

VU Research Portal

Immunogenetics of infection and inflammation of the urogenital and gastrointestinal tracts and probiotics

Karimi, O.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Karimi, O. (2011). *Immunogenetics of infection and inflammation of the urogenital and gastrointestinal tracts and probiotics*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl



Samenvatting



Samenvatting

R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
R9
R10
R11
R12
R13
R14
R15
R16
R17
R18
R19
R20
R21
R22
R23
R24
R25
R26
R27
R28
R29
R30
R31
R32
R33
R34
R35
R36
R37
R38
R39



In dit proefschrift zijn verschillende aspecten van ontstekings- (inflammatoire-) en infectieuze processen bestudeerd om de rol te verduidelijken van de immuunrespons, genetische aanleg/ gevoeligheid, triggers vanuit de omgeving en de luminale microbiële antigenen bij ziekten van de urogenitale en gastrointestinale (maag-darm) kanalen. Het is voornamelijk de combinatie van deze factoren die de uitingsvorm en het beloop van ziekte bepaalt. Analyse van deze verschillende factoren heeft geholpen om inzicht te krijgen in de aanleg/gevoeligheid voor en de ernst van de bestudeerde ziektes.

In het eerste deel van dit proefschrift hebben wij de rol van de immunogenetica bij de gevoeligheid voor en de ernst van het beloop van bacteriële *Chlamydia trachomatis* (Ct) infecties van het urogenitale kanaal bij de vrouw onderzocht. In het tweede deel richt het onderzoek zich op de rol van de immunogenetica bij de multifactoriële chronische ontstekingsziekten van de darm (in het Engels ‘inflammatory bowel disease (IBD)’ geheten), colitis ulcerosa (CU) en de ziekte van Crohn (CD). Het derde deel is toegespitst op de rol van probiotica als modulators van het afweersysteem bij ziekten van het maag-darmkanaal, bij IBD en de extra-intestinale manifestaties die hiermee gepaard gaan.

De achtergrond van de aanpak waarvoor in dit proefschrift is gekozen, is dat mucosale oppervlakken voortdurend bloot staan aan pathogene en commensale microben. Chronische ontstekingen en infecties spelen een belangrijke rol bij de pathogenese van ziektes die zowel de gastrointestinale slijmvliezen (mucosa) als de urogenitale mucosa aantasten. Bij aanhoudende stimulatie van het afweer- of immuunsysteem is een homeostatisch evenwicht tussen tolerantie voor en immuniteit van lichaamsvreemde antigenen vereist wat een voor het mucosale immuunsysteem unieke uitdaging is.

Associatie met microben (bacteriën, virussen, en schimmels), kan voor de gastheer voordelig dan wel schadelijk zijn, afhankelijk van de microbe en diens rol. Ons immuunsysteem bepaalt of een signaal van een microbe geassocieerd moleculair patroon (MAMP) komt op “gevaar” duidt, namelijk moleculen die afgegeven worden door beschadigde cellen van de gastheer. Ieder voor zich zijn signalen die voortvloeien uit activatie door MAMPs of door schade, niet in staat om een optimale regulatie van de gastheer immuniteit te induceren. Echter, gezamenlijk kunnen ze in het maag-darm kanaal wel een effectieve afweer en homeostase teweeg brengen.¹

Onlangs bleek dat epitheelcellen een sleutelrol bezitten bij het handhaven van de mucosale immuun homeostase door onderscheid te maken tussen pathogenen en commensalen, en hun invloed op antigeen presenterende cellen en lymfocyten. Epitheelcellen brengen verschillende immuunrespons genen tot expressie zoals die coderen voor het zogeheten ‘major histocompatibility complex’ (MHC) klasse I en II, chemokines, cytokines en prostaglandines, die nodig zijn voor activatie van de verschillende intracellulaire regulatoire pathways. Hun functie is van groot belang voor de initiatie en regulatie van de aangeboren en verworven immuunrespons.

