



Original Article

Systematic Analysis of Molecular Mechanisms of Exercise in Regulating Cholesterol Biosynthesis: Molecular Network Modeling for Therapeutic Target Identification

Milad Abdollahi¹, Sayyed Mohammad Marandi^{1*}, Zahra Safayinejad²,
Mohammad Hossien Nasr Esfahani²

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2. Department of Genetics, Royan Institute of Biotechnology, Isfahan, Iran

Received: 08/10/2019, **Revised:** 02/03/2021, **Accepted:** 29/04/2021

* Corresponding Author: Sayyed Mohammad Marandi E-mail: s.m.marandi@spr.ui.ac.ir Tel: +98-9131102559

Extended Abstract

Background and Purpose

This study aims to delve into the intricate regulation of cholesterol biosynthesis, a process governed by a network of genes critical to cholesterol synthesis, lipid metabolism, and cellular signaling. By focusing on key genes such as *Idi1*, *Fdps*, *Sqle*, and *Hmgcs1*, it investigates their regulatory mechanisms under various conditions, including high-fat diets and exercise. The research employs computational modeling to unravel the complex interactions within these regulatory networks, offering insights into the dynamic regulation of cholesterol biosynthesis pathways. Additionally, the study explores innovative therapeutic targets, such as microRNAs, to develop novel strategies for managing dyslipidemia. Combining systems biology approaches and bioinformatics tools, this research aspires to enhance the understanding of cholesterol metabolism. It also seeks to assess the impact of exercise and new pharmaceutical interventions on lipid disorders, ultimately aiming to identify critical pathways and genes for effective therapeutic advancements.

Methods

This study employed a computational systems biology approach to investigate the regulatory mechanisms governing cholesterol biosynthesis under different conditions, such as high-fat diets and exercise. The research focused on key genes (*Idi1*, *Fdps*, *Sqle*, and *Hmgcs1*),

integral to lipid metabolism and cellular signaling. Bioinformatics tools and advanced computational modeling were utilized to construct and analyze gene regulatory networks involved in cholesterol biosynthesis.

The transcriptional data were used to identify and map interactions between these key genes, revealing their roles in the dynamic regulation of cholesterol biosynthesis pathways. By simulating regulatory network behavior under diverse conditions, including high-fat dietary intake, the analysis offered insights into the mechanisms controlling gene expression and pathway dynamics. Additionally, clustering analysis of network topologies was performed, and results were cross-validated using Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis.

To assess the broader implications, the study explored the impact of physical exercise and high-fat dietary interventions on these regulatory networks. It also investigated potential microRNA targets within the network to discover novel therapeutic strategies for managing dyslipidemia and lipid metabolism disorders. Computational predictions were integrated with experimental data to refine the regulatory network models and identify key nodes and interactions for potential interventions.

Results

This study thoroughly analyzed the regulatory mechanisms of cholesterol biosynthesis pathways, focusing on the transcriptional activity of key genes (*Idi1*, *Fdps*, *Sqle*, and *Hmgcs1*). These genes are critical to cholesterol synthesis, lipid metabolism, and cellular signaling. Using transcriptional data, the research identified specific hub genes that play pivotal roles in these pathways, helping to illuminate their functional importance within the broader regulatory network.

Network clustering analyses, conducted alongside GO (Gene Ontology) and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway analyses, validated the functional significance of these pathways and provided a more robust understanding of the cholesterol biosynthesis process. These analyses further revealed critical interactions and pathways essential for maintaining cholesterol homeostasis, particularly under varying environmental and dietary conditions.

A notable finding of the study was the dynamic regulation of cholesterol biosynthesis pathways under high-fat dietary conditions. The computational modeling demonstrated how high-fat diets alter the expression of regulatory genes, impacting the overall network dynamics. Furthermore, the study assessed the modulatory effects of physical exercise on these regulatory pathways, highlighting its potential to restore balance in lipid metabolism.

Another key result was the identification of microRNAs as novel therapeutic targets. These microRNAs were shown to interact with the regulatory networks of cholesterol biosynthesis, offering potential strategies for managing dyslipidemia and related metabolic disorders. By targeting these microRNAs, the study opens the door for innovative pharmaceutical interventions.

Additionally, the integration of computational and experimental data provided a comprehensive perspective on the intricate interactions within cholesterol regulatory networks. This approach allowed for the identification of critical nodes and regulatory mechanisms that could be leveraged for therapeutic purposes.

Overall, the findings provide a detailed map of cholesterol biosynthesis pathways, including the identification of key hub genes, regulatory pathways, and novel therapeutic targets. The study enhances the understanding of cholesterol metabolism and highlights the therapeutic potential of exercise and targeted pharmaceutical approaches in managing lipid disorders and improving liver function. These insights offer a foundation for the development of more effective management strategies for cholesterol biosynthesis and lipid metabolism disorders.

Conclusion

This study provides significant insights into the regulatory mechanisms of cholesterol biosynthesis by identifying key hub genes (*Idi1*, *Fdps*, *Sqle*, and *Hmgcs1*) and their role in lipid metabolism and cellular signaling. Using computational modeling and transcriptional data, it uncovers the dynamic regulation of cholesterol biosynthesis pathways under varying conditions, such as high-fat diets and physical exercise. The findings emphasize the potential of exercise to modulate lipid metabolism and restore balance within these networks.

Additionally, the study highlights microRNAs as innovative therapeutic targets, offering new strategies for managing dyslipidemia and related disorders. By integrating bioinformatics tools and systems biology approaches, it effectively maps critical pathways and interactions, contributing to a deeper understanding of cholesterol homeostasis.

Overall, this research advances knowledge on cholesterol metabolism, identifies actionable therapeutic targets, and proposes effective interventions, laying a foundation for innovative treatment strategies and improved management of lipid disorders.

Keywords: Cholesterol Biosynthesis, Gene Regulatory Networks, Dyslipidemia, Exercise, Bioinformatics

Article message

This study, through the identification and analysis of five hub genes involved in cholesterol biosynthesis, has deepened our understanding of gene regulatory networks and the role of the cellular ER. GO and KEGG analyses revealed that these genes are integral to key metabolic processes and hold significant potential for managing diseases associated with disruptions in cholesterol biosynthesis. The dynamic interaction between cholesterol biosynthesis and physical activity can serve as a strategy for effectively regulating this process, with the identified genes emerging as promising diagnostic biomarkers for metabolic diseases. These findings lay the groundwork for future research aimed at developing innovative treatments and managing lipid disorders.

Ethical Considerations

This study received approval from the Ethics Committee of the University of Isfahan (ethical code: IR.UI.REC.1403.005).

<https://ethics.research.ac.ir/EthicsProposalView.php?id=455176>

Authors' Contributions

Conceptualization, Data Collection, Manuscript Writing: Milad Abdollahi

Project Manager, Review and Editing: Sayyed Mohammad Marandi

Data Analysis, Review and Editing: Zahra Safayinejad

Literature Review, Review and Editing: Mohammad Hossien Nasr Esfahani

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in the present study.

Acknowledgments

We sincerely thank and appreciate the Institute of Physical Education and Sport Sciences for their unwavering support in conducting this research.

فیزیولوژی ورزشی، زمستان ۱۴۰۲، دوره ۱۵، شماره ۶۰، صص ۳۴-۱۷. Doi: [10.22089/spj.2022.12005.2173](https://doi.org/10.22089/spj.2022.12005.2173)



فیزیولوژی ورزشی

Journal homepage: <https://spj.ssric.ac.ir>



نوع مقاله: پژوهشی

تجزیه و تحلیل سیستمی سازوکارهای مولکولی فعالیت ورزشی در تنظیم بیوسنتز کلاسترول: مدل سازی شبکه های مولکولی برای شناسایی اهداف درمانی

میلاد عبداللہی^۱، سید محمد مرندي^{۱*}، زهرا صفائی نژاد^۲، محمد حسین نصر اصفهانی^۲

۱. گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲. گروه ژنتیک، موسسه رویان اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۶، تاریخ اصلاح: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۹

نویسنده مسئول: دکتر سید محمد مرندي، Tel: +۹۸-۹۱۳۱۱۰۲۵۵۹، E-mail: s.m.marandi@spr.ui.ac.ir

