

بررسی نقش دفاع بیولوژیک در مقابل استرس اکسیداتیو در سندرم متابولیک و بیماری عروق کرونری

آرش حسین نژاد^۱، حدیث بهزادی^۱، حوریه ثقفی^۱، محمود شیرزاد^۲، مظاهر رحمانی^۱، باقر لاریجانی^{۱*}

چکیده

مقدمه: در این مطالعه فعالیت مسیر پیام رسانی wnt و تداخل آن با مسیر ضد استرس اکسیداتیو (FOXO) بررسی شد. در مسیر پیام رسانی wnt، القا توسط گلیکوپروتئین wnt صورت گرفته و پس از تحریک گیرنده این پیام به بتا کنتین رسیده که تعامل آن با GSK-3beta روند انتقال پیام را تعیین می کند.

روش‌ها: در یک مطالعه مقطعی، دو گروه شامل بیماران مبتلا به سندرم متابولیک و بیماری عروق کرونری (۴۷ نفر) و افراد سالم (۴۲ نفر) وارد مطالعه شدند. RNA از خون افراد مورد مطالعه استخراج شد. به روش RT-PCR از RNA استخراج شده cDNA ساخته شد. میزان کمی بیان ژن‌های GSK-3beta, beta-Catenin, C-myc, MnSOD, GADD45 به روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بیان ژن beta-catenin در بیماران به طور معنی داری از سایرین بالاتر بود ($P = 0/03$). بیان هر دو ژن هدف مسیر FOXO در بیماران نسبت به گروه سالم بیان بالاتری داشت. بیان ژن MnSOD به طور معنی دار در گروه بیماران بالاتر بود ($P = 0/04$). نسبت بیان ژن‌های هدف دو مسیر (MnSOD و C-myc) در حضور بیان بالای beta-catenin بررسی شد. نسبت بیان MnSOD به C-myc در حضور بیان بالای beta-catenin به طور معنی داری بالاتر بود ($P = 0/04$).

نتیجه‌گیری: مطالعه ما نارسایی مسیر wnt را در حضور افزایش فعالیت مسیر FOXO در بیماران عروق کرونری و مبتلا به سندرم متابولیک نشان داد. این یافته‌ها پیشنهاد دهنده عوارض جانبی دفاع فیزیولوژیک بدن در مقابل استرس اکسیداتیو است که می‌تواند باعث استقرار سندرم متابولیک و عوارض آن شود. روشن است که تحقیقات دقیق‌تری برای اثبات این یافته‌ها ضروری است.

واژگان کلیدی: استرس اکسیداتیو، wnt signaling، سندرم متابولیک، بیماری عروق کرونری، بیان ژن

۱- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- مرکز قلب تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان شریعتی، طبقه پنجم مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، تلفن: ۸۸۲۲۰۰۲۷-۸، نمابر:

۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: emrc@sina.tums.ac.ir

مقدمه

بیماری عروق کرونری، تظاهر آترواسکلروز می‌باشد و عامل اصلی مرگ و میر و ناتوانی در سراسر دنیا به حساب می‌آید. عوامل خطر بسیاری در ایجاد و پیشرفت این بیماری نقش دارند که از جمله آن می‌توان به سن، جنس مرد، اختلالات لیپیدی، اختلال در تحمل گلوکز و چاقی اشاره کرد. مجموعه‌ای از عوامل خطر مذکور به عنوان سندرم متابولیک شناخته می‌شوند. آنچه سندرم متابولیک را مورد توجه قرار می‌دهد، اشتراک اجزای آن در مسیرهای مشابهی است که آتروژنیک می‌باشند. استرس اکسیداتیو یکی از این عوامل است. شواهد زیادی استرس اکسیداتیو را به پاتوژنز آترواسکلروز پیوند می‌دهند. توانایی آتروژنیک oxidized LDL (ox-LDL) و همچنین اثرات محافظتی آنتی اکسیدان‌ها در مدل‌های حیوانی آترواسکلروز از این جمله است [۱]. با این حال نوع رابطه استرس اکسیداتیو و آترواسکلروز به خوبی مشخص نیست. این که استرس اکسیداتیو عامل ایجاد آترواسکلروز و یا با عوامل خطر بیماری از جمله سندرم متابولیک همراه یا نتیجه فرایند بیماری است، مورد بحث است.

