

## فراوانی سه جهش شایع ژن CARD15/NOD2

### در بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده

دکتر آما فرنود<sup>۱</sup>، دکتر نصرت اله نادری<sup>۲</sup>، دکتر فرزاد فیروزی<sup>۱</sup>، دکتر محمدرضا رضوانی<sup>۳</sup>، دکتر آرش جاوری<sup>۱</sup>،  
دکتر علی بهاری<sup>۴</sup>، دکتر رحیم آقازاده<sup>۵</sup>، منیژه حبیبی<sup>۱</sup>، دکتر محمد رضا زالی<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۲</sup> فلوشیپ گوارش، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۳</sup> هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان

<sup>۴</sup> استادیار، گروه گوارش، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

<sup>۵</sup> استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

#### چکیده

سابقه و هدف: ژن *NOD2/CARD15* واقع در ناحیه کروموزومی *16q12* (*IBD1*) به عنوان اولین ژن همراه با بیماریهای التهابی روده، به خصوص بیماری کرون مطرح شده است. بسیاری مطالعات همراهی متفاوتی از جهشهای این ژن با بیماریهای التهابی روده را در جمعیت‌های مختلف گزارش کرده‌اند. در این مطالعه، فراوانی سه جهش شایع ژن *CARD15* را در بیماران ایرانی مبتلا به بیماریهای التهابی روده، در مقایسه با افراد شاهد بررسی نموده‌ایم.

روش بررسی: در مطالعه‌ای مورد-شاهدی، ۴۰ بیمار کرون، ۱۰۰ بیمار کولیت اولسرو و ۱۰۰ فرد سالم که از نظر سن و جنس با بیماران همسان بودند، طی یک سال (۸۳-۱۳۸۲) در بیمارستان طالقانی مورد معاینه و نمونه‌گیری قرار گرفتند. بررسی سه جهش شایع ژن *CARD15* (*R702W*، *G908R* و *1007fsinsC*) بر روی نمونه‌های DNA به روش *PCR* (polymerase chain reaction) و *RFLP* (Restriction fragment length polymorphism) انجام گرفت.

یافته‌ها: میانگین سنی در بیماران کولیت اولسرو  $38/6 \pm 14/3$ ، در بیماران مبتلا به کرون  $36/6 \pm 14/1$  و در گروه شاهد  $38/6 \pm 14/2$  سال بود. در بین سه جهش بررسی شده فقط فراوانی جهش *R702W* در بیماران ایرانی مبتلا به کرون در مقایسه با گروه شاهد، بیشتر بود (۱۶/۳٪ در برابر ۱/۰٪؛  $p < 0/001$ ،  $OR = 19/2$ ،  $95\%CI = 4/2-87/3$ ). تفاوت فراوانی دو جهش دیگر در بیماران کرون نسبت به گروه شاهد از نظر آماری معنی‌دار نبود. هیچیک از این سه جهش در بیماران مبتلا به کولیت اولسرو بیش از افراد سالم نبود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد در بین سه جهش بررسی شده ژن *CARD15* فقط فراوانی جهش *R702W* در بیماران ایرانی مبتلا به کرون در مقایسه با گروه شاهد، بیشتر بود.

واژگان کلیدی: بیماری التهابی روده، بیماری کولیت اولسرو، بیماری کرون، ژن *NOD2/CARD15*، جهش *R702W*

#### مقدمه

بیماری کولیت اولسرو و کرون می‌باشند. کولیت اولسرو با التهاب داخلی‌ترین لایه مخاطی روده مشخص می‌شود. در حالی که بیماری کرون با التهاب تمام لایه‌های روده بروز می‌نماید. کرون و کولیت اولسرو هر دو بیماریهای مزمن و ناتوان‌کننده‌ای هستند که شیوعی در حدود ۰/۲٪ در سفیدپوستان دارند (۴-۱). تاکنون بیش از ۹ منطقه کروموزومی مرتبط با بیماری التهابی روده با استفاده از مطالعات گسترده ژنومی، شناخته شده است. این مناطق بر

بیماریهای التهابی روده (Inflammatory bowel disease=IBD)

از عملکرد نامناسب سیستم ایمنی مخاطی در اثر وجود باکتری‌های طبیعی روده ناشی می‌شوند. این بیماریها شامل دو

آدرس نویسنده مسئول: تهران، بیمارستان طالقانی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد،

دکتر آما فرنود (email: farnood@medinews.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۶/۱۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۸/۲۰

