مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۰، شماره ۴، زمستان ۸۹، صفحات ۲۳۵ تا ۲۴۰

Original Article

جهش‌های جدید ژن NOD2 در بیماران ایرانی مبتلا به کرون

آلما فرنود[۱]، نصرت‌اله نادری[۲]، منیژه حبیبی[۳]، هدیه بالایی[۴]، همایون زجاجی[۲]، فرزاد فیروزی[۵]، محسن چیانی[۶]، فرامرز درخشان[۲]، رحیم آقازاده[۷]، ناصر ابراهیمی دریانی[۸]، محمد رضا زالی[۷]

[۱] دستیار داخلی، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۲] استادیار، فوق تخصص بیماری‌های گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۳] کارشناس ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۴] کارشناس میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۵] دستیار گوش و حلق و بینی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۶] کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۷] استاد، فوق تخصص بیماری‌های گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۸] استاد، فوق تخصص بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *با وجود اهمیت نقش سه جهش شایع ژن NOD2 شامل G908R, R702W و 1007fs در بیماری کرون فقط در نزدیک به ۳۰ درصد بیماران ایرانی مبتلا به کرون یکی از این سه جهش (R702W) یافت شده است. هدف از این مطالعه، غربالگری نواحی اگزونی پرجهش ژن NOD2 برای یافتن تغییرات جدید توالی‌های این ژن در بیماران ایرانی مبتلا به کرون بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه بنیادی، ۸۰ بیمار مبتلا به کرون تک‌گیر که در طی سه سال (۱۳۸۸- ۱۳۸۵) به بیمارستان طالقانی تهران مراجعه نمودند، بررسی شدند. نقاط پر از جهش (اگزون‌های ۴ و ۸) ژن NOD2 که بیشتر موتاسیون‌ها در این ناحیه گزارش شده‌اند، از نظر وجود جهش به روش Sequencing پس از تکثیر قطعات به روش PCR (Polymerase Chain Reaction) ارزیابی شدند.*

یافته‌ها: *در اگزون‌های ۴ و ۸ ژن NOD2 ، ۱۷ جهش یافت شد که شامل ۷ موتاسیون جدید بود. از موتاسیون‌های جدید ۳ جهش در بیماران کرون فراوانی‌های بیش از ۵ درصد داشتند. تمام جهش‌های جدید از تغییر در یک نوکلئوتید به وجود آمده بودند که ۴ جهش موجب تغییر اسید آمینه شده بودند، در حالی که یک موتاسیون باعث تشکیل کدون توقف گردیده بود. هیچ موتاسیون حذف یا ورود قطعه‌ای در توالی بررسی شده یافت نگردید.*

نتیجه‌گیری: *یافته‌های این مطالعه بیانگر وجود واریان‌های غیر شایع در ژن NOD2 در بیماران ایرانی مبتلا به کرون است. احتمال دارد که این جهش‌ها در ایجاد حساسیت به بیماری کرون در جمعیت ایرانی نقش داشته باشند.*

واژگان کلیدی: *ژن NOD2، جهش جدید، کرون.*

مقدمه

بیماری کرون، بیماری التهابی دستگاه گوارش است که با درگیری التهابی مزمن قسمت‌های مختلف لوله گوارش مشخص می‌شود. در این بیماری عوامل محیطی و ژنتیکی به عنوان عامل خطر ابتلا به بیماری مطرح شده‌اند (۱). در سال ۱۹۹۶ هوگو و همکاران اولین لوکوس ژنتیکی مرتبط با بیماری کرون (ناحیه IBD1) را بر روی کروموزوم 16q12 گزارش کردند (۲). چند سال بعد، هوگو (۳) و اوگرا (۴) در دو مطالعه جداگانه سه جهش (1007fs, G908R, R702W)، در ژن NOD2/CARD15 موجود در لوکوس IBD1 را شناسایی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دکتر آلما فرنود (**email**: a_farnood@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۷/۲۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱۱/۲۸

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در PCR اگزون های ۴ و ۸ ژن NOD2

اگزون	پرایمرها		اندازه قطعه
	Reverse	Forward	PCR
4a	AGTAGAGTCCGCACAGAGAG	TGCCTCTTCTTCTGCCTTCC	422
4b	CCCTGTTCAGAGAAGCCC	TTTCTCTTTGTCTTCCCATTC	380
4c	AGCCAAGAGAAATGTCATCAG	GAAGTACATCCGCACCGAG	446
4d	CAGACACCAGCGGGCACAG	ATGTGCTGCTACGTGTTCTC	456
4e	GCTCCCCCATACCTGAAC	ACCTTCAGATCACAGCAGCC	494
8	CCCAGCTCCTCCCTCTTC	AAGTCTGTAATGTAAAGCCAC	380