چکیده

اهداف: تنظیم بیوسنتز کلاسترول یک فرایند پیچیده و به شدت کنترل شده است که شامل شبکه ای از ژن ها می شود که سنتز، تنظیم و هومئوستاز سطح کلاسترول را هماهنگ و تنظیم می کنند. این مطالعه به تحلیل ژن های کلیدی مانند Fdps, Idil, Hmgcs1, Sqle می پردازد که در بیوسنتز کلاسترول، متابولیسم لیپیدها و سیگنالینگ سلولی نقش های اساسی دارند. **مواد و روش ها:** مدل سازی محاسباتی این شبکه های تنظیمی می تواند تعاملات پیچیده بین این ژن ها و مکانیزم های تنظیمی آن ها را تحت شرایط مختلف، از جمله رژیم های پرچرب، نمایان کند. تحلیل بیوانفورماتیکی ما تأثیر رژیم غذایی پرچرب و فعالیت ورزشی بر این ژن ها را بررسی کرده و به بررسی تنظیمات دینامیک مسیرهای بیوسنتز کلاسترول و قابلیت تنظیم آن ها می پردازد، علاوه بر این شناسایی اهداف دارویی جدید مانند MicroRNA ها می تواند به استراتژی های درمانی نوآورانه برای مدیریت دیس لیپیدمی منجر شود. با ترکیب رویکردهای زیست شناسی سیستمی و ابزارهای محاسباتی، این مطالعه هدف دارد تا درک بهتری از متابولیسم کلاسترول به دست آورده و تأثیر فعالیت ورزشی و مداخلات دارویی جدیدی را برای اختلالات لیپیدی شناسایی کند. **یافته ها:** مسیرهای بیوسنتز کلاسترول با استفاده از داده های رونویسی تحلیل شدند و ژن های هاب درگیر در این مسیرها شناسایی گردیدند. تجزیه و تحلیل خوشه ای شبکه نتیجه تحلیل های GO و KEGG را تأیید کرده

است. **نتیجه گیری:** این مطالعه فهرستی از ژن های هاب، مسیرهای مهم و بینش های جدید برای توسعه استراتژی های مدیریت بیوسنتز کلسترول را ارائه کرده و مکانیسم های اساسی پاسخ کبد را روشن می کند.

واژگان کلیدی: بیوسنتز کلسترول، شبکه های تنظیمی ژنی، دیس لیپیدمی، فعالیت ورزشی، بیوانفورماتیک

مقدمه

بیوسنتز کلسترول، یک فرایند زیستی پیچیده و به شدت تنظیم شده است که اصلی ترین آن در کبد رخ می دهد. جالب توجه است که مطالعات اخیر نشان داده اند فعالیت بدنی منظم می تواند به طور قابل توجهی این مسیرهای متابولیکی را تحت تأثیر قرار دهد. این فرایند نقش حیاتی در حفظ هومئوستاز لیپیدی، ساختار غشای سلولی، تولید استروئیدها، و سنتز ویتامین D دارد. تحقیقات نشان داده اند که ورزش هوازی با افزایش بیان گیرنده های LDL در کبد، جذب کلسترول از گردش خون را بهبود می بخشد. کبد به عنوان مرکز تنظیم این مسیر، با استفاده از شبکه ای از ژن ها و پروتئین ها، سطح کلسترول در بدن را تحت کنترل نگه می دارد. مطالعات فیزیولوژی ورزشی نشان داده اند که تمرینات استقامتی می توانند فعالیت آنزیم-HMG CoA ردوکتاز - آنزیم کلیدی در سنتز کلسترول - را تا ۴۰٪ کاهش دهند. هومئوستاز کلسترول، شامل سنتز، جذب، جریان، و استری شدن کلسترول که برای حفظ عملکرد طبیعی سلول مهم است. شواهد قوی وجود دارد که نشان می دهد ورزش منظم می تواند هر یک از این فرآیندها را به طور مثبت تعدیل کند. اختلال در هومئوستاز کلسترول با بیماری های مختلفی از جمله سرطان، بیماری آلزایمر، بیماری های قلبی عروقی، اترواسکلروتیک، بیماری کبد چرب غیرالکلی و دیابت مرتبط است. جالب است بدانیم که فعالیت بدنی منظم می تواند خطر این بیماری ها را تا حد قابل توجهی کاهش دهد، که بخشی از این اثر از طریق تنظیم متابولیسم کلسترول اعمال می شود (۱-۳).

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی^۱ (۲۰۲۳)، شیوع کلسترول بالا در بزرگسالان به ۴۲٪ افزایش یافته است که فعالیت بدنی ناکافی (کمتر از ۱۵۰ دقیقه در هفته) یکی از عوامل اصلی این روند محسوب می شود. در ایران، این میزان به ۴۵٪ می رسد و دو سوم جمعیت فعالیت بدنی کافی ندارند که این موضوع نشان دهنده اهمیت این عامل در بیماری های قلبی-عروقی در سطح جهان است (۴). در ایران نیز، مطالعات نشان داده اند که شیوع دیس لیپیدمی قابل توجه است؛ به عنوان مثال، حدود ۴۲٪ از بزرگسالان ایرانی کلسترول تام ۲۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر دارند، این آمار، ضرورت توجه به تنظیم متابولیسم کلسترول در جمعیت ایران را برجسته می کند. با این حال، مطالعات اپیدمیولوژیک به وضوح نشان داده اند که افراد فعال از نظر بدنی، شیوع کمتری از دیس لیپیدمی را نشان می دهند (۵).

بیوسنتز کلسترول، فراتر از یک مسیر متابولیک ساده، یک شاهکار زیستی است که توسط شبکه ای پیچیده از ژن ها و پروتئین ها تنظیم می شود و نقشی حیاتی در هومئوستاز لیپیدی، یکپارچگی غشای سلولی و سیگنالینگ مولکولی ایفا می کند. تحقیقات اخیر نشان داده اند که ورزش می تواند بیان بسیاری از این ژن های تنظیمی را تغییر دهد. برای مثال، تمرینات مقاومتی

¹ WHO

می‌توانند بیان ژن SREBP-2 فاکتور رونویسی اصلی کنترل‌کننده سنتز کلسترول را کاهش دهند (۶). این مسیر متابولیک پیچیده عمدتاً در کبد و از طریق مسیر موالونات^۱ رخ می‌دهد و تحت کنترل دقیق شبکه‌های تنظیمی ژنی و آنزیمی قرار دارد. این فرایند با تبدیل استیل کوآنزیم A به ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوئاریل کوآنزیم A^۲ توسط آنزیم HMG-CoA سنتاز آغاز می‌شود که مرحله محدودکننده سرعت محسوب می‌شود. سپس، HMG-CoA توسط HMG-CoA ردوکتاز به موالونات تبدیل می‌شود، آنزیمی که هدف اصلی داروهای استاتینی است. این مسیر در نهایت با فعالیت آنزیم‌هایی مانند فارنزیل پیروفسفات سنتاز^۳ و اسکوالن اپوکسیداز^۴ به تولید کلسترول منجر می‌شود. از منظر پاتوفیزیولوژیک، اختلال در این مراحل می‌تواند به تجمع واسطه‌های متابولیکی یا تولید بیش از حد کلسترول منجر شود که هر دو در بیماری‌های متابولیک نقش دارند (۲، ۷).

مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که ورزش منظم می‌تواند فعالیت آنزیم HMG-CoA ردوکتاز را تا ۵۰٪ کاهش دهد، که این اثر احتمالاً از طریق فعال‌سازی مسیر AMPK ناشی از ورزش ایجاد می‌شود. این آنزیم هدف اصلی داروهای استاتینی است و یافته‌ها نشان می‌دهند که ورزش می‌تواند مکانیسمی مشابه اما طبیعی‌تر برای کنترل سنتز کلسترول ارائه دهد (۸، ۹).

ژن‌هایی نظیر Hmgcs1 و Hmger، به‌عنوان ستون‌های اصلی مسیر موالونات، سنتز اولیه کلسترول را هدایت می‌کنند، در حالی که Fdps، Mvd و Fdft1 در مراحل میانی تولید ایزوپرنوئیدها و تبدیل آن‌ها به اسکوالن نقش دارند. در این میان، Sqle و Lss با تبدیل اسکوالن به لانوسترول، بخش کلیدی در این مسیر را تشکیل می‌دهند و Dhcr7 و Nsdhl با تنظیم مراحل نهایی، بلوغ مولکول کلسترول را تضمین می‌کنند. اما این شبکه تنها به سنتز محدود نمی‌شود؛ Ldlr با تنظیم برداشت کلسترول از پلاسما و Stard4 با انتقال داخل سلولی آن، تعادل دینامیک بین تولید و مصرف را حفظ می‌کنند (شکل ۱) (۱۰-۱۴).