بیماران همسان بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. این افراد در طی یک سال (۸۳-۱۳۸۲) به بیمارستان طالقانی (وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران) مراجعه نموده بودند. بیماری کولیت اولسرو و کرون بر اساس شرح حال، علائم بالینی (وجود اسهال مزمن، دفع خون در مدفوع، دل درد و...)، آندوسکوپی (مشاهده کاهش واسکولاریتی مخاطی، التهاب، اولسراسیون و...)، علائم رادیولوژیک (گرانولاریتی، اولسر، تنگی، فیستول، ...) و پاتولوژیک، توسط فوق تخصص گوارش تشخیص داده شدند و بیماران با تشخیص کولیت نامشخص از مطالعه خارج گردیدند. نمونه خون، اطلاعات دموگرافیک و نیز شرح حال بالینی بر اساس فرم و توسط پزشک عمومی آموزش دیده، هنگام مراجعه بیماران اخذ گردید. افراد شاهد از بین مراجعه کنندگان به سایر بخشهای بیمارستان طالقانی که سابقه و علائمی از بیماریهای گوارشی نداشتند، انتخاب شدند. به ازای هر بیمار یک فرد شاهد با جنس و گروه سنی یکسان وارد مطالعه گردید. ملاحظات اخلاقی در این مطالعه، توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد تأیید شد. از تمام بیماران رضایت نامه کتبی گرفته شد.

DNA نمونه‌ها، به روش استاندارد "استخراج با نمک هیپراسمولار" از گلبول‌های سفید خون محیطی استخراج گردید. هر موتاسیون ژن CARD15 با پرایمرهای اختصاصی (۲۸) و به روش PCR (Polymerase chain reaction) با دستگاه ترمال سایکلر شخصی (اپندورف، آلمان) تکثیر شد و سپس با روش RFLP (Restriction fragment length polymorphism) و آنزیم‌های اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. قطعات هضم شده DNA بر روی ژن پلی‌اکریلامید ۱۲٪ الکتروفورز شدند. برای هضم قطعات DNA مربوط به موتاسیون G908R از آنزیم Hha I (فرمنتاز، آلمان)، برای جهش R702W از آنزیم MSP I (فرمنتاز، آلمان) و برای جهش 1007fsinsc از آنزیم Apa I (فرمنتاز، آلمان) طبق روش پیشنهادی کارخانه سازنده آنزیم، استفاده شد. اطلاعات به دست آمده با نرم‌افزار SPSS (Version 11.0) و با تست‌های آماری کای دو و آزمون دقیق فیشر آنالیز گردیدند.

### یافته‌ها

میانگین سنی در بیماران کولیت اولسرو  $38/6 \pm 14/3$  سال (طیف سنی ۱۴ تا ۷۵ سال)، در بیماران مبتلا به کرون  $36/6 \pm 14/1$  سال (طیف سنی ۱۵ تا ۶۵ سال) و در گروه

روی کروموزوم‌های ۱۶q۱۲ (IBD-1)، ۱۳q۱۲ (IBD-2)، ۶p۱۳ (IBD-3)، ۱۴q۱۱ (IBD-4)، ۳۱-۳۳ (IBD-5)q، ۱۹p۱۳ (IBD-6)، ۱۳p۳۶ (IBD-7)، ۱۶p (IBD-8)، ۳p (IBD-9) و ۷q قرار دارند (۹-۴).

NOD2 (Neucleotide Oligomerisation Domain 2) یا CARD15 اولین ژن شناخته شده مرتبط با بیماری کرون است که بر روی کروموزوم ۱۶q۱۲ قرار دارد (۱۳-۱۰). محصول این ژن، پروتئین CARD15، در سیتوپلاسم لکوسیت‌های خون محیطی، سلول‌های پانت و اپی‌تلیال روده بیان می‌شود (۱۴). عملکرد دقیق پروتئین CARD15 ناشناخته مانده است، گرچه به نظر می‌رسد که این پروتئین در تشخیص داخل سلولی اجزای باکتری‌ها مانند لیپوپلی‌ساکاریدها (LPS) و پپتیدوگلیکان‌ها (PGN) نقش داشته باشد (۱۵). همچنین CARD15 در فعال‌سازی مسیر NF-KB مؤثر است که خودکشی سلولی و فرایندهای التهابی را تنظیم می‌نماید (۱۳، ۱۸-۱۶).