نمودند. در آن مطالعات این سه جهش برای نزدیک به ۸۰ درصد حساسیت به بیماری ایجاد شده توسط ژن NOD2 مسؤول شناخته شدند. از آن زمان تا کنون، تنوعات ژنتیکی دیگری در ژن NOD2 یافت گردیده است ولی به علت فراوانی اندک آنها، هم‌چنان سه جهش فوق به عنوان موتاسیون‌های موثر در ایجاد حساسیت برای ابتلا به بیماری کرون باقی مانده‌اند (۷-۵).

NOD2 پروتئینی داخل سلولی است که در سلول‌های مونوسیت/ ماکروفاژ، سلول‌های دندریتیک، گرانولوسیت‌ها، سلول‌های پانت و سلول‌های اپی‌تلیال روده یافت می‌شود (۸). پروتئین NOD2 دارای دو انتهای N-Terminal به نام CARD (Caspase Recruitment Domain)، یک قسمت متصل شونده مرکزی به نام NBD (Nuclear binding domain) و یک انتهای C سرشار از لوسین به نام LRR (Leucine Rich Repeat) می‌باشد (۱). قسمت‌های CARD این پروتئین، ترجمه فاکتور NFk-B (Nuclear factor kappa-B) را فعال می‌کند. قسمت NBD باعث اتصال پروتئینهای NOD2 به یکدیگر می‌شود، که این اتصال موجب فعال شدن پروتئین NOD2 می‌گردد و بخش LRR مسؤول تشخیص آنتی‌ژن‌های باکتری‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۹).

پروتئین NOD2 به عنوان گیرنده‌ای درون سیتوپلاسمی برای مورامیل دی پپتید (MDP) عمل می‌کند. MDP از پپتیدوگلیکان‌های دیوارهٔ سلول باکتریها ناشی می‌شود. شناسایی محصولات باکتریایی، پروتئین NOD2 را به عنوان سرآغاز پاسخ دفاعی ایجاد شده توسط مسیر NFk-B مطرح می‌نماید (۱۰).

با اینکه ۳ جهش شایع ژن NOD2 (1007fs, G908R, R702W) در بسیاری از جوامع اروپایی و امریکایی با بیماری کرون همراهی نشان داده‌اند (۵-۳، ۱۱، ۱۲)، ولی میزان این همراهی در جمعیت‌های مختلف این مناطق با هم متفاوت بوده است. برخلاف این مطالعات، در بعضی جمعیت‌ها مانند چین و ژاپن هیچ یک از سه جهش شایع ژن NOD2 یافت نشده‌اند (۱۶-۱۳). در ایران، مطالعات انجام شده نشانگر همراهی یکی از سه موتاسیون شایع ژن NOD2 یعنی جهش R702W با بیماری کرون است، ولی دو جهش دیگر (G908R و 1007fs) با فراوانی بسیار کمی گزارش شده‌اند (۱۷). با توجه به فراوانی‌های متفاوتی که این سه جهش در جمعیت‌های مختلف نشان داده‌اند، محققان برای یافتن سایر جهش‌های ژن NOD2 مطالعات جداگانه‌ای را انجام داده‌اند (۵، ۱۸، ۱۹). در میان ۱۲ اگزون بررسی شده این ژن، دو اگزون ۴ و ۸ بیشترین تغییر نوکلئوتیدی را نشان داده‌اند (Hotpoints) و اکثر جهش‌های جدید در این مناطق یافت شده‌اند (۵).

با توجه به اینکه تاکنون مطالعات محدودی بر روی زمینه ژنتیک بیماری کرون در ایران انجام گرفته است و با در نظر گرفتن این موضوع که ژن NOD2 در پاتوژنز بیماری کرون موثر است و جهش R702W آن در جمعیت ایرانی با بیماری کرون همراهی دارد (۱۷)، هدف از مطالعه حاضر بررسی مناطق پر جهش ژن NOD2 برای یافتن هر تغییری در توالی نوکلئوتیدهای آن می‌باشد.