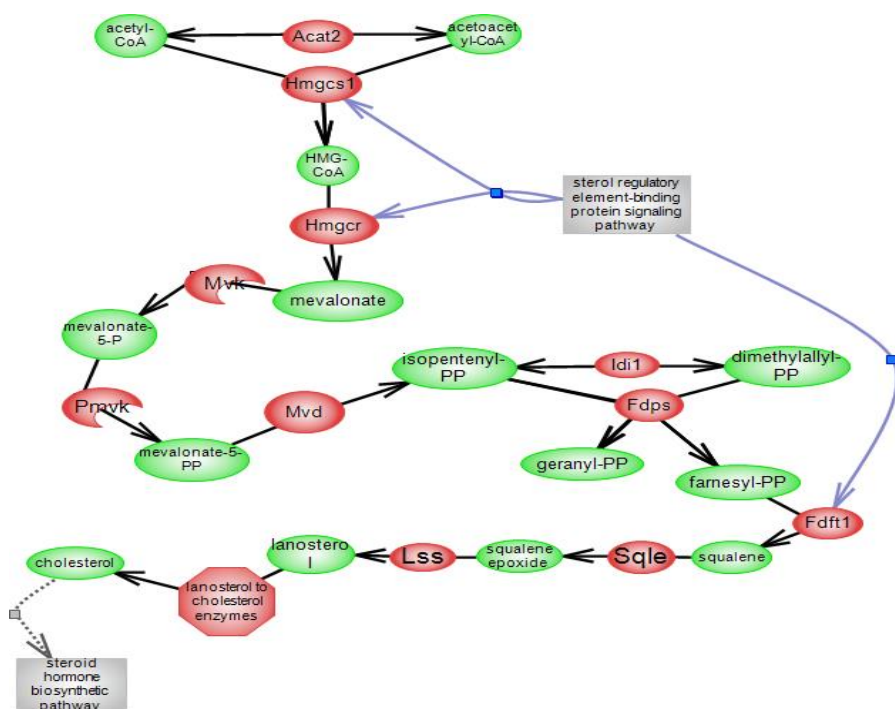
این مطالعه با تحلیل جامع این شبکه ژنی و با تمرکز ویژه بر چگونگی تأثیر فعالیت ورزشی بر بیان و عملکرد این ژن‌ها، نه تنها به روشن‌سازی مکانیزم‌های تنظیمی می‌پردازد، بلکه با رویکردی سیستمی، اهداف دارویی نوظهوری را پیشنهاد می‌کند. ما به طور خاص بررسی کرده‌ایم که چگونه مداخلات ورزشی می‌توانند این شبکه ژنی را تعدیل کنند و چگونه می‌توان از این اطلاعات برای توسعه راهکارهای درمانی جدید استفاده کرد.

¹ mevalonate pathway

² HMG-CoA

³ Fdps

⁴ Sqle



شکل ۱: شماتیک از مسیر بیوسنتز کلسترول (اقتباس شده از سایت RGD)
Figure 1: Schematic of the Cholesterol Biosynthesis Pathway (Adapted from the RGD website)

پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی سیستمی و مدل‌سازی محاسباتی، امکان تحلیل عمیق تأثیر ورزش بر این تعاملات پیچیده را فراهم کرده است. این ابزارها به ما اجازه می‌دهند تا دقیقاً مشخص کنیم که چگونه انواع مختلف فعالیت بدنی (هوازی، مقاومتی، تناوبی با شدت بالا) می‌توانند الگوهای بیان ژن‌های کلیدی در مسیر سنتز کلسترول را تغییر دهند. ما در این مطالعه به طور خاص نشان داده‌ایم که ورزش چگونه می‌تواند از طریق تنظیم میکروRNAهای خاص، بیان ژن‌های این مسیر را تحت تأثیر قرار دهد.

نتایج این پژوهش نه تنها بینش‌های جدیدی را در مورد پاسخ کبدی به ورزش ارائه می‌دهد، بلکه با پیشنهاد اهداف دارویی بالقوه که می‌توانند اثرات مشابه ورزش را تقلید کنند، پایه‌ای محکم برای طراحی مداخلات درمانی مؤثر فراهم می‌کند. در نهایت، این تحقیق تلاش دارد تا با تلفیق علم داده، زیست‌شناسی سیستم‌ها و فیزیولوژی ورزش، راه را برای مدیریت پیشرفته‌تر متابولیسم کلسترول هموار سازد.

روش پژوهش

۲.۱. جمع آوری داده های ژن های دخیل در بیوسنتز کلسترول

ژن های مورد بررسی در این مطالعه بر اساس معیار تغییر بیان برابر با بیش از ۲ یا کمتر از -۲ (fold change >2 یا <-2) انتخاب شدند. این ژن ها، که در جدول تکمیلی ۱ فهرست شده اند، به عنوان کاندیداهای کلیدی برای انجام تحلیل های شبکه ای تعیین گردیدند تا نقش آن ها در برهم کنش های مولکولی و مسیرهای زیستی مرتبط مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲.۲. شبکه های PPI و تجزیه و تحلیل هاب

برای بررسی برهم کنش های بین ژن های فهرست شدن (جدول تکمیلی ۱)، تحلیل ها با استفاده از پلتفرم آنالین STRING نسخه ۱۲ (<http://string-db.org>) انجام شد. تنظیمات اولیه با حداقل امتیاز برهم کنش ۰.۱۵۰ (سطح اطمینان پایین) اعمال گردید و شبکه تعاملات پروتئین-پروتئین^۱ تولید شد. سپس، داده های PPI به نرم افزار Cytoscape (نسخه ۳.۱۰.۱) منتقل شدند تا تحلیل های پیشرفته تر انجام گیرد. برای شناسایی ژن های هاب در شبکه تولید شده، از پلاگین CytoHubba (نسخه ۰.۱) استفاده شد که ابزاری قدرتمند برای رتبه بندی و تشخیص گره های کلیدی در شبکه های زیستی است. سه الگوریتم محاسباتی DEGREE، DMNC و MNC به کار گرفته شدند تا ژن های هاب شناسایی و اولویت بندی شوند. برای هر الگوریتم، پنج پروتئین برتر به عنوان پروتئین های هاب انتخاب گردیدند. در نهایت، ژن های هاب و برهم کنش های مرتبط با آن ها در یک زیرشبکه استخراج و به صورت بصری نمایش داده شدند تا ساختار تعاملی و اهمیت عملکردی آن ها در شبکه مشخص شود.

۲.۳. هستی شناسی ژن و تجزیه و تحلیل غنی سازی مسیر ژن های بیان شده

برای تحلیل غنی سازی ژن های موجود در زیرشبکه هاب، از پایگاه داده KEGG استفاده شد تا مسیرهای زیستی مرتبط شناسایی شوند. همچنین، ابزار آنالین STRING به منظور انجام تحلیل (GO) به کار گرفته شد که شامل دودسته اصلی بود: اجزای سلولی^۲ و فرایندهای بیولوژیکی^۳ این رویکرد امکان بررسی جامع نقش های عملکردی و مکانیزم های زیستی ژن های هاب را فراهم کرد.

۲.۴. تحلیل خوشه ای شبکه

برای خوشه بندی گره های شبکه، از پلاگین CytoCluster (نسخه ۲.۱.۰) استفاده شد. الگوریتم شناسایی مجموعه پروتئین (IPCA) با آستانه تنظیم شده روی ۱۰ به کار گرفته شد تا تحلیل خوشه ای زیرشبکه انجام گیرد. سپس، ژن های موجود در هر خوشه با استفاده از نسخه ۱۲ پلتفرم STRING مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند تا مسیرهای مرتبط در پایگاه داده

^۱ PPI

^۲ CC

^۳ BP

KEGG شناسایی شوند. این رویکرد امکان بررسی هدفمند تعاملات ژنی و ارتباط آن‌ها با مسیرهای زیستی کلیدی را فراهم کرد (۱۵).