Deel I

Dit deel focust op kandidaat genen die betrokken zijn bij de immuniteit van Ct infecties van het urogenitale kanaal van de vrouw. Epidemiologie, diagnostische procedures en behandeling van Ct infecties, de meest voorkomende sexueel overdraagbare bacteriële infectie in Nederland, zijn beschreven in **Hoofdstuk 1**.

De cruciale eerste stap in de strijd tegen Ct infecties is de herkenning van het pathogeen. Afwijkingen in de herkenning kunnen leiden tot persisterende infecties, opstijgend naar het bovenste gedeelte van het genitale kanaal en late complicaties zoals ontsteking in het kleine bekken en pathologie van de tubae (eileiders), die eventueel kan leiden tot subfertiliteit en uiteindelijk infertiliteit. Polymorfismen in genen die betrokken zijn bij het (aangeboren) immuunsysteem die leiden tot een afwijkende genfunctie of -expressie spelen een belangrijke rol bij de erfelijke aanleg voor en de ernst van ziekte. **Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de resultaten van studies die immunogenetische markers bestudeerden die betrokken zijn bij de verhoogde gevoeligheid voor oculaire Ct infecties en sexueel overdraagbare Ct infecties.

Toll-like receptoren (TLR)

TLR2, TLR4, en TLR9 zijn gespecialiseerde patroonherkenning receptoren, die aanzienlijk bijdragen aan de antibacteriële afweer van de gastheer bij Ct infecties. ‘Single nucleotide polymorphisms (SNPs)’ in de voor deze receptoren coderende genen van de gastheer dragen bij aan de pathogenese, het beloop, en de ernst van deze infecties. De herkenning van het door lipopolysaccharide (LPS) van *Chlamydia* geïnduceerde signaal en de ontwikkeling van tubapathologie bij muizen hebben het belang van TLR2 bewezen bij de inflammatoire respons van de gastheer op *Chlamydia* infecties.²⁻⁴ Onlangs is aangetoond dat TLR gemedieerde signaal transductie bevordert wordt door MHC klasse II moleculen.⁵

Hoofdstukken 3 en 4 beschrijven onze bevindingen van een significante trend voor *TLR2* haplotype 1 (-16934 T / +2477 G) bij de bescherming tegen het ontwikkelen van symptomen en het vervolgens vertonen van tubapathologie.

Experimenteel onderzoek heeft aangetoond dat TLR4 een rol speelt bij *Chlamydia* infecties. Recente humane studies toonden een rol aan voor *TLR4* variaties bij *Chlamydia* infecties.⁶ Wij hebben een stijgende trend waargenomen voor de ontwikkeling van tuba pathologie in vrouwen die positief zijn voor zowel Ct DNA en Ct IgG die tevens drager zijn van *TLR4* +896 *G (rs4986790).⁶

Chlamydia positieve vrouwen die drager zijn van het *TLR9* -1237 CC genotype (rs5743836) hebben minder vaak symptomen in vergelijking met vrouwen die drager zijn van de CT of TT genotypen (p: 0.056). Haplotype analyses laten aan aflopende trend zien voor symptomen bij dragers van *TLR9* haplotype 3 (-1237 C (rs5743836) / + 2848 A (rs352140)). Wij hebben