یکی از سازوکارهایی که استرس اکسیداتیو را به آتروژنز پیوند می‌دهد، عوارض جانبی ایجاد شده در کنار فعالیت‌های دفاعی فیزیولوژیک بدن در مقابل تخریب اکسیداتیو است. یکی از فرایندهای اصلی دفاع سلول در مقابل اکسیدان‌ها، فعال شدن مسیر Forkhead box O- (FOXO) است که عامل نسخه برداری و بیان ژن‌هایی است که محصول آنها در خنثی سازی reactive oxygen species نقش دارند. آنزیم Mn superoxide dismutase (MnSOD) و DNA-damage repair gene (GADD45) ژن‌های هدف این مسیر می‌باشند [۲ و ۳]. نشان داده شده است که FOXO برای فعالیت باید به β -catenin اتصال یابد [۴]. پروتئینی در سیتوپلاسم است که همچنین نقش مهمی در مسیر پیام رسانی wnt بازی می‌کند. در مسیر پیام رسانی wnt، اتصال لیگاند wnt به گیرنده سطح سلولی خود، باعث به راه افتادن آبخاری از وقایع می‌شود که در نتیجه آن glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) مهار می‌شود. در حالت فعال

3 β باعث تخریب β -catenin می‌شود. بنابراین مهار فعالیت GSK-3 β منجر به تجمع سیتوپلاسمی β -catenin شده، در نتیجه به داخل هسته سلول نفوذ می‌کند. β -catenin باعث فعال شدن نسخه برداری از ژن‌های هدف مسیراز جمله C-myc می‌شود [۵].

Almeida و همکاران [۶] گزارش دادند که در اثر استرس اکسیداتیو و فعال شدن مسیر دفاعی FOXO، β -catenin موجود در سیتوپلاسم مصرف شده و بنابراین نمی‌تواند نقش خود را در مسیر پیام رسانی wnt به انجام برساند. این بدین معنی است که استرس اکسیداتیو باعث تضعیف مسیر wnt می‌شود. به دنبال این یافته Manolagas و همکاران [۷] این نظریه را ارائه کردند که تداخل مسیر FOXO با مسیر پیام رسانی wnt می‌تواند توجیه کننده نقش استرس اکسیداتیو در بیماری‌های دژنراتیو وابسته به سن باشد که از این جمله می‌توان به استئوپروز و آترواسکلروز اشاره کرد. مطالعه‌ای در جهت بررسی این نظریه تا کنون گزارش نشده است. از آنجا که استرس اکسیداتیو همراه با سندرم متابولیک با عوارض بلند مدت این سندرم از جمله بیماری عروق کرونری در ارتباط است، بر آن شدیم تا با مقایسه فعالیت دو مسیر مذکور در شرایط *in vivo* به بررسی این نظریه پردازیم. برای این منظور پروفایل بیانی ژن‌های هدف دو مسیر را در بیماران مبتلا به عروق کرونری همراه با سندرم متابولیک و افراد سالم مورد مقایسه قرار دادیم.

روش‌ها

در یک مطالعه مقطعی بین اردیبهشت تا شهریور ۱۳۸۷، مراجعه کنندگان به بخش کاتتریزم مرکز قلب تهران جهت انجام آنژیوگرافی برای شرکت در مطالعه فراخوانده شدند. رضایت نامه جمع‌آوری اطلاعات، نمونه‌گیری و انجام آزمایش‌ها با آگاهی فرد از چگونگی آن و حفظ اسرار گرفته شد. تنگی بیش از ۵۰٪ حداقل یکی از عروق کرونری و وجود سابقه سندرم متابولیک بر اساس کرایتریای NCEP ATP III، شرط ورود فرد به عنوان بیمار در نظر گرفته شدند. عدم وجود ضایعه عروق کرونری در آنژیوگرافی و اجزای سندرم متابولیک در معاینات و آزمایش‌ها، وی را به عنوان فرد سالم وارد مطالعه کرد.

آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۵ انجام شد. نتایج متغیرهای کیفی به صورت فراوانی نسبی (شیوع) و مقادیر متغیرهای کمی به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شد. اهمیت آماری اختلافها در مورد متغیرهای کمی با استفاده از آزمون t و در مورد متغیرهای کیفی با آزمون Chi square برآورد گردید. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

از ۸۹ شرکت کننده در این مطالعه، ۵۸٪ مرد بودند. ۴۷ نفر از آنان بیمار مبتلا به سندرم متابولیک و بیماری عروق کرونری بودند. اطلاعات دموگرافیک و نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی در جدول ۲ نشان داده شده است. سن و نمایه توده بدنی در دو گروه از نظر آماری متفاوت نبود. میانگین HDL در گروه بیماران به طور معنی‌دار بالاتر از گروه افراد سالم بود ($P=0/01$).

پروفایل بیانی ژن‌های مورد بررسی در جدول ۳ آمده است. بیان beta-catenin در بیماران به طور معنی‌داری از سایرین بالاتر بود ($P=0/03$). در گروه بیماران بیان GSK-3beta پایین تر از گروه افراد سالم بود، هرچند این تفاوت معنی‌دار نبود ($P=0/06$). همچنین بیان ژن C-myc در بیماران پایین‌تر بود ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین نتایج بدست آمده نشان داد که بیان هر دو ژن هدف مسیر FOXO در بیماران نسبت به گروه سالم بیان بالاتری داشت. بیان ژن MnSOD به طور معنی‌دار در گروه بیماران بالاتر بود ($P=0/04$). این بیماران همچنین بیان بالاتری از GADD45 را نشان دادند، گرچه معنی‌دار نبود. بیان بالاتر از میانگین بیان در گروه سالم به عنوان بیان بالای ژن‌های مورد بررسی در نظر گرفته شد. شکل ۱ مقایسه بین شیوع بیان بالا در دو گروه را نشان می‌دهد.

پروتکل مطالعه توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات غدد مورد تأیید قرار گرفت.

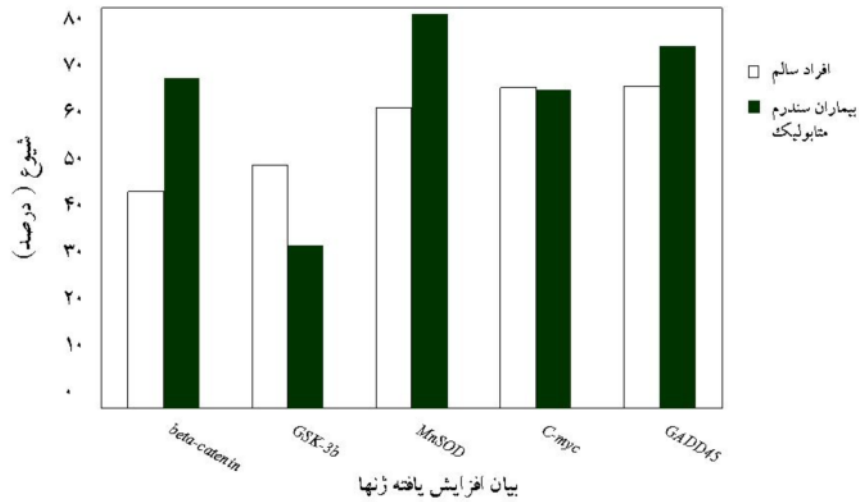
بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی، نمونه خون بیمار در لوله‌های acid-wash و لوله‌های محتوی EDTA جمع‌آوری شد. برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی، سرم خون بیمار جداسازی شد. قند خون ناشتا (FBS)، کلسترول تام، LDL، HDL و تری‌گلیسرید به روش آنزیماتیک اندازه‌گیری شد. برای این منظور از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون ایران و اتوآنالایزر هیتاچی ۹۰۲ استفاده شد. از نمونه خون جمع‌آوری شده در لوله‌های محتوی EDTA جهت استخراج total RNA استفاده شد. استخراج با استفاده از ترکیب ترایزول TRIzol® (Invitrogen) صورت گرفت. به طور خلاصه ۳۰۰ میکرولیتر از خون کامل با ۱ میلی لیتر از محلول ترایزول مخلوط شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به ترکیب اضافه گردید و ورتکس شد. سپس سانتریفیوژ برای مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید. فاز آلی فوقانی برداشته شد و RNA بوسیله حجم برابر از ایزوپروپانول رسوب داده شد و بوسیله اتانول ۷۵٪ شستشو گردید. برای از بین بردن آلودگی DNA در RNA استخراج شده از DNase I, RNase-free (Fermentase) استفاده شد. غلظت و خلوص RNA استخراج شده بوسیله UV spectrophotometer با جذب نوری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی شد.