نتایج

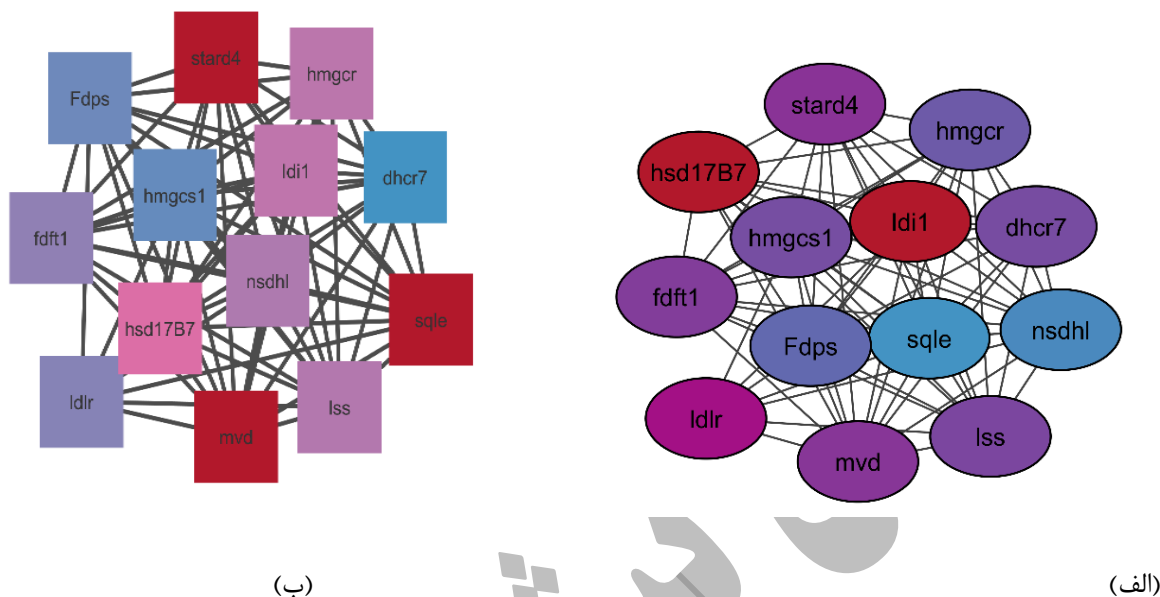
۳.۱. متابولیسم لیپید

داده‌های مورد استفاده در این مطالعه از تحلیل‌های RNA-seq استخراج شده‌اند. درحالی‌که مطالعات پیشین به طور گسترده بیوسنتز کلسترول و مکانیزم‌های متابولیسم لیپیدها را روشن ساخته‌اند، ژن‌های بررسی‌شده در این پژوهش (جدول تکمیلی ۱) به طور خاص از این داده‌های RNA-seq انتخاب شدند تا دیدگاه دقیق‌تری از شبکه‌های تنظیمی و تعاملات ژنی مرتبط ارائه دهند (۲۰-۱۶).

۳.۲. شبکه‌های PPI و تجزیه و تحلیل هاب

در مطالعه حاضر، ۱۳ ژن به‌عنوان ژن‌های با بیان افتراقی^۱ که از مطالعات پیشین RNA-seq استخراج شده بودند، تحت تحلیل زیست‌شناسی سیستمی قرار گرفتند. این ژن‌ها شامل تعدادی از ژن‌های تنظیم‌شده به‌صورت مثبت (up-regulated) و منفی (down-regulated) بودند که در مسیر بیوسنتز کلسترول نقش دارند. شبکه‌های تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) با استفاده از ابزار STRING و نرم‌افزار Cytoscape ترسیم شدند (شکل ۲). پایگاه داده <http://string-db.org> منبعی جامع برای شناسایی و پیش‌بینی برهم‌کنش‌های پروتئینی شناخته‌شده و محاسباتی است که در صورت بهره‌گیری از روش‌های تحلیل مناسب، ابزاری بی‌نظیر برای مطالعات شبکه‌ای محسوب می‌شود. از سوی دیگر، Cytoscape یک پلتفرم قدرتمند است که امکان تجسم شبکه‌های تعامل مولکولی و یکپارچه‌سازی داده‌های زیستی را فراهم می‌کند. این ترکیب ابزارها به ما اجازه داد تا ساختار و دینامیک تعاملات ژنی مرتبط با بیوسنتز کلسترول را با دقت بیشتری بررسی کنیم (۲۱).

¹ DEGs



شکل ۲: تحلیل شبکه‌ی PPI ژن‌های مرتبط با بیوسنتز کلسترول

Figure 2: PPI Network Analysis of Genes Related to Cholesterol Biosynthesis

(الف) شبکه‌ی تعامل پروتئین - پروتئین (PPI) ژن‌های تنظیم‌شده بالا و پایین در مسیر بیوسنتز کلسترول با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape ترسیم شده است. رنگ‌بندی ژن‌ها بر اساس سطح تنظیم آن‌ها انجام شده است :

- قرمز: ژن‌های با بیان بالا
- آبی: ژن‌های با بیان پایین
- صورتی و بنفش: ژن‌های با تنظیم متوسط

(ب) شبکه‌ی PPI ژن‌های تنظیم‌شده در مسیر بیوسنتز کلسترول، همراه با تأثیر فعالیت ورزشی.

این شبکه دارای خصوصیات زیر است :

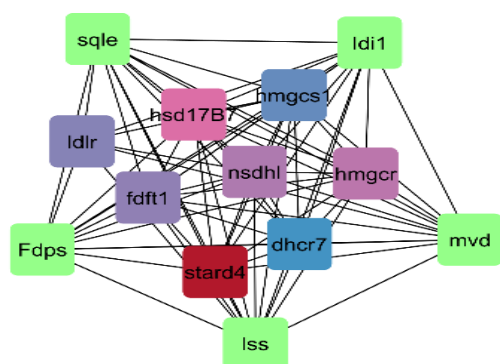
- تعداد گره (گره‌ها): ۱۳
- تعداد یال (ارتباطات): ۷۳
- میانگین تعداد همسایگان: ۱۱,۲۳
- طول مسیر مشخصه: ۱,۰۴
- ضریب خوشه‌بندی: ۰,۴۸
- تراکم: ۰,۴۶

شکل ۲. شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) ژن‌هایی را به تصویر می‌کشد که در مسیر بیوسنتز کلسترول و در پاسخ به فعالیت ورزشی تنظیم می‌شوند. انتخاب آستانه امتیاز اطمینان پایین‌تر به معنای گنجاندن تعامل‌های بیشتری در شبکه است،

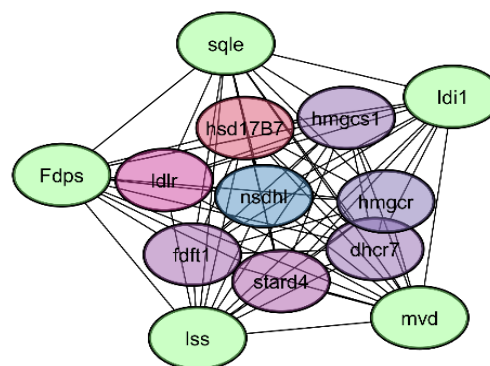
حتی اگر این تعامل‌ها از پشتیبانی ضعیف‌تری در داده‌های پایه برخوردار باشند. این رویکرد می‌تواند برای کاوش تعامل‌های بالقوه بین ژن‌هایی که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند یا دارای سطوح بیان پایین هستند، مفید واقع شود. تعامل‌هایی با امتیاز اطمینان پایین‌تر ممکن است به کشف روابط جدیدی منجر شوند که نیازمند بررسی‌های تکمیلی باشند. این شکل نشان‌دهنده آن است که در شرایط مصرف رژیم پرچرب (HFD)، پروتئین‌های درگیر در سنتز لیپید شبکه‌ای را تشکیل می‌دهند که برای مسیر بیوسنتز کلسترول در کبد ضروری است. به بیان دیگر، این یافته‌ها از مفاهیم نوین نظریه «شبکه برای شبکه» در زمینه تعامل عوامل اپی‌ژنتیکی و میزبان پشتیبانی می‌کنند.

استفاده از الگوریتم‌های متعدد برای شناسایی پروتئین‌های هاب، رویکردی متداول در تحلیل شبکه‌های زیستی است، زیرا این روش به کاهش سوگیری‌های ناشی از یک الگوریتم واحد کمک کرده و اطمینان به نتایج را بهبود می‌بخشد. در مطالعه حاضر، بهره‌گیری از سه الگوریتم متمایز (MNC، DEGREE و MCC) در افزونه Cyto-Hubba برای شناسایی پروتئین‌های هاب، روشی منطقی و جامع تلقی می‌شود. این سه الگوریتم به‌گونه‌ای انتخاب شده‌اند که هر یک از زوایای متفاوتی به شناسایی پروتئین‌های هاب بپردازند و تنوع و دقت نتایج را افزایش دهند: الگوریتم MNC بر اساس حداکثر دسته‌های شبکه، الگوریتم DEGREE بر مبنای تعداد یال‌های متصل به هر گره، و الگوریتم MCC بر اساس تعداد کوتاه‌ترین مسیرهای عبوری از یک گره عمل می‌کنند. استفاده هم‌زمان از این الگوریتم‌ها با رویکردهای متفاوت، امکان ثبت جنبه‌های متنوع ساختاری و FUNCTIONAL شبکه را فراهم می‌کند و به درک جامع‌تری از پروتئین‌های هاب منجر می‌شود (۲۲).