مواد و روشها

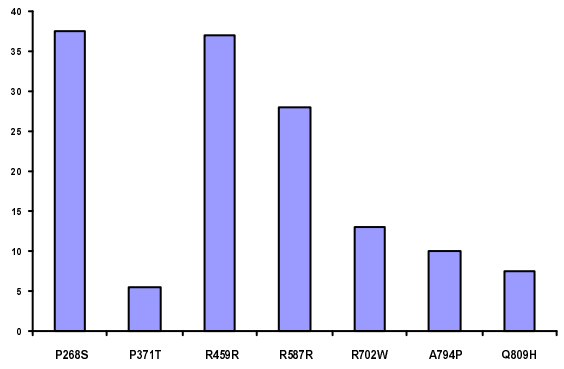
در این مطالعه بنیادی، ۸۰ بیمار کرون تک‌گیر که در مدت سه سال (۱۳۸۸-۱۳۸۵) به بیمارستان طالقانی وابسته دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران مراجعه نموده بودند، وارد مطالعه گردیدند. بیماری کرون براساس یافته‌های بالینی، آندوسکوپی، رادیولوژیک و هیستوپاتولوژیک (۲۵، ۲۴، ۱) توسط متخصص گوارش تشخیص داده شد و پرسش نامه کاملی برای هر بیمار تکمیل گردید. فنوتیپ کرون براساس طبقه‌بندی وین (Vienna Classification) (۲۳) شامل منطقه بیماری، رفتار بیماری و سن در زمان تشخیص، گروه‌بندی شد. از هر بیمار فرم رضایت نامه کتبی اخذ گردید.

DNA ژنومی از لکوسیت‌های خون محیطی به روش استاندارد " فنل کلروفورم" (۲۴) استخراج شد. اگزون‌های ۴ و ۸ ژن NOD2 براساس بانک اطلاعاتی Genbank و با پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) تکثیر شدند. برای اگزون ۴، به دلیل بزرگی قطعه از ۵ جفت پرایمر و برای اگزون ۸ از یک جفت پرایمر استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ میلی‌مول Tris-HCL با PH برابر ۸/۸، ۱/۵ میلی‌مول از محلول $MgCl_2$، ۵۰ میلی‌مول از محلول KCL، ۲۵۰ میلی‌مول از dNTPs، ۰/۵ میلی‌مول از هر یک از پرایمرها، ۲ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز (فرمنتاز، آلمان) و ۲۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی انجام گرفت. شرایط PCR برای تمام قطعات عبارت بود از: دناتوراسیون ابتدایی در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه. سنتز مناسب محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز (۱/۵ درصد) بررسی گردید و سپس قطعات تکثیر شده، سکانس گردیدند (با دستگاه ABI 3130XL Genetic Analyzer ، شرکت Applied Biosystems، امریکا). نتایج حاصله با استفاده از نرم‌افزار Lasergene (Version 6، شرکت DNASTAR، امریکا) با سکانس ثبت شده ژن NOD2 در Genbank مقایسه گردید.

یافته‌ها

۸۰ بیمار مبتلا به کرون با میانگین سنی (± انحراف معیار) ۱۱/۵±۳۴ سال (محدوده ۶۵-۱۶ سال) مورد بررسی قرار گرفتند. نسبت مرد به زن در این مطالعه با ۱/۶ به ۱ بود. خصوصیات بالینی بیماران براساس طبقه‌بندی وین (۲۳) در جدول ۲ خلاصه شده است.

در اگزون های بررسی شده، در کل ۱۷ موتاسیون یافت شد که از این تعداد، ۷ جهش جدید بودند. ۴ موتاسیون شناخته شده SNP5، SNP6، SNP7 و SNP8 در بیماران مورد مطالعه مشاهده شدند و همگی فراوانی بیش از ۱۰ درصد داشتند (جدول ۳ و شکل ۱). از ۷ جهش جدید، ۳ جهش در ناحیه NBD، ۳ جهش در ناحیه LRR و یک جهش در بین این دو ناحیه بود.