سه جهش تک نوکلوتیدی R702W (SNP8)، G908R (SNP12) و 1007fsinsC (SNP13) ژن CARD15 در بسیاری جوامع با بیماری کرون مرتبط شناخته شده‌اند (۲۲-۱۹). این موتاسیون‌ها با کاهش فعالیت NF-KB در پاسخ به اجزای باکتریها همراهند (۱۷).

در بسیاری از مطالعات ۱۰ تا ۳۰٪ بیماران کرون برای یکی از ۳ موتاسیون شایع ژن CARD15 هتروزیگوت گزارش شده‌اند. در حالی که ۳ تا ۱۵٪ بیماران ژنوتیپ هموزیگوت یا هتروزیگوت مرکب را نشان می‌دهند (۲۳-۲۰). با این حال، مطالعات اخیر همراهی متفاوتی بین جهش‌های ژن CARD15 و بیماری کرون گزارش نموده‌اند (۲۷-۲۴). چنین به نظر می‌رسد که موتاسیون‌های ژن CARD15 در جمعیت‌ها و قومیت‌های مختلف، فراوانی و ارتباط متفاوتی با بیماری کرون داشته باشند.

با توجه به بررسی‌های محدود بر روی فراوانی جهش‌های ژن CARD15 در جمعیت ایرانی، هدف ما در این مطالعه مشخص نمودن فراوانی سه جهش شایع ژن NOD2/CARD15 (G908R، R702W و 1007fsinsC) در بیماران ایرانی مبتلا به بیماریهای التهابی روده و مقایسه آنها با گروه شاهد سالم می‌باشد.

### مواد و روشها

در مطالعه‌ای مورد-شاهدی ۴۰ بیمار کرون، ۱۰۰ بیمار کولیت اولسرو و ۱۰۰ فرد سالم که از نظر سن و جنس با

اختلاف فراوانی هیچ‌یک از دو جهش باقیمانده (G908R و 1007fsinsC) در بیماران کرون یا کولیت اولسرو نسبت به جمعیت شاهد از نظر آماری معنی‌دار نشد. گرچه فراوانی جهش G908R در بیماران کرون بیش از افراد سالم به دست آمد (۱۰٪ در برابر ۲٪)، این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نگردید (NS). ۱۵ نفر از ۴۰ بیمار کرون (۳۷٪) حامل یکی از سه جهش شایع CARD15 بودند (جدول ۲). یک نفر برای دو موتاسیون R702W و G908R (۲٪)، یک نفر برای دو موتاسیون R702W و 1007fsinsC (۲٪) و یک نفر برای هر سه جهش هتروزیگوت بودند (۲٪). اما هیچ‌یک از افراد مبتلا به کولیت اولسرو و یا افراد سالم شاهد به طور همزمان دو جهش CARD15 را نداشتند.

به طور کلی تعداد بیماران مبتلا به کرون که حامل یکی از اشکال جهش یافته CARD15 بودند، نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود (۴۰٪ در برابر ۶٪،  $p < 0.001$ ;  $OR = 10.4$ ;  $95\% CI = 3.7 - 29.5$ ).

جدول ۲- ژنوتیپ‌های سه موتاسیون شایع ژن CARD15 در

بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده		
کولیت اولسرو	کرون	شاهد
۴ (۴)	۱۳ (۳۲٪)	۶ (۶)
۰	۳ (۳۷٪)	۰
۰	۰	۰
۴ (۴)	۱۶ (۴۰٪)	۶ (۶)
۹۶ (۹۶)	۲۴ (۶۰٪)	۹۴ (۹۴)
#NS	*.۰۰۱	
<b>P value</b>		

\* بین گروه بیماران کرون و گروه کنترل

# بین گروه بیماران کولیت اولسرو و گروه کنترل

## بحث

در این مطالعه فراوانی سه جهش شایع ژن CARD15 در بیماران IBD بررسی شد. ۳۲٪ از بیماران کرون برای یکی از این سه جهش هتروزیگوت بودند که این نتیجه تا حدی از گزارشات قبلی در سفیدپوستان (۳۰-۱۰٪) بیشتر بود. در حالی که فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت مرکب (ژنوتیپ هتروزیگوت برای دو یا چند موتاسیون به طور همزمان) در بیماران کرون ۷٪ به دست آمد که با مطالعات قبلی مشابه بود (۱۵-۳٪) (۴). ۴۰٪ بیماران کرون در مطالعه حاضر حامل حداقل یک آلل جهش یافته بودند، در حالی که ۴٪ بیماران کولیت اولسرو و ۶٪ افراد سالم این آلل‌ها را داشتند. (۴۰٪ در

کنترل  $38/6 \pm 14/2$  سال (طیف سنی ۱۶ تا ۷۷ سال) می‌باشد.