in een eerdere studie een aflopende trend laten zien in het dragerschap van *TLR9* haplotype 4 (-1237 C / +2848 G) tussen *Chlamydia* positieve vrouwen zonder symptomen, met symptomen, en met tuba pathologie.⁷ Aangezien beide haplotypen het *TLR9* -1237 C allel bevatten hebben we de hypothese gevormd dat dit allel betrokken is bij de bescherming tegen *Chlamydia* infecties. Lange *et al.* vonden een matig verhoogde promotor activiteit die geassocieerd was met het CC genotype. Dit zou verklaard kunnen worden door de vorming van een NF- κ B bindingsplaats zoals is aangetoond in *in silico* analyses.⁸ De *in silico* analyses impliceren dat dit Single Nucleotide Polymorfisme (SNP) een mogelijke NF- κ B creëert dat relevant kan zijn voor de pathogenese.^{9,10} Met behulp van luciferase testen hebben El-Omar *et al.* laten zien dat de verschillen in transcriptie activatie niet statistisch verschillend waren tussen de wildtype en mutanttype constructen onder basale condities. Maar TNF- α , LPS, en CpG geïnduceerde transcriptie activiteit was significant verhoogd in cellen getransfecteerd met het *TLR9* -1237 C allel. Met behulp van een vergelijkbare, nieuwe *in silico* regulatoire SNP detectie methode¹¹ konden we een significant verhoogde binding van NF- κ B, avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (RelA), en signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and het *TLR9* C allel voorspellen. Uitgaande van deze voorspellingen kan men stellen dat het *TLR9* -1237 C allel leidt tot een verhoogde bindingsaffiniteit voor NF- κ B, hetgeen leidt tot een verhoogde transcriptie activiteit van het gen^{9,10} met als gevolg een verhoogde productie van cytokines en chemokines. Dit zou een plausibele verklaring kunnen zijn voor de door ons waargenomen afname van symptomen bij *Chlamydia* geïnfecteerde patiënten.

Onze studies laten zien dat TLR2, TLR4, en TLR9 het klinisch beloop van *Chlamydia* infecties kunnen beïnvloeden. Specifieke haplotypen beschermen tegen een ernstiger klinisch beloop. Logistische regressie modellering van de *TLR4* SNPs, *TLR2* en *TLR9* haplotypen laat significante effecten zien voor specifieke *TLR2* en *TLR9* combinaties op het beloop van *Chlamydia* infecties. Onlangs werd gevonden dat muizen die geen *TLR2*, *TLR4*, en *TLR9* genen hebben minder vatbaar zijn voor *Salmonella* infecties dan muizen bij wie alleen *TLR2* en *TLR4* of *TLR4* en *TLR9* ontbrak.¹²

Chemokine receptor CXCR5

Na infectie, is chemokine receptor CXCR5 benodigd bij de vorming van lymfoïde aggregaten in het weefsel op de plaats van de infectie. Verstoring van intracellulaire chemokine pathways verandert de immuunrespons. In **hoofdstuk 5** hebben we het belang van CXCR5 voor Ct infecties getoond. We hebben bovendien een statistisch significant beschermend effect waargenomen van allel *CXCR5* +9086*C (en van de haplotypen waarin dit allel voorkomt) op het ontwikkelen van Ct infecties en op late complicaties in de vorm van het optreden van tubopathologie.

Deel II

Het tweede deel van dit proefschrift beslaat de rol van genen die betrokken zijn bij de immuunregulatie van IBD en geassocieerde extra-intestinale manifestaties. Genpolymorfismen hebben hier invloed op de aanleg en de ernst van de ziekten. De *JAK2*, *F13A1*, en *PPAR-γ* genen werden bestudeerd en genen beschreven die verstoord zijn bij het proces van autofagie, het vermogen om intracellulaire bacteriën op te ruimen, bij CD.

Janus kinase 2 (JAK2)

In **Hoofdstuk 6** bestudeerden we de aanwezigheid van de Janus kinase 2 (*JAK2*) V617F somatische ‘gain-of-function’ mutatie in genomisch DNA dat werd geïsoleerd uit perifere bloed van patiënten met IBD die een episode van trombose hadden doorgemaakt. Ondanks het gebruik van een heel gevoelige kwantitatieve genotypering methode hebben wij de mutatie niet kunnen aantonen. Dit suggereert dat andere mechanismen dan de verwerving van deze mutatie of andere genen samen met omgevingsfactoren een belangrijke rol spelen in de pathogenese van trombose in IBD. Dat het aantal patiënten met splanchnische veneuze trombose, die geassocieerd zijn met de *JAK2* V617F mutatie¹³, in onze studie groep klein is, ondersteunt deze verklaring.

