG-rokotetuilla kaloilla TNF (tuumorinekroositekijä) indusoitui verrokkiryhmää heikommin (28). Samassa tutkimuksessa BCG-rokotusta pyrittiin tehostamaan DNA-rokoteella, joka koodasi antigeeneja Ag85B, ESAT6 ja RpfE. Näistä kaksi ensimmäistä on laajalti tutkittuja potentiaalisia rokoteantigeeneja. Kiinnostus Ag85-antigeenia kohtaan on runsasta: tällä hetkellä käynnissä olevista kolmestatoista kliinisestä tuberkuloosirokotekokeesta kuudessa on mukana Ag85 –antigeenia (joko Ag85A tai Ag85B) (11). RpfE on ”*resuscitation promotion factor*” –geeni, jonka ajatellaan nimensä mukaisesti liittyvän mykobakteeri-infektion reaktivoitumiseen.

Kehitteillä olevat tuberkuloosirokotteet suhteessa BCG:hen

Kaikkiaan 13 rokotekandidaattia on tällä hetkellä edennyt kliinisiin tutkimuksiin. Faasissa III on näistä vain yksi rokote; kokonaisia *M. vaccae* -soluja sisältävä immunoterapeuttinen rokote. I ja II faasin kokeissa on perinteisten, kokonaisten taudinaiheuttajien lisäksi proteiiniadjuvanttirokotteita ja virusvektoria hyödyntäviä DNA-rokotteita. (1, 11)

Käynnissä olevista kliinisistä kokeista valtaosassa pyritään aiemmin saadun BCG-rokotuksen

tehostamiseen ja vain neljän rokotteen kohdalla tavoitteena on kokonaan korvata BCG uudella rokotteella (11). Kokonaan uuden rokotteen kehittäminen aiheuttaa huomattavia haasteita, sillä sen pitää olla paitsi tehokas, mutta myös turvallisempi ja laajempi käyttöprofiililtaan kuin BCG. Tämän vuoksi on oleellista, että BCG:llä on voitu osoittaa olevan suojaustehoa myös prekliinisissä eläinmalleissa. Seeprakalalla tehdyt BCG-kokeet entisestään vahvistavat sen käyttökelpoisuutta tuberkuloosi- ja erityisesti tuberkuloosirokotemallina.

Lähteet:

1. World Health Organization, Global tuberculosis report, http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_main_text.pdf?ua=1 14.12.2016
2. Lin PL, Flynn JL. 2010. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *The Journal of Immunology* 185, 15-22
3. Douglas B. Young Hannah P. Gideon and Robert J. Wilkinson. Eliminating latent tuberculosis. *Trends in microbiology* 17(5), 183-189 2009
4. Kaufmann, Stefan H.E.; Dorhoi, Anca Molecular Determinants in Phagocyte-Bacteria Interactions. *Immunity*. 44(3):476-491, March 2016.
5. Gengenbacher, Martin 1; Kaufmann, Stefan H.E. 1 Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. *Fems Microbiology Reviews*. 36(3):514-532, May 2012.
6. Ingolotti M, Kawalekar O, Shedlock DJ, Muthumani K and Weiner DB. DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Vaccines* 9(7), 747-763, 2010
7. Calmette A Guérin C, Boquet A, Nègre L. La vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG" 1927.
8. Cervantes-Villagrana AR; Hernandez-Pando R; Biragyn A; Castaneda-Delgado J; Bodogai M; Martinez-Fierro M; Sada E; Trujillo V; Enciso-Moreno A; Rivas-Santiago B. Prime-boost BCG vaccination with DNA vaccines based in [beta]-defensin-2 and mycobacterial antigens ESAT6 or Ag85B improve protection in a tuberculosis experimental model. *Vaccine*, 2012; 31:676-84.
9. Oksanen, Kaisa E; Halfpenny, Nicholas J A; Sherwood, Eleanor; Harjula, Sanna-Kaisa E; Hammaren, Milka M; Ahava, Maarit J; Pajula, Elina T; Lahtinen, Marika J; Parikka, Matalena; Ramet, Mika. Adult zebrafish model for studying DNA-based vaccination against mycobacterial disease. *Vaccine*. 31(45):5202-9, 2013 Oct 25.
10. Guo, Chunqing; Manjili, Masoud H; Subjeck, John R; Sarkar, Devanand; Fisher, Paul B; Wang, Xiang-Yang. Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present, and Future. *Advances in Cancer Research*. 119 (Suppl. C):421-475, 2013.
11. The Treatment Action Group: Pipeline Report 2016: The tuberculosis prevention pipeline. <http://www.pipelinereport.org/2016/tb-prevention> 14.12.2016
12. Flynn, JoAnne L; Gideon, Hannah P; Mattila, Joshua T; Lin, Philana Ling. Immunology studies in non-human primate models of tuberculosis. *Immunological Reviews*. 264(1):60-73, March 2015.
13. Gormus BJ, Blanchard JL, Alvarez XH, Didier PJ. Evidence for a rhesus monkey model of asymptomatic tuberculosis. *Journal of Medical Primatology*. 2004;33:134-45
14. Vordermeier, H Martin; Rhodes, Shelley G; Dean, Gillian; Goonetilleke, Nilu; Huygen, Kris; Hill, Adrian V S; Hewinson, R Glyn; Gilbert, Sarah C. Cellular immune responses induced in cattle by heterologous prime-boost vaccination using recombinant viruses and bacille Calmette-Guerin. *Immunology*. 112(3):461-470, July 2004
15. Scanga CA, Mohan VP, Yu K, Joseph H, Chan J, Flynn JL. Reactivation of latent tuberculosis: Variations on the Cornell model. *Infection and Immunity*. 1999; 67:4531-4538.
16. Palanisamy GS, DuTeau N, Eisenach KD, Cave DM, Theus SA, Kreiswirth BN, Basaraba RJ, Orme IM. Clinical strains of Mycobacterium tuberculosis display a wide range of virulence in guinea pigs. *Tuberculosis (Edinburgh)* 2009;89:203-209.
17. Via, Laura E; Lin, P Ling; Ray, Sonja M; Carrillo, Jose; Allen, Shannon Sedberry; Eum, Seok Yong; Taylor, Kimberly; Klein, Edwin; Manjunatha, Ujjini; Gonzales, Jacqueline; Lee, Eun Gae; Park, Seung Kyu; Raleigh, James A; Cho, Sang Nae; McMurray, David N;