شکل ۱- فراوانی آللهای ۸ جهش فراوانترموجود در اگزونهای ۴ و ۸ ژن NOD2 در بیماران ایرانی مبتلا به کرون

جدول ۲- خصوصیات بالینی بیماران ایرانی مبتلا به کرون

طبقه بندی بیماران کرون (n=۸۰)*	
محل بیماری	
درگیری ایلئوم (L1)	۲۳ (۲۸/۷۵)†
درگیری کولون (L2)	۲۴ (۳۰)
درگیری ایلئوکولیک (L3)	۳۰ (۳۷/۵)
درگیری دستگاه گوارش فوقانی (L4)	۳ (۳/۷۵)
رفتار بیماری	
بیماری التهابی	۴۵ (۵۶/۲۵)
بیماری Stricturing	۱۶ (۲۰)
بیماری Penetrating	۱۹ (۲۳/۷۵)
سن در زمان تشخیص (زیر ۴۰ سال)	۳۴ (۴۲/۵)

* بر اساس تقسیم بندی وین (۲۳)؛ † اعداد داخل پرانتز معرف درصد هستند.

از ۷ جهش جدید، ۳ موتاسیون شامل P371T ، A794P و G809H فراوانی بیش از ۵ درصد داشتند که A794P از دو جهش دیگر فراوانتر بود (شکل ۱). تمام جهش‌های جدید ناشی از جابجایی یک نوکلئوتید (Single nucleotide polymorphism) بودند که در ۴ مورد P371T، E462K، A794P و G908H جهش باعث تغییر کد ژنتیکی و در نتیجه تغییر در اسیدآمینه شده بود (Non-Synonymous Mutation). در دو مورد T389T و A611A جهش‌ها به شکل خاموش (Silent or Synonymous Mutation) و بدون تغییر کد ژنتیکی و اسیدآمینه بودند. در یک مورد نیز در نوکلئوتید موقعیت ۲۴۳۹ تغییر نوکلئوتید موجب تشکیل کد پایان شده بود. در مناطق بررسی شده تغییری در توالی ژنتیکی ناشی از موتاسیون‌های حذف (Deletion) یا وارد شدن قطعه‌ای از نوکلئوتیدها (Insertion) مشاهده نشد.

جدول ۳- جهش‌های یافت شده در اگزونهای ۴ و ۸ ژن NOD2 در بیماران ایرانی مبتلا به کرون

محل و تغییر در نوکلئوتید	GenBank شماره	تغییر پپتید	مارکر پلی مورفیک	محل تغییر در پروتئین	تعداد (٪) آللهای جهش یافته
اگزون ۴:					
802 C → T	rs2066842	P268S	SNP5		۶۰(۳۷/۵)
866 A → G	rs5743271	N289S		NBD	۲(۱/۳)
1111 C → A	EF624393	P371T		NBD	۹(۵/۶)
1167 G → A	EU817180	T389T		NBD	۱(۰/۶)
1377 T → C	rs2066843	R459R	SNP6	NBD	۵۹(۳۶/۹)
1384 G → A	EF624392	E462K		NBD	۲(۱/۳)
1761 T → G	rs1861759	R587R	SNP7		۴۵(۲۸/۱)
1833 C → T	EF624394	A611A			۲(۱/۳)
2104 C → T	rs2066844	R702W	SNP8		۲۱(۱۳/۱)
2196 C → T	rs6413461	S732S			۲(۱/۳)
2278 C → T	rs3813758	R760C		LRR	۱(۰/۶)
2376 C → T	rs5743280	P792P		LRR	۸(۵)
2380 G → C	EU888273	A794P		LRR	۱۶(۱۰)
2427 G → C	EU888274	Q809H		LRR	۱۲(۷/۵)
2439 C → A	EU888275			LRR	۳(۱/۹)
اگزون ۸:					
2718 C → T	rs58586167	F906F		LRR	۱(۰/۶)
2722 G → C	rs2066845	G908R	SNP12	LRR	۴(۲/۵)

بحث

در مطالعه حاضر با هدف یافتن تغییرات احتمالی در نقاط پرجهش ژن NOD2 از جمله اگزون‌های ۴ و ۸، این نواحی به روش تعیین توالی (Sequencing) مورد بررسی قرار گرفتند و ۷ جهش جدید یافت شد که تاکنون در هیچ یک از بانک‌های اطلاعاتی گزارش نشده‌اند.