Bloed coagulatie factor XIII

Patiënten met IBD hebben een verhoogd risico op veneuze trombo-emboliën (VTE) en recidiverende trombose ten opzichte van de algemene populatie. Eerdere onderzoeken hebben beschreven dat de plasma coagulatie factor XIII activiteit verminderd is in IBD. Van twee veel voorkomende ‘non-synonymous’ SNPs (die tot aminozuur verandering leiden) in het gen dat codeert voor coagulatie factor XIII, namelijk A1 polypeptide *F13A1* Val34Leu en *F13A1* Pro564Leu die mogelijk geassocieerd zijn met trombose, was het van belang te weten of ze mogelijk ook verantwoordelijk zijn voor het toegenomen risico op trombose in IBD en bestudeerden we eveneens hun bijdrage aan de genetische susceptibiliteit voor CU, CD, en IBD en subfenotypen. (**Hoofdstuk 7**). Wij hebben in CD geen statistisch significante verschillen waargenomen in frequentie tussen de bestudeerde gen polymorfismen en de mate van uitbreidbaarheid van de aandoening noch naar de onderverdeling in leeftijd, presentatie, en lokalisatie volgens de Vienna classificatie. Een lichte trend werd waargenomen voor een verminderd dragerschap van het 564Leu/Leu genotype in het type CD dat zich presenteert met fistels en fistelgangen. In de door ons bestudeerde groepen Nederlandse CU en CD patiënten en gezonde controles vonden we een significante positieve associatie met *F13A1* 34Leu dragers. Omdat het een betrekkelijk kleine studie groep betreft en recente meta-

analysen van zeer grote genomwijde associatie studies (GWAS) geen bewijs vonden voor bijdrage van *F13A1* SNPs waaronder de beide door ons bestudeerde SNPs^{14,15} concludeerden we dat onze bevinding waarschijnlijk op een type II fout (fout negatief) berust en de bijdrage aan de susceptibiliteit in IBD van *F13A1* SNPs met een allel frequentie boven 5% op zijn hoogst heel zwak genoemd kan worden.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ)

De ‘peroxisome proliferator-activated receptor gamma’ (PPAR-γ) receptor op het membraan van de celkern behoort tot de superfamilie van ligand-geactiveerde transcriptie factoren, en reguleert de expressie van veel genen die onder meer betrokken zijn bij het lipide en lipoproteïne metabolisme, glucose metabolisme, glucose homeostase, en downregulatie van de inflammatoire pathways teweeg brengt. Afgenomen expressie van PPAR-γ in colon epitheel in patiënten met CU en toegenomen expressie in hypertrofisch mesenteriaal vetweefsel in CD zijn beschreven.

Onlangs toonden Yamamoto-Furusho *et al.*,¹⁶ aan dat PPAR-γ mRNA expressie afgenomen was in rectale mucosa van patiënten met actieve CU vergeleken met CU patiënten in remissie en zij vonden ook dat de expressie van het PPAR-γ gen negatief gecorreleerd was met endoscopisch waargenomen activiteit. In **Hoofdstuk 8** hebben we de associatie van de PPAR-γ polymorfismen Pro12Ala en C161T met IBD en met CU en CD subfenotypen in Chinese en Nederlandse populaties geëxploreerd. In Chinese CU patiënten kwamen dragers van allel T van het C161T polymorfisme vaker voor dan in de controle groep (37,7% vs. 25,5%, OR 1,77, 95%CI 1,18–2,68, P<0,007) en Ala dragers van het Pro12Ala polymorfisme waren geassocieerd met uitgebreidere ziekte (P<0,002). Er werden geen associaties met CD gevonden. In de Nederlandse populatie hebben wij geen associatie gevonden met CU, CD, of IBD voor het C161T polymorfisme. Deze studie vormt een extensie van onze eerdere studie in Nederlandse IBD patiënten waarbij geen associatie werd gevonden tussen 8 PPAR-γ zogeheten ‘haplotype tagging’ polymorfismen (inclusief Pro12Ala), die bijna alle in het gen waargenomen allelen (met een frequentie >5%) representeerden.¹⁷ Het verschil in etniciteit tussen de populaties kan verantwoordelijk zijn voor de in CU patiënten gevonden verschillen in associatie met het C161T polymorfisme. Een alternatieve verklaring kan zijn dat dit polymorfisme slechts een genetische marker is die geassocieerd is met Chinese CU en het oorzakelijke variant allel in sterk linkage disequilibrium is met het PPAR-γ 161T allel in de Chinese maar niet in de Nederlandse populatie. Verder kunnen tegenstrijdige resultaten het gevolg zijn van verschillende klinische pathologie, mogelijk als gevolg van interactie van genetische (modifier) genen met variërende omgevingsfactoren zoals de commensale microbiota.