- Flynn, JoAnne L; Barry, Clifton E 3rd. . Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. *Infection and Immunity*. 2008;76:2333-2340
18. Prouty, Michael G; Correa, Nidia E; Barker, Lucia P; Jagadeeswaran, Pudur; Klose, Karl E. Zebrafish-*Mycobacterium marinum* model for mycobacterial pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*. 225(2):177-82, 2003 Aug 29
 19. Parikka, Matalaena; Hammaren, Milka M; Harjula, Sanna-Kaisa E; Halfpenny, Nicholas J A; Oksanen, Kaisa E; Lahtinen, Marika J; Pajula, Elina T; Iivanainen, Antti; Pesu, Marko; Ramet, Mika. *Mycobacterium marinum* causes a latent infection that can be reactivated by gamma irradiation in adult zebrafish. *PLoS Pathogens*, 2012, 8:e1002944.
 20. L.E. Swaim, L.E. Connolly, H.E. Volkman, O. Humbert, D.E. Born, L. Ramakrishnan *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infection and Immunity*, 74 (2006), pp. 6108–6117
 21. W.M.S. Russell and R.L. Burch *The Principles of Humane Experimental Technique* http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc 31.1.2017
 22. European Union, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010L0063>
 23. van der Sar, Astrid M; Spaink, Herman P; Zakrzewska, Anna; Bitter, Wilbert; Meijer, Annemarie H. Specificity of the zebrafish host transcriptome response to acute and chronic mycobacterial infection and the role of innate and adaptive immune components. *Molecular Immunology*. 46(11-12):2317-32, 2009 July.
 24. Meijer, Annemarie H. 1,*; van der Vaart, Michiel 1; Spaink, Herman P. Real-time imaging and genetic dissection of host-microbe interactions in zebrafish. *Cellular Microbiology*. 16(1):39-49, January 2014.
 25. J.M. Davis, H. Clay, J.L. Lewis, N. Ghori, P. Herbomel, L. Ramakrishnan Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity*, 17 (2002), pp. 693–702
 26. Cronan, Mark R; Beerman, Rebecca W; Rosenberg, Allison F; Saelens, Joseph W; Johnson, Matthew G; Oehlers, Stefan H; Sisk, Dana M; Jurcic Smith, Kristen L; Medvitz, Neil A; Miller, Sara E; Trinh, Le A; Fraser, Scott E; Madden, John F; Turner, Joanne; Stout, Jason E; Lee, Sunhee; Tobin, David M. Macrophage Epithelial Reprogramming Underlies Mycobacterial Granuloma Formation and Promotes Infection. *Immunity*. 45(4):861-876, October 18, 2016.
 27. Saralahti, Anni; Piippo, Hannaleena; Parikka, Matalaena; Henriques-Normark, Birgitta; Ramet, Mika; Rounioja, Samuli. Adult zebrafish model for pneumococcal pathogenesis. *Developmental and Comparative Immunology*. 42(2):345-353, February 2014
 28. Oksanen, Kaisa E; Myllymaki, Henna; Ahava, Maarit J; Mäkinen, Leena; Parikka, Matalaena; Ramet, Mika. DNA vaccination boosts *Bacillus Calmette-Guérin* protection against mycobacterial infection in zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*. 54(1):89-96, January 2016.
 29. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 13(8):761, August 1994.