بیان ژن‌های GSK-3beta, beta-Catenin, C-myc, MnSOD, GADD45 و beta-actin بوسیله quantitative real-time PCR بررسی شد. به طور خلاصه از total RNA بوسیله Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentase) طبق پروتکل پیشنهادی کیت cDNA ساخته شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن که در جدول ۱ ذکر شده، با شرایط مشروح در مطالعات قبلی [۹-۱۴]، با استفاده از Maxima SYBR Green qPCR Master Mix و دستگاه Light Cycler (Roche Applied Science) بیان ژن‌های مورد نظر اندازه‌گیری شد.

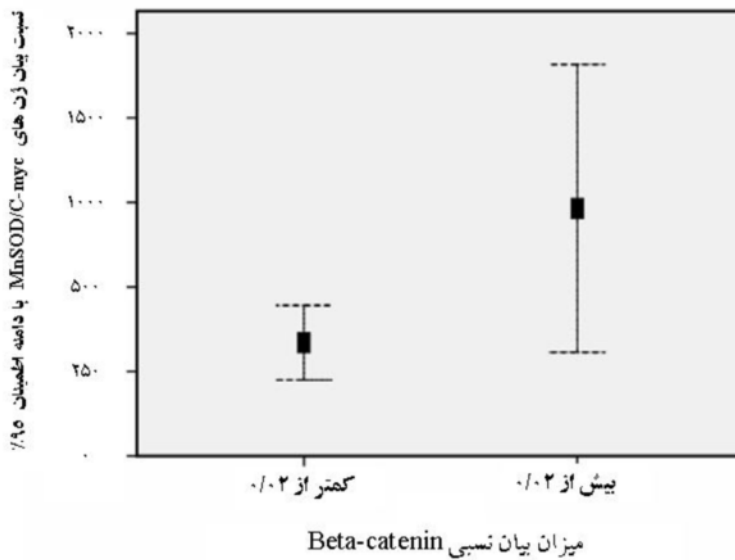
¹ Over-expression

همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، نسبت بیان MnSOD به C-myc در حضور بیان بالای beta-catenin به طور معنی داری بالاتر بود (P = ۰/۰۴).

معنی دار نبود. تفاوتی بین بیان بالای C-myc در دو گروه مشاهده نشد (۶۳/۶٪ در مقابل ۶۴/۱٪). نسبت بیان ژنهای هدف دو مسیر (MnSOD و C-myc) در حضور بیان بالای beta-catenin بررسی شد.



شکل ۱- مقایسه شیوع بیان بالای واسطه ها و ژنهای هدف در مسیر پیام رسانی wnt و ژنهای هدف مسیر FOXO بین بیماران مبتلا به دیابت و افراد سالم



شکل ۲- مقایسه نسبت بیان ژن MnSOD به بیان ژن C-myc در حضور و عدم حضور بیان بالای beta-catenin (بیان بیش از میانگین بیان در افراد سالم).