با بهره‌گیری از این سه الگوریتم که در بخش مواد و روش‌ها شرح داده شده‌اند، پنج پروتئین هاب با بالاترین سطح تعاملات و نقش‌های کلیدی در شبکه، از میان تمامی تعاملات پروتئینی شناسایی شدند (شکل ۳). جزئیات مربوط به این پروتئین‌های هاب در جدول ۱ ارائه شده است. همچنین، زیرشبکه تشکیل شده توسط این ژن‌های هاب شناسایی شده در شکل ۳ به نمایش درآمده است.



(ب)



(الف)

شکل ۳. ژن‌های هاب و زیرشبکه ژن‌های تنظیم‌شده بالا و پایین

Figure 3: Hub Genes and Subnetworks of Upregulated and Downregulated Genes

(الف) مسیر بیوسنتز کلسترول،

(ب) بیوسنتز کلسترول همراه با فعالیت ورزشی. این شکل همچنین همسایگان شناخته‌شده این ژن‌ها را بر اساس داده‌های ارائه‌شده در مطالعه ما، با استفاده از افزونه CytoHubba، به تصویر می‌کشد. رنگ سبز نشان‌دهنده ژن‌های هاب، رنگ آبی نمایانگر ژن‌های با تنظیم منفی (پایین)، و رنگ‌های صورتی و بنفش نشان‌دهنده ژن‌های با تنظیم متوسط هستند.

جدول ۱. رتبه بندی ژن‌های هاب شناسایی شده در بیوسنتز کلسترول با استفاده از CytoHubba.

Table 1: Ranking of Hub Genes Identified in Cholesterol Biosynthesis Using CytoHubba

رتبه	ژن	روش رتبه‌بندی	Fold change	توضیحات ژن
۱	fdps	MCC MNS DEGREE	-1.547252226 E -0.458202249	فانسیل پیروفسفات سنتاز؛ آنزیم کلیدی در بیوسنتز ایزوپرنوئید که تشکیل فانسیل دی فسفات (FPP) را کاتالیز می‌کند، پیش‌ساز چندین کلاس از متابولیت‌های ضروری از جمله استرول‌ها، دولی کول‌ها، کاروتنوئیدها و یوبی کینون‌ها. FPP همچنین به‌عنوان سوبسترا برای فانسیلایون پروتئین و ژرانیل ژرانیلایون عمل می‌کند. تراکم پی‌درپی ایزوپنتنیل پیروفسفات را با پیروفسفات‌های آللیک، دی متیل آلیل پیروفسفات و سپس با ژرانیل پیروفسفات حاصل به محصول نهایی فانسیل فانسیل (بر اساس شباهت) کاتالیز می‌کند.
۱	lss	MCC MNS DEGREE	-1.021136106 E -0.226070663	لانوسترول سنتاز؛ چرخه ۲،۳-S (S) اکسی دو سکو ال‌ن را به لانوسترول کاتالیز می‌کند، واکنشی که هسته استرول را تشکیل می‌دهد. از طریق تولید لانوسترول ممکن است تجمع پروتئین عدسی را تنظیم کرده و شفافیت را افزایش دهد.
1	mvd	MCC MNS Degree	-0.787017132 E 0.104553019	دی فسفوموالونات دکربوکسیلاز؛ اولین قدم متعهد در بیوسنتز ایزوپرن‌ها را انجام می‌دهد. متعلق به خانواده دی فسفوموالونات دکربوکسیلاز است.
1	Idi1	MCC MNS Degree	0.92 E -0.185814823	ایزوپنتنیل دی فسفات دلتا ایزومراز ۱؛ بازآرایی ۱،۳-آلیلی ایزوپنتنیل سوبسترای هومولالیک (IPP) را به ایزومر آللیک بسیار الکتروفیل آن، دی متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) کاتالیز می‌کند.
1	sqle	MCC MNS DEGREE	-0.787017132 E 0.104553019	اسکوالن مونواکسیژناز؛ اکسیداسیون stereospecific اسکوالن را به -S (S)-2،3-epoxysqualene کاتالیز می‌کند و به‌عنوان یک آنزیم محدودکننده سرعت در بیوسنتز استروئید در نظر گرفته می‌شود.

E: in Exercis

۳.۳. هستی شناسی ژن و تجزیه و تحلیل غنی سازی مسیر ژن‌های زیرشبکه در بیوسنتز کلسترول و فعالیت

ورزشی

در این مطالعه، ژن‌های زیرشبکه به‌عنوان اجزایی کلیدی در تعامل با ژن‌های هاب، نقش مهمی در تنظیم مسیرهای زیستی و فرایندهای مرتبط با بیوسنتز کلسترول ایفا می‌کنند. به‌منظور شناسایی این مسیرها و فرایندهای بیولوژیکی، از تحلیل

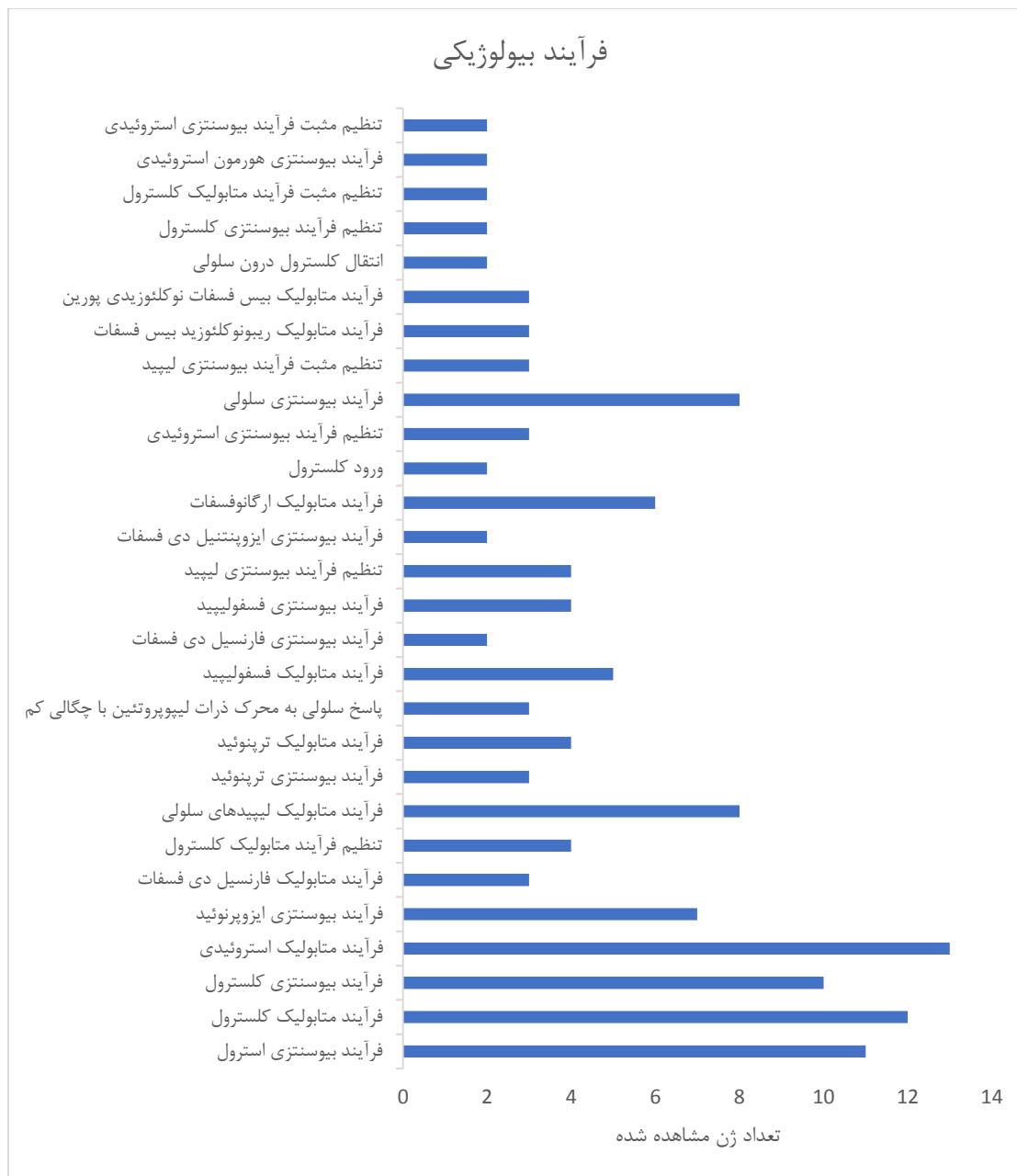
غنی‌سازی مسیرهای GO و KEGG بهره برده‌ایم. اصطلاح GO چارچوبی استاندارد برای توصیف ویژگی‌های مولکولی و بیولوژیکی محصولات ژنی در موجودات زنده است که در آن، مؤلفه‌های اصلی شامل فرایندهای بیولوژیکی^(۱) (BP) و اجزای سلولی^(۲) (CC) بررسی می‌شوند (۲۳).