پس از شناسایی ژن NOD2 در منطقه IBD1 و آشکار شدن نقش آن در بیماری کرون (۲)، در ابتدا سه پلی‌مورفیسم R702W، G908R و 1007fs در این ژن گزارش شدند که با بیماری کرون مرتبط بودند (۴،۳). این جهش‌ها در بیماران اروپایی و سفیدپوستان امریکایی مبتلا به کرون نسبت به افراد شاهد فراوانی بیشتری نشان دادند و به عنوان عامل خطری برای افزایش حساسیت ابتلا به بیماری کرون معرفی گردیدند (۷-۵). در مطالعات بعدی در سایر کشورها از جمله کره، چین و ژاپن هیچ یک از این پلی‌مورفیسم‌ها مشاهده نشدند (۱۶-۱۳) و از آن پس بررسی سایر نواحی ژن NOD2 برای یافتن جهش‌های جدید و احتمالاً موثر در پاتوژنز بیماری کرون در جمعیت‌های مختلف آغاز گردید. از طرفی تعیین نقشه کامل ژنوم انسان و نیز دسترسی به فن آوری تعیین توالی ژنتیکی یا Sequencing، امکان بررسی گسترده ژنوم را فراهم ساخت. تاکنون تحقیقات متعددی برای آشکار ساختن سایر جهش‌های ژن NOD2، ارتباط این جهش‌ها با بیماری التهابی روده و تا حدی تعیین نقش آنها در تغییر ساختمان و عملکرد پروتئین NOD2 صورت گرفته است (۵، ۱۸، ۱۹، ۲۳). در مطالعه‌ای در جمعیت اروپایی در سال ۲۰۰۲ بر روی ۶۰۲ بیمار مبتلا به بیماری‌های التهابی روده، شامل ۴۵۳ بیمار کرون و ۱۵۹ بیمار مبتلا به کولیت اولسروز، در کل ۶۷ جهش در ژن NOD2 گزارش شد (۵). از آن پس در مطالعاتی جداگانه در آلمان در سال ۲۰۰۶ در ۱۸۰ بیمار مبتلا به بیماریهای التهابی روده، ۸ جهش جدید (۱۹) و در فنلاند در سال ۲۰۰۷، در ۲۴۰ بیمار کرون، ۱۲ جهش جدید در ژن NOD2 یافت شد (۱۸). فراوانی جهش‌های گزارش شده در این ژن و وجود جهش‌های جدید نشانگر تنوع زیاد توالی ها در این ناحیه ژنتیکی است (۵).

اگزون ۴ و ۸ ژن NOD2 از مناطقی هستند که در مطالعات مختلف، تغییرات زیادی را در توالی ژنوم نشان داده‌اند و از Hot point های این ژن می‌باشند. این بخش‌های ژن محل ۴ جهش SNP5، SNP6، SNP7 و SNP8 و بسیاری از پلی‌مورفیسم‌های دیگرند. اگزون ۴ ژن NOD2 بخش‌های (Nuclear Binding Domain) NBD و LRR (Leucin Rich Region) پروتئین

NOD2 را کد می‌کند که بخش LRR آن نقش مهمی در تشخیص آنتی‌ژن‌های باکتریایی و عملکرد این پروتئین دارد. کوتاه شدن ناحیه C-terminal بخش LRR (اسید آمینه های ۸۵۵-۱۰۴۰) منجر به عدم پاسخدهی به اجزای باکتریها می‌شود (۵).

در مطالعه حاضر به طور کلی ۱۷ موتاسیون یافت شد که عملکرد تعدادی از آنها شناخته شده است. جهش‌های شناخته شده N289S، R702W (SNP8) و G908R (SNP12) که در مطالعه حاضر نیز یافت شده‌اند، تا حدی در مطالعات قبلی از نظر عملکرد مورد بررسی قرار گرفته‌اند که این تحقیقات نشانگر اختلال عملکرد پروتئین CARD15 در افرادی است که جهش‌های R702W و G908R را داشته‌اند (۱۸). جهش N289S که در مطالعهٔ حاضر فراوانی ۱/۱ درصد را نشان داده است، در مطالعه‌ای در اروپا نیز بصورت نادر مشاهده شده است (۲۵) و به نظر می‌رسد که این واریانت خصوصیات عملکردی مشابهی با SNP8 و SNP12 داشته باشد.