بحث

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که بیان beta-catenin در بیماران مبتلا به بیماری عروق کرونری و سندرم متابولیک بالاتر است. شیوع بیشتر بیان بالا در این بیماران نیز در همین راستاست. این یافته نشان دهنده beta-catenin upregulation در حضور آترواسکلروز می باشد. همچنین یافته های این مطالعه نشان داد که بیان GSK-3beta در بیماران کرونری downregulate شده است. از آنجا که GSK-3beta در تخریب beta-catenin نقش دارد، کاهش بیان آن منجر به کاهش تخریب beta-catenin می شود. این یافته ها نشان دهنده آن است که واسطه مسیر پیام رسانی wnt به دنبال بیان بیشتر و تخریب کمتر، تجمع بیشتری در سیتوپلاسم خواهد یافت که جریان بیشتر به سمت هسته سلول و فعال کردن نسخه برداری از ژن های هدف را به دنبال دارد. با وجود این که انتظار داریم بیان بالاتری از ژن هدف را شاهد باشیم، ولی نتایج نشان می دهند که C-myc نه تنها افزایشی نداشته بلکه حتی تا حدی کاهش یافته است. این شواهد به نفع آن است که مسیر پیام رسانی wnt حتی در حضور میزان بالاتری از واسطه خود، فعالیت افزایش یافته ای ندارد.

با توجه به نظریه ارائه شده از سوی Manolagas و همکاران [۷]، ما ژن های هدف مسیر FOXO را نیز مطالعه کردیم. نتایج نشان داد که بیان ژن MnSOD در بیماران کرونری افزایش یافت و ژن GADD45 نیز بیان بیشتری را در بیماران نشان داد. این یافته ها در راستای افزایش فعالیت مسیر FOXO را در حضور آترواسکلروز بود. مطالعات تجربی مهمترین نقش MnSOD را محافظت از ارگان های مختلف در مقابل عوامل اکسیدان نشان داده اند [۱۵ و ۱۶]. نشان داده شده که بیان بالای MnSOD، یک عامل حفاظتی مهم در مقابل ایسکمی میوکارد در موش های ترانس ژنیک است [۱۷].

بیان بالای MnSOD همچنین از اکسیداسیون LDL جلوگیری می کند [۱۸]. اخیراً یک مطالعه نشان داد که محصول واریانت خاصی از ژن MnSOD که فعالیت بیشتری از خود نشان می دهد، باعث مهار آپوپتوز ماکروفاژها در مواجهه با ox-LDL می شود و از خطر بروز

بیماری کرونری می کاهد [۱۹]. با توجه به مطالعات ذکر شده، بیان بالاتر MnSOD در بیماران کرونری در مطالعه ما می تواند نتیجه استرس اکسیداتیو بیشتر در این افراد باشد که با پاتوژنز آترواسکلروز در ارتباط است.

از سوی دیگر با بررسی همزمان دو مسیر مورد مطالعه دریافتیم که بیان بالای beta-catenin در بیماران کرونری با افزایش نسبت بیان MnSOD به بیان C-myc همراه است. این یافته در این راستاست که افزایش فعالیت مسیر FOXO در بیماران کرونری با کاهش فعالیت مسیر رسانی wnt همراه است. اگرچه افزایش فعالیت مسیر FOXO و به ویژه بیان بیشتر MnSOD در جهت جلوگیری از آتروژنز است، نتایج مطالعه ما نشان می دهد که این امر با نارسایی مسیر wnt در بیماران کرونری همراه است. این یافته شاهدهی به نفع نظریه Manolagas [۷] می باشد که ادعا دارد استرس اکسیداتیو با فعال کردن مسیر FOXO باعث انحراف beta-catenin از مسیر پیام رسانی wnt می شود و در نهایت به نارسایی این مسیر منجر می شود.

اخیراً نقش احتمالی مسیر پیام رسانی wnt در جلوگیری از بیماری عروق کرونری و عوامل خطر آن (سندرم متابولیک) مورد توجه قرار گرفته است. کشف یک جهش در ژن LRP6 (co-receptor گیرنده سطح سلولی wnt) که با بیماری زودرس عروق کرونری و عوامل خطر متابولیک آن از جمله هیپرلیپیدمی پیوستگی قوی داشت، به این امر اعتبار بیشتری بخشید. مطالعات بیشتر نشان دادند که این جهش باعث کاهش فعالیت شدید مسیر wnt می شود [۲۰ ج]. با در نظر گرفتن این نقش برای مسیر wnt، مطالعه ما نشانگر آنست که فعالیت افزایش یافته مسیر FOXO، با وجود این که به طور فیزیولوژیک سیستم قلبی عروقی را از استرس اکسیداتیو محافظت می کند، می تواند با مهار مسیر wnt باعث ایجاد عوامل خطر و پیشرفت آترواسکلروز شود.