در پژوهش حاضر، تمرکز ما بر ۱۳ گره منتخب از زیرشبکه ژنی بوده است که در زیست‌شناسی سیستم‌ها نقش حیاتی داشته و در مسیر بیوسنتز کلاسترول با ژن‌های هاب تعامل دارند. یافته‌های این مطالعه می‌توانند زمینه‌ساز تجزیه و تحلیل عمیق‌تر داده‌های ترنسکریپتومیک باشند و با تکیه بر مدل‌سازی شبکه‌های ژنی و تحلیل مسیرهای سیگنالینگ، بینش جامعی از مکانیسم‌های مولکولی ارائه دهند. این رویکرد، به کارگیری ابزارهای پیشرفته بیوانفورماتیکی را جهت کشف تعاملات کلیدی در شبکه‌های ژنی تسهیل می‌کند.

تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های زیرشبکه با استفاده از ابزار مبتنی بر وب STRING و KEGG نشان داد که $\leq 50\%$ ژن‌های مشاهده شده (GO) یافت شده برای BP به طور قابل توجهی در فعالیت‌های مختلف بکار برده شده است (شکل ۴).

۱. توصیف می‌کند که یک ژن در چه فرایندهای زیستی نقش دارد^۱

۲. مشخص می‌کند که یک مولکول زیستی در کدام بخش سلول قرار دارد^۲



شکل ۴. تجزیه و تحلیل غنی سازی هستی شناسی ژن (فرآیند بیولوژیکی) زیر شبکه تعیین شده ژن های هاب در بیوسنتز کلسترول با استفاده از STRING نسخه ۱۲ (<http://string-db.org>).

Figure 4: Gene Ontology Enrichment Analysis (Biological Process) of the Identified Hub Gene Subnetwork in Cholesterol Biosynthesis Using STRING Version 12 (<http://string-db.org>).

همان‌طور که گفتیم بیوسنتز کلسترول یک فرایند متابولیکی پیچیده و چندمرحله‌ای است که در سلول‌های حیوانی، به‌ویژه در کبد و روده، رخ می‌دهد و تحت تأثیر رژیم‌های غذایی پرچرب به طور قابل توجهی تنظیم می‌شود. این فرایند شامل مسیرهای بیوسنتزی استرول‌ها، ایزوپرنوئیدها و ترپنوئیدها است که از واحدهای اولیه استیل کوآنزیم A (استیل-CoA) آغاز شده و از طریق واسطه‌های کلیدی نظیر موالات، ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP)، فارنسیل دی فسفات (FPP) و اسکوالن به تولید کلسترول منجر می‌شود. رژیم‌های غذایی پرچرب، به‌ویژه آن‌هایی که غنی از اسیدهای چرب اشباع و کلسترول خارجی هستند، نه‌تنها ورودی مستقیم کلسترول را افزایش می‌دهند، بلکه تنظیم متابولیکی و بیوسنتزی درون سلولی آن را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند.

بیوسنتز کلسترول فرایندی چندمرحله‌ای است که عمدتاً در شبکه آندوپلاسمی کبد رخ می‌دهد. مراحل اصلی شامل موارد زیر است:

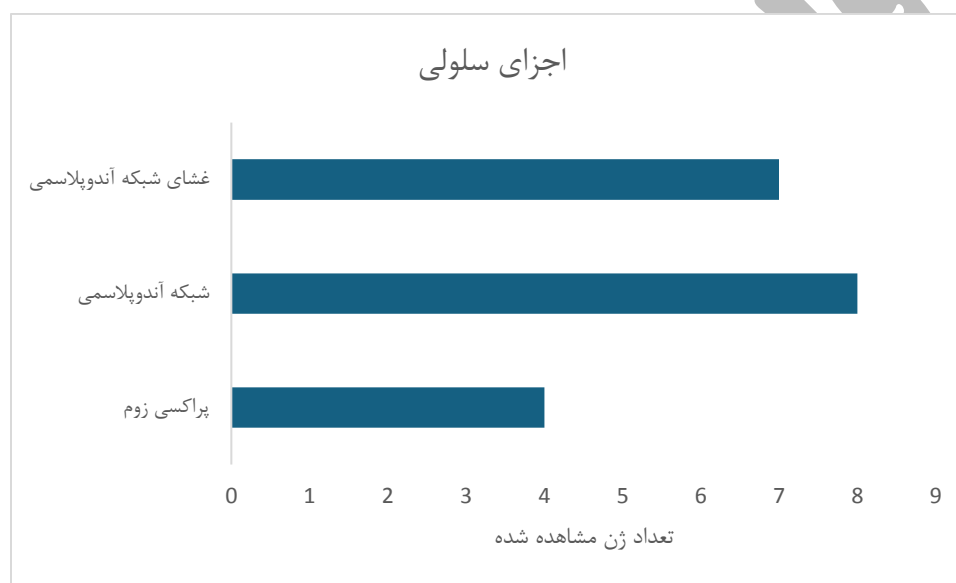
تشکیل موالات _ فرایند بیوسنتزی استرول و فرایند بیوسنتزی کلسترول از تراکم دو مولکول استیل-CoA برای تشکیل استواسیتیل-CoA شروع می‌شود که توسط آنزیم تیوالاز کاتالیز می‌شود. سپس، استواسیتیل-CoA با مولکول سوم استیل-CoA ترکیب شده و ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوئاریل-CoA (HMG-CoA) را تشکیل می‌دهد که توسط HMG-CoA سنتاز کاتالیز می‌شود. گام محدودکننده سرعت، کاهش HMG-CoA به موالات توسط HMG-CoA ردوکتاز (HMGCR) است که در فرایند متابولیک ارگانوفسفات و فرایند بیوسنتزی ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP) نقش دارد. موالات از طریق فسفریلاسیون و دکربوکسیلاسیون به IPP و دی‌متیل آلیل دی فسفات (DMAPP) تبدیل می‌شود که در فرایند بیوسنتزی ایزوپرنوئید و فرایند متابولیک فارنسیل دی فسفات (FPP) دخیل هستند.

این واسطه‌ها به FPP تبدیل می‌شوند که نقطه انشعابی برای بیوسنتز کلسترول و ترپنوئیدها (فرایند بیوسنتزی ترپنوئید و فرایند متابولیک ترپنوئید) است. دو مولکول FPP توسط اسکوالن سنتاز به اسکوالن تبدیل می‌شوند که در فرایند بیوسنتزی سلولی و فرایند متابولیک لیپیدهای سلولی نقش دارد. اسکوالن سپس به لانوسترول تبدیل می‌شود که اولین استرول در مسیر است و به فرایند بیوسنتزی استرول مربوط می‌شود. لانوسترول از طریق واکنش‌های دمتیلاسیون، کاهش و ایزومریزاسیون به کلسترول تبدیل می‌شود که در فرایند متابولیک کلسترول و فرایند بیوسنتزی هورمون استروئیدی نقش دارد. تنظیم فرایند متابولیک کلسترول و فرایند بیوسنتزی کلسترول از طریق مکانیسم‌های پیچیده‌ای؛ مانند کنترل رونویسی توسط پروتئین SREBP-2 انجام می‌شود. در شرایط کمبود کلسترول، SREBP-2 بیان ژن‌هایی مانند HMGCR را افزایش می‌دهد.