اکثر بیماران مورد مطالعه مونث بودند (۵۷٪). کل جمعیت مورد مطالعه، ۵۶٪ بیماران مبتلا به کولیت اولسرو و همچنین کنترل‌های همسان شده با آنها و ۶۰٪ بیماران مبتلا به کرون مونث بودند.

فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های ۳ جهش شایع ژن CARD15 در ۱۰۰ بیمار مبتلا به کولیت اولسرو، ۴۰ بیمار مبتلا به کرون و ۱۰۰ فرد سالم همسان شده با بیماران کولیت اولسرو بررسی شد (جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های سه موتاسیون شایع ژن CARD15 در بیماران مبتلا به بیماری التهابی روده

	ژنوتیپ‌ها (%)			آلل‌ها (%)	
	C/C	C/T	T/T	C	T
<b>R702W</b>					
کرون	۲۷ (۶۷٪)	۱۳ (۳۲٪)	۰	۶۷ (۸۳٪)	۱۳ (۱۶٪)
کولیت اولسرو	۹۹ (۹۹٪)	۱ (۱٪)	۰	۹۹ (۹۹٪)	۱ (۰٪)
شاهد	۹۸ (۹۸٪)	۲ (۲٪)	۰	۹۸ (۹۹٪)	۲ (۱٪)
<b>G908R</b>					
کرون	۳۶ (۹۰٪)	۴ (۱۰٪)	۰	۷۶ (۹۵٪)	۴ (۵٪)
کولیت اولسرو	۹۷ (۹۷٪)	۳ (۳٪)	۰	۹۷ (۹۸٪)	۳ (۱٪)
شاهد	۹۸ (۹۸٪)	۲ (۲٪)	۰	۹۸ (۹۹٪)	۲ (۱٪)
<b>1007fsinsC</b>					
کرون	-/-	-/+	+/+	-	+
کولیت اولسرو	۳۸ (۹۵٪)	۲ (۵٪)	۰	۷۸ (۹۷٪)	۲ (۲٪)
شاهد	۱۰۰ (۱۰۰٪)	۰	۰	۲۰۰ (۱۰۰٪)	۰
شاهد	۹۸ (۹۸٪)	۲ (۲٪)	۰	۹۸ (۹۹٪)	۲ (۱٪)

در ۱۰۰ فرد سالم ۲ آلل جهش یافته برای هر یک از موتاسیون‌های CARD15 (در مجموع ۶ آلل جهش یافته) به دست آمد. در مقایسه فراوانی این جهش‌ها در بیماران کرون با افراد شاهد، فقط موتاسیون R702W در بیماران کرون نسبت به گروه کنترل فراوانی بیشتری داشت (۱۶٪ در برابر ۱۰٪؛  $OR = 1.9/2$ ;  $95\% CI = 0.4/2 - 8.7/3$ ). ۱۳ نفر از ۴۰ بیمار کرون (۳۲٪)، ۱ نفر از ۱۰۰ بیمار کولیت اولسرو (۱٪) و ۲ نفر از افراد سالم شاهد (۲٪) ژنوتیپ هتروزیگوت این موتاسیون را نشان می‌دادند. فراوانی این ژنوتیپ به شکل معنی‌داری در گروه بیماران کرون بیش از افراد شاهد سالم بود (۳۲٪ در برابر ۲٪،  $p < 0.001$ ;  $OR = 4.7/7$ ;  $95\% CI = 1.5/9 - 3.8/8$ ). هیچ ارتباط معنی‌داری بین این موتاسیون و بیماری کولیت اولسرو در مقایسه با گروه کنترل پیدا نشد (۱٪ در برابر ۲٪).

برابر ۰/۶٪). در کل، ارتباط به دست آمده بین جهش‌های شایع ژن CARD15 و بیماری کرون در این مطالعه با سایر مطالعات که ارتباط قابل ملاحظه‌ای بین موتاسیون‌های این ژن و بیماری کرون یافته بودند، همخوانی داشت (۸، ۳۰-۲۸). البته با بررسی هر یک از جهش‌ها بطور جداگانه در مطالعه حاضر تنها موتاسیون R702W با بیماری کرون ارتباط آماری قابل ملاحظه‌ای داشت. فراوانی آلل جهش‌یافته R702W در بیماران کرون ۱۶/۳٪ و در افراد شاهد ۱٪ به دست آمد. اخیراً نتایج مشابهی در لهستان (۸، ۳۱)، و یونان (۳۲، ۳۰) با ORهای به ترتیب ۵/۹ و ۱۱/۱ گزارش شده است، حال آنکه هیچ ارتباط معنی‌داری بین این موتاسیون و بیماری کرون در چند کشور اروپایی دیگر مانند فنلاند (۲۸)، ایتالیا (۳۳) و آلمان (۲۹) به دست نیامده است.