Autofagie

Autofagie werd lang beschouwd als een evolutionair geconserveerd proces waarin cytoplasmatische organellen kunnen worden afgebroken als respons op verhongering. Onlangs werd duidelijk dat het ook betrokken is bij de omsluiting en afbraak van intracellulaire pathogenen (xenofagie).¹⁸ In **Hoofdstuk 9** beschrijven wij de link tussen autofagie en de aangeboren en adaptieve (verworven) immuniteit. We bediscussieerden de beschreven associaties met CD van de polymorfismen in het *autophagy related 16-like 1* gen (*ATG16L1*) en het *immunity-related GTPase family, M locus (IRGM)* die uit GWAS voortkwamen en de identificatie van een vaak voorkomend 20.1-kb zogenaamd ‘copy number variation (CNV)’ deletie in het gebied vóór het *IRGM* gen.¹⁹

Na onze publicatie werd duidelijk dat de associaties tussen CD en de polymorfismen in het niet-coderende deel van het *IRGM* gen die werden waargenomen in Europese individuen het gevolg kunnen zijn van de ‘silent’ exon SNP rs10065172 die in perfecte linkage disequilibrium is met de 20.1 kb deletie.²⁰

MicroRNAs van de miRNA-196 familie blijken tot overexpressie te komen in darmepitheel van patiënten met CD en zorgen alleen voor vermindering van het beschermende (C) variant allel. Dit leidt tot verlies van *IRGM* expressie en heeft verminderde werkzaamheid van autofagie tot effect.²⁰ Autofagie zou ook wel eens een belangrijke rol kunnen spelen in de mechanismen die betrokken zijn bij de aetiopathogenese van *Chlamydia* infecties.

Na *Chlamydia* infectie, wordt de binnendringende bacterie niet gezien als object voor lysosomale degradatie en antagoneert ten dele het autofagie proces van de gastheer. Al-Younes *et al.* veronderstelden dat *Chlamydiae* voor hun intracellulaire groei gebruik maken van nutriënten die vrijgemaakt worden door het autofagie proces.²¹

Deel III

Probiotica als immunoregulatoren van darmontsteking

De darmflora (microbiota) wordt wel als de volgende grens gezien in het begrijpen van de gezondheid van de mens en bij de ontwikkeling van biotherapeutica. Dit gedachtig richt het laatste deel van mijn proefschrift (**hoofdstukken 10, 11 en 12**) zich op het begrijpen van de rol van probiotica in de modulatie van de microbiota van de darm en de controle van de ontsteking bij gastrointestinale ziekten. Het maag-darm kanaal van de mens herbergt 500 tot 1000 verschillende bacterie soorten en een hoeveelheid van 10¹⁴ micro-organismen.^{22,23} Het genoom van de gastheer, diens immuunsysteem, en omgevings- en leefstijlfactoren hebben een aanzienlijke invloed op de samenstelling van de microbiota.²⁴ De microbiota vormt een orgaansysteem dat essentieel is voor opname van voedingsstoffen en fermentatie in de colon,

het metabolisme van onverteerbare producten en koolhydraat opname in de dunne darm, de ontwikkeling van de architectuur van de darm en het immuunsysteem en de afweer tegen kolonisatie door pathogenen.^{25,26}