همچنین، بازخورد منفی توسط سطح بالای کلسترول، فعالیت HMGCR را مهار می‌کند. پاسخ سلولی به محرک ذرات لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) نیز نقش مهمی دارد. ورود کلسترول از طریق گیرنده‌های LDL باعث کاهش بیوسنتز درون‌زا می‌شود، که در تنظیم فرایند متابولیک کلسترول و تنظیم فرایند بیوسنتزی استروئیدی تأثیر می‌گذارد. فرایند متابولیک فسفولیپید و فرایند بیوسنتزی فسفولیپید با بیوسنتز کلسترول ارتباط نزدیکی دارند، زیرا فسفولیپیدها و کلسترول برای تشکیل غشاهای لیپوپروتئین‌ها ضروری هستند. انتقال کلسترول درون سلولی، که توسط پروتئین‌های حامل مانند STARD تسهیل می‌شود، برای استفاده در بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی (فرایند بیوسنتزی هورمون استروئیدی) و

اسیدهای صفراوی حیاتی است. فرآیندهای مانند متابولیسم ریبونوکلوئید بیس فسفات و متابولیسم بیس فسفات نوکلئوزیدی پورین به طور مستقیم به بیوسنتز کلسترول مرتبط نیستند، اما ممکن است از طریق متابولیسم عمومی و تعاملات غیرمستقیم تأثیر داشته باشند (۲۹-۲۴).

اصطلاحات غالب GO (۵۰٪ ژن مشاهده شده) که برای CC یافت می شود (شکل ۵). این نتیجه نشان داد که ژن های زیرشبکه به بخش های غشای شبکه آندوپلاسمی، شبکه آندوپلاسمی و پراکسی زوم های سلول مرتبط هستند.



شکل ۵. تجزیه و تحلیل غنی سازی هستی شناسی ژن (جزء سلولی) زیرشبکه های تعیین شده ژن های هاب در بیوسنتز کلسترول با استفاده از STRING نسخه ۱۲ (<http://string-db.org>)

Figure 5: Gene Ontology Enrichment Analysis (Cellular Component) of the Identified Hub Gene Subnetworks in Cholesterol Biosynthesis Using STRING Version 12 (<http://string-db.org>)

فرایند بیوسنتز کلسترول در سلول های کبدی به صورت مشترک بین شبکه آندوپلاسمی (ER) و پراکسی زوم ها انجام می شود و غشای شبکه آندوپلاسمی نقشی کلیدی در سازمان دهی آنزیم ها و انتقال واسطه ها دارد. در ادامه، نقش هر یک از این اجزا رو به صورت تخصصی بررسی می کنیم.

شبکه آندوپلاسمی، به ویژه بخش صاف آن (Smooth ER)، مرکز اصلی بیوسنتز کلسترول در کبد است. این اندامک غشایی که از کیسه ها و لوله های بهم پیوسته تشکیل شده، محل استقرار آنزیم های کلیدی مسیر (Mevalonate Pathway) است؛ مسیری که از استیل کوآنزیم A شروع می شود و به تولید کلسترول منجر می شود. آنزیم HMG-CoA (3-ردوکتاز-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase) که مرحله محدودکننده این مسیر محسوب می شود، به غشای ER متصل است و فعالیتش به طور دقیق توسط بازخوردهای متابولیکی تنظیم می شود. شبکه آندوپلاسمی صاف

همچنین در سنتز واسطه‌های لیپیدی مثل ایزوپرنوئیدها (مانند فارنزیل پیروفسفات) نقش دارد که پیش‌سازهای کلسترول هستند (۳۰).

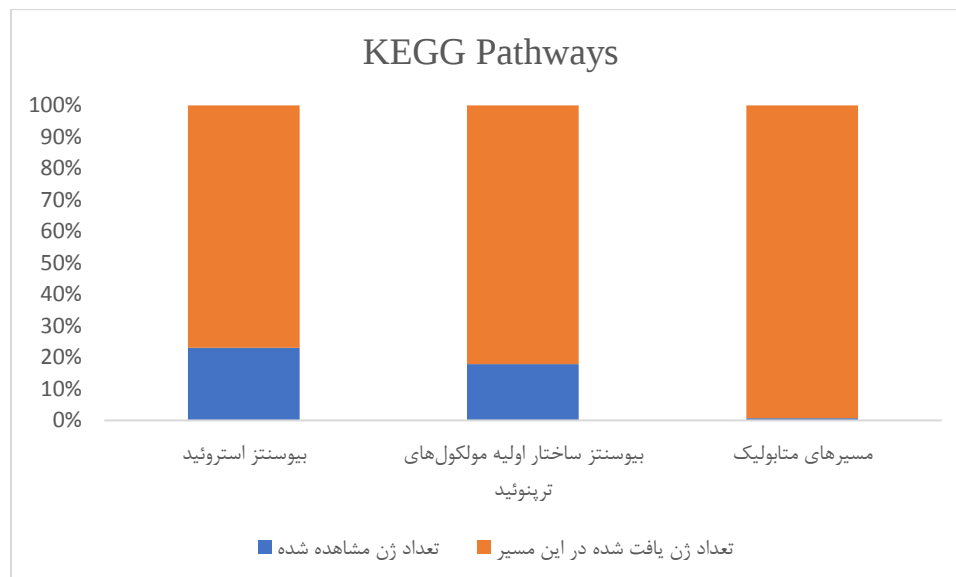
غشای شبکه آندوپلاسمی به‌عنوان یک بستر لیپیدی پویا عمل می‌کند که آنزیم‌های بیوسنتز کلسترول را تثبیت کرده و دسترسی آن‌ها به سوبستراهای محلول در چربی را تسهیل می‌کند. این غشا که از فسفولیپیدها و پروتئین‌های خاص تشکیل شده، محیطی آب‌گریز فراهم می‌کند که برای واکنش‌های متابولیکی لیپید محور ضروری است. علاوه بر این، غشای ER از طریق تعامل با پراکسی‌زوم‌ها، انتقال واسطه‌ها و تنظیم دینامیک لیپیدی را پشتیبانی می‌کند. برای مثال، پروتئین‌های متصل به غشا مانند SREBP با حس کردن سطح کلسترول در غشا، بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز کلسترول را تنظیم می‌کنند (۳۱).

پراکسی‌زوم‌ها، اندامک‌های تک غشایی کوچک‌تر از میتوکندری، در مراحل ابتدایی بیوسنتز کلسترول نقش دارند و مکمل عملکرد شبکه آندوپلاسمی هستند. این اندامک‌ها حاوی آنزیم‌هایی مثل آسیل‌کوآ اکسیداز هستند که در اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره بلند مشارکت می‌کنند و استیل‌کوآ (واحد سازنده کلسترول) را تأمین می‌کنند. علاوه بر این، پراکسی‌زوم‌ها در سنتز واسطه‌های ایزوپرنوئیدی، به‌ویژه در تبدیل مولات به ایزوپنتیل پیروفسفات، نقش دارند. ارتباط فیزیکی و عملکردی بین پراکسی‌زوم و ER از طریق نقاط تماس غشایی (Membrane Contact Sites) برقرار می‌شود که انتقال سریع متابولیت‌ها را ممکن می‌سازد (۳۲).

بنابراین، در کبد، بیوسنتز کلسترول یک همکاری دقیق بین پراکسی‌زوم و شبکه آندوپلاسمی است. پراکسی‌زوم‌ها با تولید استیل‌کوآ و واسطه‌های اولیه، مواد خام را تأمین می‌کنند، درحالی‌که شبکه آندوپلاسمی صاف این مواد را از طریق مسیر مولونات به کلسترول تبدیل می‌کند. غشای شبکه آندوپلاسمی نه تنها محل انجام واکنش‌هاست، بلکه با تنظیم سیالیت و ترکیب لیپیدی خود، کارایی آنزیم‌ها را بهینه می‌کند. این فرایند در کبد حیاتی است، زیرا کلسترول سنتز شده یا به‌عنوان جزء غشای پلاسمایی استفاده می‌شود، یا به اسیدهای صفراوی تبدیل شده و در متابولیسم چربی‌ها نقش بازی می‌کند (۳۳).

به‌منظور بررسی عملکردها و مسیرهای بیولوژیکی کلیدی دخیل در بیوسنتز کلسترول، از غنی‌سازی ژن‌های زیرشبکه‌ها بر اساس پایگاه‌داده KEGG استفاده شد. پایگاه‌داده KEGG به‌عنوان یک ابزار جامع، امکان تخصیص مسیرهای متابولیکی خاص به گروه‌های ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) را فراهم می‌کند و داده‌های امیکس (omics) را به اطلاعات عملکردی در سطح بالاتر پیوند می‌دهد. این رویکرد تحلیلی، نقش محوری مسیرهای متابولیکی در سنتز کلسترول را آشکار کرد و ارتباطات پیچیده بین ژن‌ها و فرایندهای بیوشیمیایی را برجسته نمود (۳۴).