در مطالعه حاضر ۳۲/۵٪ بیماران کرون در برابر ۲٪ افراد سالم برای جهش R702W هتروزیگوت بودند. فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت در بیماران کرون در این مطالعه به نتایج سایر مطالعات اروپایی نزدیک است (از ۲۰٪ در یونان تا ۱۲٪ در ایتالیا) (۸، ۳۳، ۲۴-۲۸).

به طور کلی فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های موتاسیون R702W در مطالعه حاضر به مطالعات اروپایی خیلی شبیه می‌باشد. در بررسی سومین جهش (G908R) گرچه بین این موتاسیون و بیماری کرون ارتباط معنی‌داری به دست نیامد، ولی این نتایج با بعضی مطالعات اروپایی (۳۳-۲۸) یکسان بود. فقط در دو مطالعه در یونان ارتباط معنی‌داری بین این جهش و بیماری کرون گزارش شده است (۳۲، ۳۰).

فراوانی آلل G908R (جهش یافته) در بیماران کرون در جوامع مختلف محدوده وسیعی را شامل می‌شود (از ۰/۶٪ در فنلاند تا ۱۴/۲٪ در یونان) (۲۸، ۳۰). فراوانی آلل جهش یافته و ژنوتیپ هتروزیگوت در بیماران کرون مطالعه حاضر با فراوانی آنها در آلمان (۲۹)، لهستان (۸) و ایتالیا (۳۳) مشابه بود. در حالی که فراوانی این آلل و ژنوتیپ در افراد سالم مطالعه حاضر کمتر از مطالعات مذکور به دست آمد (۳۳، ۳۰، ۲۹). به طور کلی، در بین سه جهش ژن CARD15، موتاسیون G908R نسبت به دو جهش دیگر در جمعیت‌های مختلف (از جمله جمعیت مورد مطالعه حاضر) شیوع کمتری دارد.

برخلاف مطالب فوق، در مطالعات آینده‌نگر در ژاپن (۲۴) هیچیک از این سه موتاسیون با کرون مرتبط شناخته نشده‌اند. این موضوع اهمیت تفاوت‌های منطقه‌ای و قومیتی در وجود

موتاسیون‌های ژن CARD15 و ارتباط آن با بیماری کرون را بیان می‌کند و نیز اختلافات به دست آمده در فراوانی دو موتاسیون G908R و R702W تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف را تأیید می‌نماید. البته این موضوع با بررسی نتایج فراوانی موتاسیون 1007fsinsC در این مطالعه بیش از پیش تحکیم می‌شود، چرا که برخلاف اکثر مطالعات اروپایی (۳۳-۲۸) ما هیچ ارتباطی بین این جهش 1007fsinsC و بیماری کرون پیدا نکردیم. فراوانی آلل جهش یافته 1007fsinsC در مطالعه حاضر هم در گروه بیماران و هم در گروه شاهد بسیار کمتر از مطالعات مذکور بود (۹/۱۷-۴/۸٪) (۳۳-۲۸). ۲/۵٪ بیماران کرون و ۱٪ افراد سالم در این مطالعه آلل جهش یافته داشتند.

چنین به نظر می‌رسد که تعداد کم نمونه در مطالعه ما می‌تواند دلیل نیافتن ارتباط مورد انتظار، بین دو جهش G908R و 1007fsinsC با بیماری کرون باشد. گرچه شاید علت این تفاوت‌ها، اختلاف‌های ژنتیکی موجود بین جمعیت‌های مختلف باشد. بطور مثال هیچ ارتباطی بین این سه جهش ژن CARD15 و بیماری کرون در جمعیت ژاپن، کره و چین گزارش نشده است (۲۷-۲۴) همچنین ارتباطی بین جهش G908R و بیماری کرون در نروژ (۳۴)، آلمان (۳۵) و فنلاند (۲۸) و نیز جهش R702W و بیماری کرون در جمعیت فنلاندی (۲۸) و یهودی‌ها اشکنازی (۱۵، ۳۶) یافت نشد.