مطالعه ما محدودیت هایی نیز داشت. ما بیان ژن های beta-catenin و GSK-3beta را تنها در سطح بیان mRNA اندازه گیری کردیم. اگرچه تغییرات بیان ژن در راستای بیش فعالی مسیر wnt بود، این نتیجه باید با بررسی پروتئینی تایید شود. بنابراین بررسی های بیشتر در این جهت مورد

اکسیداتیو است که می‌تواند باعث آتروژنز شود. روشن است که انجام تحقیقات دقیقتری برای اثبات این یافته‌ها ضروری هستند.

سپاسگزاری

هزینه این طرح توسط مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران تامین شد.

نیاز است. اگرچه ما تغییرات عکس دو مسیر را به طور همزمان نشان دادیم، این نتایج تنها در جهت نظریه بیان شده است. بنابراین رابطه علت و معلولی این وقایع باید در مطالعات تجربی آیند روشن شود.

در کل، مطالعه ما نارسایی مسیر wnt را در حضور افزایش فعالیت مسیر FOXO در بیماران عروق کرونری و مبتلا به سندرم متابولیک نشان داد. این یافته‌ها پیشنهاد دهنده عوارض جانبی دفاع فیزیولوژیک بدن در مقابل استرس

ماخذ

1. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84(4):1381-478.
2. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 2002; 419:316-321.
3. Nemoto S, Finkel T Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 2002; 295:2450-2452.
4. Essers MA, Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC. Functional interaction between b-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* 2005; 308: 1181-1184.
5. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997; 11: 3286-3305.
6. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem* 2007; 282(37):27298-305.
7. Manolagas SC, Almeida M. Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Mol Endocrinol* 2007; 21(11):2605-14.
8. Helgason CD, indy Miller C L. *Basic Cell Culture Protocols* Humana Press, 2005 pp.105-116.
9. Krugluger W, Seidel S, Steindl K, Binder S. Graefes Epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and beta-catenin transcription in cultured ARPE-19 cells. *Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245(10):1543-8.
10. Ji L, Cao XF, Wang HM, Li YS, Zhu B, Xiao J, Wang D. Expression level of beta-catenin is associated with prognosis of esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13(18):2622-5.
11. Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18(3):280-7.
12. Yucesoy B, Johnson VJ, Kashon ML, Fluharty K, Vallyathan V, Luster MI. Lack of association between antioxidant gene polymorphisms and progressive massive fibrosis in coal miners. *Thorax* 2005; 60(6):492-5.
13. Grace MB, McLeland CB, Blakely WF. Real-time quantitative RT-PCR assay of GADD45 gene expression changes as a biomarker for radiation biodosimetry. *Int J Radiat Biol* 2002; 78(11):1011-21.
14. Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, Conaway HH, Lerner UH. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem* 2006; 281(5):2414-29.
15. Kinscherf R, Deigner HP, Usinger C, et al. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase in macrophages by oxidized LDL: its relevance in atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemia rabbits. *FASEB J* 1997; 11:1317-28.
16. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995; 11:376-81.
17. Fang X, Weintraub NL, Rios CD, et al. Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. *Circ Res* 1998; 82:1289-97.
18. Fujimoto H, Taguchi J, Imai Y, Ayabe S, Hashimoto H, Kobayashi H, Ogasawara K, Aizawa T, Yamakado M, Nagai R, Ohno M. Manganese superoxide dismutase

- polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. *Eur Heart J* 2008; 29(10):1267-74.
19. Kakko S, Paivansalo M, Koistinen P, Kesaniemi YA, Kinnula VL, Savolainen MJ. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 168 147-152.
20. Mani A, Radhakrishnan J, Wang H, Mani A, Mani MA, Nelson-Williams C, Carew KS, Mane S, Najmabadi H, Wu D et al. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science* 2007; 315:1278-1282.