از نظر فراوانی، سه جهش جدید شامل P371T در ناحیه NBD و موتاسیون‌های A794P و Q809H در ناحیه LRR، فراوانی بیش از ۵ درصد داشتند (به ترتیب فراوانی‌هایی برابر ۵/۶ درصد، ۱۰درصد و ۷/۵ درصد). با توجه به اینکه جابجایی نوکلئوتید در هر سه این جهش‌ها موجب تغییر اسیدآمینه شده است، احتمال دارد تغییر در اسید آمینه ساختمان و یا عملکرد پروتئین NOD2 را در این بیماران تغییر دهد. از میان ۷ جهش جدید ژن NOD2، ۴ موتاسیون موجب تغییر کد ژنتیکی وتغییر اسید آمینه شده‌اند که بررسی بیشتر جهش‌های مذکور، به خصوص واریانت‌هایی که فراوانی بیشتری دارند، و تعیین نقش آنها در تغییر شکل یا عملکرد پروتئین NOD2 می‌تواند به روشن‌تر شدن پاتوژنز بیماری کرون کمک نماید.

هم‌چنین مطالعه ژن NOD2 در بیماران ایرانی مبتلا به کرون در تعداد بیشتر بیماران و نیز بررسی دقیق‌تر این ژن ازجمله مطالعه سایر اگزون‌ها، اینترون‌ها و مناطق برش mRNA (Splicing Site) و نیز تعیین نقش ساختمانی و عملکردی جهش‌ها در این ژن می‌تواند از گامهای بعدی برای روشن‌تر ساختن هرچه بیشتر پایه ژنتیکی بیماری‌های التهابی روده در ایران باشد.

REFERENCES

1. Naderi N, Farnood A, Minakari M, Firouzi F, Zali MR. Role of genetic factors in inflammatory bowel disease. Medical Sciences Journal of Islamic Azad University 2007; 17: 51-63. [in Persian]
2. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 2002; 347: 417-29.
3. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucinerich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001; 411: 599–603.
4. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001; 411: 603–606.
5. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet 2002; 70: 845–57.
6. King K, Sheikh MF, Cuthbert AP, Fisher SA, Onnie CM, Mirza MM, *et al.* Mutation, selection, and evolution of the Crohn disease susceptibility gene CARD15. Hum Mutat 2006; 27: 44 –54.
7. Tukel T, Shalata A, Present D, Rachmilewitz D, Mayer L, Grant D, et al. Crohn disease: frequency and nature of CARD15 mutations in Ashkenazi and Sephardi/Oriental Jewish families. Am J Hum Genet 2004; 74: 623–36.
8. Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. Gut 2003; 52: 1591–97.
9. Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, et al. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. EMBO J 2004; 23: 1587–97.
10. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. J Biol Chem 2003; 278: 5509 –12.
11. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2002; 122: 867–74.
12. Vermeire S, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, et al. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. Am J Hum Genet 2002; 71: 74–83.
13. Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. J Hum Genet 2002; 47: 469–72.

14. Sugimura M, Kinouchi Y, Takahashi S, Aihara H, Takagi S, Negoro K, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis in Japanese patients with Crohn's disease. Clin Genet 2003; 63: 160–62.

15. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. Aliment Pharmacol Ther 2003; 17: 1465–70.

16. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. Gastroenterology 2002; 123: 86–91.

17. Derakhshan F, Naderi N, Farnood A, Firouzi F, Habibi M, Rezvany MR, et al. Frequency of three common mutations of CARD15/NOD2 gene in Iranian IBD patients. Indian J Gastroenterol 2008; 27: 8-11.

18. Lappalainen M, Paavola-Sakki P, Halme L, Turunen U, Färkkilä M, Repo H, et al. Novel CARD15/NOD2 mutations in Finnish patients with Crohn's disease and their relation to phenotypic variation in vitro and in vivo. Inflamm Bowel Dis 2008; 14: 176-85.

19. Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Hofbauer K, Seiderer J, et al. Eight novel CARD15 variants detected by DNA sequence analysis of the CARD15 gene in 111 patients with inflammatory bowel disease. Immunogenetics 2006; 58: 99-106.

20. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1989; 170: 2-6.

21. Malchow H, Ewe K, Brandes JW, Goebell H, Ehms H, Sommer H, et al. European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment. Gastroenterology 1984; 86: 249–66.

22. Sambrooks J, Fritsch EF, Manitis T. Molecular cloning, laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1992.

23. Monkholm P, Binder V. Clinical features and national history of Crohn's disease. In: Sartor RB, Sandborn WJ, Editors. Kirsner's Inflammatory Bowel Disease. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2004. p.289-300.

24. Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, Bryce ME, O'Callaghan NJ, Rodgers HJ, et al. CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. Ann Hum Genet 2003; 67: 35-41.

25. Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE, Zouali H, Lesage S, Chareyre F, et al. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 3455–60.