با توجه به اینکه جمعیت ایرانی گنجینه ژنتیکی مربوط به خود را داراست، شاید سایر جهش‌های ژن CARD15 در ایران، در ابتلا به بیماری التهابی روده نقش داشته باشند. مطالعات گسترده با تعداد نمونه بیشتر و روش‌های حساس‌تر مانند Sequencing می‌توانند هر تغییری در این قسمت از ژنوم را مشخص نمایند.

از طرفی تمام مطالعات انجام شده در ژنتیک بیماری‌های التهابی روده بیانگر ارتباط مناطق مختلف ژنوم انسان با این بیماری هستند، لذا با در نظر گرفتن تفاوت‌های ژنتیکی، مطالعات متعدد در هر منطقه جغرافیایی و قومیت خاص، برای مشخص شدن مناطق ژنومی مرتبط با بیماری التهابی روده در آن جمعیت می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشد و نیز استفاده از روش‌های اختصاصی مانند میکروآرای جهت بررسی بیان ژن‌ها می‌تواند در روشن شدن هرچه بیشتر اساس ژنتیکی بیماری‌های التهابی روده موثر باشد.

**REFERENCES**

1. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347(6):417-29.
2. Brant S, Panhuysen C, Nicolae D, Reddy D, Bonen D, Karaliukas R, et al. MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2003;73:1282-92.
3. Van Heel D, Fisher S, Kirby A, Daly M, Rioux J, Lewis C, et al. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 2004;13(7):763-70.
4. Ahmad T, Tamboli CP, Jewell DP, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* 2004;128:1533-49.
5. Van Heel D, Satsangi J, Carey A, Jewell D. Inflammatory bowel disease: Progress toward a gene. *Can J Gastroenterol* 2000;14:207-18.
6. Wild G, Rioux J. Genome scan analyses and positional cloning strategy in IBD: successes and limitations. *Best Pract Res Clin Ga* 2004;18(3):541-53.
7. Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, et al. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: Phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol* 2005;11(10):1489-95.
8. Colombel JF. The CARD15 (also known as NOD2) gene in Crohn's disease: Are there implications for current clinical practice? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003;1:5-9.
9. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-36.
10. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
11. Ogura Y, Bonen D, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frame shift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
12. Inohara N, Nunez G. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 2001;20:6473-81.
13. Ogura Y, Inohara N, Benito A. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF (kappa) B. *J Biol Chem* 2001;276:4812-8.
14. Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, et al. CARD15 gene over expression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003;52:840-6.
15. Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopoly-saccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003;124:140-7.
16. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 2004;5:800-8.
17. Inohara N, Ogura Y, Chen FF. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001;276:2551-4.
18. Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 2003;24:652-8.
19. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-8.
20. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:854-66.
21. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867-4.
22. Lesage S, Zouali H, Cezard JP. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845-7.
23. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:679-88.
24. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:86-91.

25. Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, et al. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet* 2002;47:469–72.
26. Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet* 2003;11:6–16.
27. 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.
28. Heliö T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003;52:558–62.
29. Ning CB, Genschel J, Hner SB, Ger SK, Kling K, Dignass A, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:1073–8.
30. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005;11(5):681-5.
31. Lakatos L, Lakatos PL, Willheim-Polli C, Reinisch W, Ferenci P, Tulassay Z, et al. NOD2/CARD15 mutations and genotype-phenotype correlations in patients with Crohn's disease. Hungarian multicenter study. *Orv Hetil* 2004;145(27):1403-11.
32. Gazouli M, Zacharatos P, Panayotis A, Mantzaris G, Gerassimos JB, Barbatis A, et al. Association of NOD2/CARD15 variants with Crohn's disease in a Greek population. *Eur J Gastroen Hepat* 2004;16(11):1177-82.
33. Vavassori P, Borgiani P, Biancone L, D'Apice MR, Del Vecchio Blanco G, Vallo L, et al. CARD15 Mutation Analysis in an Italian population Leu1007fsinsC but neither Arg702Trp nor Gly908Arg mutations are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(2):116-21.
34. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S, et al. Association of NOD2 (CARD15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002;359:1661–5.
35. Murillo L, Crusius JB, van Bodegraven AA, Alizadeh BZ, Pena AS. CARD15 gene and the classification of Crohn's disease. *Immunogenetics* 2002;54:59–61.
36. Sugimura K, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Wang D, Tang YM, et al. A novel NOD2/CARD15 haplotype conferring risk for Crohn disease in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 2003;72:509–18.