Onderzoek naar de darmflora bij patiënten met IBD heeft een aanzienlijke vooruitgang geboekt, waarbij verschil is waargenomen in de samenstelling bij CD en CU in vergelijking met gezonde controles.^{27,28} Het intestinale epitheel vormt een relatief impermeabele barrière voor de lumenale bacterien, bacteriële producten en antigenen uit de voedingsstoffen. Dysfunctie van deze barrière is een belangrijk kenmerk van CD, aangezien een toegenomen blootstelling aan vreemde antigenen de intestinale permeabiliteit doen toenemen en daarmee de penetrantie van de antigenen.

De met CD geassocieerde mutaties in genen die betrokken zijn bacteriële detectie zoals in *NOD2* en *IL23R*, versterken de link tussen microbiota en ontsteking in IBD. Deficiënte *NOD2* functie veroorzaakt een verstoring (dysbiose) in de regulatie van expressie van defensine, een verminderd bactericide vermogen, en verstoring en balans van microbiota in de vroege kinderleeftijd.²⁹

Dysbiose wordt herhaaldelijk gezien bij patiënten met IBD, waarbij ook commensalen zoals *Helicobacter*, *Clostridium* and *Enterococcus* een pathogeen effect hebben. Deze commensalen veroorzaken geen ontstekingen in de gezonde populatie. Adherente en invasieve *Escherichia coli* of Norovirus triggeren het begin van IBD of opvlammingen hiervan.^{30,31}

Modulatie van de microflora kan diens metabole en immuun-modulatoire functies beïnvloeden. Verschillende open studies hebben beschreven dat probiotica een heilzaam effect heeft in een verscheidenheid aan ziektes variërend van IBD tot het prikkelbare darm syndroom.

Vele probiotische bacteriële soorten hebben zowel afzonderlijk als in combinaties (zoals VSL#3) de ziekte symptomen in IBD kunnen verbeteren, dit geldt ook voor dier (muis) modellen.³² Recent dubbelblind en placebo gecontroleerd onderzoek heeft echter ondanks alle hooggespannen verwachtingen geen bewijs getoond voor de werkzaamheid van pre-, syn-, and probiotica.³³⁻³⁵

Tenslotte zijn in het hoofdstuk ‘**General discussion, summary and future perspectives**’ de bevindingen uit voorgaande hoofdstukken bediscussieerd en geactualiseerd en werd een kijk op de (nabije) toekomst gepresenteerd.

Referenties

1. Lazzaro BP, Rolff J. Immunology. Danger, microbes, and homeostasis. *Science* 2011;332(6025):43-4.
2. Darville T, O'Neill JM, Andrews CW, Jr., Nagarajan UM, Stahl L, Ojcius DM. Toll-like receptor-2, but not Toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection. *J Immunol* 2003;171(11):6187-97.
3. Prebeck S, Kirschning C, Durr S, et al. Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in Chlamydia pneumoniae-induced activation of dendritic cells. *J Immunol* 2001; 167(6): 3316-23.
4. Erridge C, Pridmore A, Eley A, Stewart J, Poxton IR. Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via toll-like receptor 2. *J Med Microbiol* 2004;53:735-40.
5. Hassan GS, Mourad W. An unexpected role for MHC class II. *Nat Immunol* 2011 ;12(5): 375-6.
6. den Hartog JE, Lyons JM, Ouburg S, et al. TLR4 in Chlamydia trachomatis infections: knockout mice, STD patients and women with tubal factor subfertility. *Drugs Today (Barc)* 2009;45 Suppl B:75-82.
7. Ouburg S, Lyons JM, Land JA, et al. TLR9 KO mice, haplotypes and CPG indices in Chlamydia trachomatis infection. *Drugs Today (Barc)* 2009;45 Suppl B:83-93.
8. Lange NE, Zhou X, Lasky-Su J, et al. Comprehensive genetic assessment of a functional TLR9 promoter polymorphism: no replicable association with asthma or asthma-related phenotypes. *BMC Med Genet* 2011;12:26.
9. El-Omar EM, Ng MT, Hold GL. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene* 2008;27(2):244-52.
10. Ng MT, Van't Hof R, Crockett JC, et al. Increase in NF- κ B Binding Affinity of the Variant C Allele of the Toll-Like Receptor 9 -1237T/C Polymorphism Is Associated with Helicobacter pylori-Induced Gastric Disease. *Infect Immun* 2010;78(3):1345-52.
11. Macintyre G, Bailey J, Haviv I, Kowalczyk A. is-rSNP: a novel technique for in silico regulatory SNP detection. *Bioinformatics* 2010;26(18):i524-30.
12. Buckner MM, Finlay BB. Host-microbe interaction: Innate immunity cues virulence. *Nature* 2011;472(7342):179-80.
13. Xavier SG, Gadelha T, Rezende SM, Zalberg IR, Spector N. JAK2V617F mutation in patients with thrombosis: to screen or not to screen? *Int J Lab Hematol* 2011;33(2):117-24.
14. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 2011;43(3):246-52.

15. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42(12): 1118-25.
16. Yamamoto-Furusho JK, Penaloza-Coronel A, Sanchez-Munoz F, Barreto-Zuniga R, Dominguez-Lopez A. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) expression is downregulated in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17(2):680-1.
17. Zhernakova A, Festen EM, Franke L, et al. Genetic analysis of innate immunity in Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP. *Am J Hum Genet* 2008;82(5):1202-10.
18. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2007;7(10):767-77.
19. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet* 2008 Sep;40(9):1107-12.
20. Brest P, Lapaquette P, Mograbi B, Darfeuille-Michaud A, Hofman P. Risk predisposition for Crohn disease: A "menage a trois" combining IRGM allele, miRNA and xenophagy. *Autophagy* 2011;7(7):786-7.
21. Al-Younes HM, Brinkmann V, Meyer TF. Interaction of Chlamydia trachomatis serovar L2 with the host autophagic pathway. *Infect Immun* 2004;72(8):4751-62.
22. Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312(5778):1355-9.
23. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009;457(7228):480-4.
24. Hill DA, Artis D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2010;28:623-67.
25. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9(5):313-23.
26. Pedron T, Sansonetti P. Commensals, bacterial pathogens and intestinal inflammation: an intriguing menage a trois. *Cell Host Microbe* 2008;3(6):344-7.
27. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140(6):1720-28.
28. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(34):13780-5.

R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
R9
R10
R11
R12
R13
R14
R15
R16
R17
R18
R19
R20
R21
R22
R23
R24
R25
R26
R27
R28
R29
R30
R31
R32
R33
R34
R35
R36
R37
R38
R39

29. Rehman A, Sina C, Gavrilova O, et al. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 2011; 60(10):1354-62.
30. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 2007; 117(6):1566-74.
31. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene *Atg16L1* phenotypes in intestine. *Cell* 2010; 141(7): 1135-45.
32. Karimi O, Pena AS. Probiotics: Isolated bacteria strain or mixtures of different strains? Two different approaches in the use of probiotics as therapeutics. *Drugs Today (Barc)* 2003;39(8):565-97.
33. Benjamin JL, Hedin CR, Koutsoumpas A, et al. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease. *Gut* 2011;60(7):923-9.
34. Marteau P. Prebiotic carbohydrates: not sweet yet for Crohn's disease? *Gut* 2011; 60(7):882-3.
35. Shanahan F, Collins SM. Pharmabiotic manipulation of the microbiota in gastrointestinal disorders, from rationale to reality. *Gastroenterol Clin North Am* 2010;39(3):721-6.