نتایج تحلیل غنی‌سازی نشان داد که مسیرهای اصلی درگیر در بیوسنتز کلسترول شامل مسیرهای متابولیک عمومی، بیوسنتز ساختار اصلی ترپنوئیدها و بیوسنتز استروئیدها هستند. این مسیرها به ترتیب مراحل تولید پیش‌سازهای ایزوپرنوئیدی، تبدیل آن‌ها به واسطه‌های استروئیدی و نهایتاً سنتز کلسترول را در بر می‌گیرند. تجزیه و تحلیل مبتنی بر KEGG که در شکل ۶ ارائه شده است، ارتباطات عملکردی و سلسله‌مراتبی بین این مسیرها را به‌صورت بصری نمایش می‌دهد و بر اهمیت آن‌ها به‌عنوان محورهای تنظیم‌کننده متابولیسم لیپیدی تأکید دارد.



شکل ۶. مسیرهای بیولوژیکی شناسایی شده بر اساس دایره المعارف ژن ها و ژنوم های کیوتو (KEGG) روی ژن های زیرشبکه ژن های هاب در بیوسنتز کلسترول با استفاده از STRING نسخه ۱۲ (<http://string-db.org>)

Figure 6: Biological Pathways Identified Based on the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) for Hub Gene Subnetworks in Cholesterol Biosynthesis Using STRING Version 12 (<http://string-db.org>)

اکثر ژن های هاب فهرست شده در جدول ۱ به طور برجسته در مسیرهای مرتبط با بیوسنتز استروئیدها مشارکت دارند. تحلیل غنی سازی مبتنی بر پایگاه داده KEGG اهمیت عملکردی این ژن ها را تأیید کرد و الگوهای مسیرهای اصلی دخیل را، همان طور که در شکل ۵ ارائه شده، به وضوح نشان داد. یکی از مسیرهای کلیدی شناسایی شده، بیوسنتز ساختار اصلی ترپنوئیدها است که نقش اساسی در تولید پیش سازهای ایزوپرنوئیدی مورد نیاز برای سنتز کلسترول ایفا می کند. این مسیرها به عنوان محورهای مرکزی در تنظیم متابولیسم استروئیدی و لیپیدی شناخته می شوند.

علاوه بر این، برای اعتبارسنجی یافته های حاصل از تحلیل های غنی سازی (GO) و KEGG، یک تحلیل خوشه بندی شبکه (Network Clustering Analysis) انجام شد. این رویکرد امکان شناسایی خوشه های ژنی به هم پیوسته و مرتبط از نظر عملکردی را فراهم کرد و درک جامع تری از تعاملات پیچیده درون شبکه های ژنی دخیل در بیوسنتز کلسترول ارائه داد. نتایج این تحلیل، هم راستایی قوی بین ژن های هاب و مسیرهای متابولیکی کلیدی را تأیید نمود و بر نقش هماهنگ آن ها در تنظیم این فرایند بیوشیمیایی تأکید کرد.

۳،۴. تجزیه و تحلیل خوشه ای شبکه

تحلیل خوشه بندی شبکه های بیولوژیکی یکی از استراتژی های کلیدی برای شناسایی الگوهای عملکردی، پیش بینی کمپلکس های پروتئینی و کشف بیومارکرهای شبکه ای است که ساختار و سازمان دهی این شبکه ها را آشکار می کند. استفاده

از الگوریتم‌های خوشه‌بندی، مانند آن‌هایی که در ابزار CytoCluster پیاده‌سازی شده‌اند، به نیازهای خاص تحقیق وابسته است. در این مطالعه، از شش الگوریتم خوشه‌بندی بهره گرفته شد که یکی از آن‌ها، الگوریتم IPCA، به‌عنوان یک روش مبتنی بر چگالی است. این الگوریتم زیرگراف‌های متراکم را در شبکه‌های تعامل پروتئین - پروتئین (PPI) شناسایی می‌کند و امکان تحلیل دقیق‌تر کمپلکس‌های مولکولی را فراهم می‌سازد.

در الگوریتم IPCA، وزن هر یال (Edge) بر اساس تعداد همسایه‌های مشترک بین دو گره متصل به آن (Common Neighbors) محاسبه می‌شود. سپس، وزن هر گره از طریق مجموع وزن یال‌های متصل به آن تعیین می‌گردد. این وزن گره به‌عنوان معیاری برای شناسایی هسته‌های اولیه در شبکه عمل می‌کند. فرایند خوشه‌بندی با انتخاب یک گره هسته آغاز می‌شود که به‌عنوان نقطه شروع یک خوشه در نظر گرفته می‌شود. در ادامه، با استفاده از رویکرد بازگشتی IPCA، گره‌های همسایه بر اساس اولویت وزنشان به خوشه اضافه می‌شوند. معیارهای افزودن یک گره به خوشه شامل دو شرط اصلی است: (الف) احتمال تعامل گره با اعضای موجود در خوشه (Interaction Probability) و (ب) طول کوتاه‌ترین مسیر (Shortest Path Length) بین گره مورد نظر و گره‌های داخل خوشه. این شروط تضمین می‌کنند که خوشه‌ها از نظر عملکردی مرتبط و از نظر ساختاری منسجم باشند (۱۵).

در این مطالعه، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای زیرشبکه ۱۳ خوشه به دست آمد که از بین آنها خوشه با رتبه‌بندی ۱ انتخاب کردیم (جدول ۲). مسیرهای مشترک برای خوشه شامل بیوسنتز استروئید، بیوسنتز ساختار اولیه مولکول‌های ترپنوئید و مسیرهای متابولیک است. همپوشانی بین ژن‌های شمارش شده در مسیرهای KEGG و نتیجه تجزیه و تحلیل خوشه ای تایید کرد که سه مسیر، مسیر اصلی در بیوسنتز کلسترول هستند. تجزیه و تحلیل شبکه با استفاده از داده های RNA-Seq و خوشه بندی به ما کمک کرده است تا مهمترین آنها را در پاسخ به بیوسنتز کلسترول نشان دهیم.

جدول ۲. خلاصه خوشه ها (رتبه ۱) حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه ای از زیرشبکه ژن های هاب بیان شده در بیوسنتز کلسترول با استفاده از برنامه CytoCluster.

Table 2: Summary of Clusters (Rank 1) Resulting from Cluster Analysis of Hub Gene Subnetworks Expressed in Cholesterol Biosynthesis Using the CytoCluster Program

خوشه	رتبه	گره	تعامل (یال)	عملکرد
1	1	1۳	۷۳	بیوسنتز استروئید بیوسنتز ساختار اولیه مولکول‌های ترپنوئید مسیرهای متابولیک

بحث و نتیجه‌گیری

۴.۱ بیوسنتز کلسترول

بیوسنتز کلسترول در کبد، فرایندی حیاتی برای حفظ همئوستاز لیپیدی و تولید اجزای ساختاری غشاهای و پیش‌سازهای هورمونی است که عمدتاً از طریق مسیر موالونات در شبکه آندوپلاسمی صاف و پراکسی‌زوم‌ها انجام می‌شود. ژن‌های *Idi1*، *Fdps*، *Stard4*، *Hmgcs1*، *Hmgcr*، *Hsd17B7*، *Lss*، *Sqle*، *Nsdhl*، *Mvd*، *Dhcr7*، *Ldlr* و *Fdft1* در این مسیر نقش‌های متنوع و مکمل ایفا می‌کنند که در ادامه به طور جامع بررسی می‌شوند.

همان‌طور که گفتیم مسیر بیوسنتز کلسترول از استیل کوآنزیم A آغاز می‌شود، جایی که *Hmgcs1* دو مولکول استیل کوآ را به آستوآستیل کوآ و سپس به *HMG-CoA* تبدیل می‌کند. این مرحله توسط *Hmgcr* دنبال می‌شود که *HMG-CoA* را به مولات کاهش می‌دهد؛ واکنشی که به‌عنوان مرحله محدودکننده و هدف اصلی استاتین‌هاست. موالونات سپس توسط *Mvd* به ایزوپنتیل پیروفسفات *IPP* تبدیل می‌شود. ژن *Idi1*، *IPP* را به *DMAPP* ایزومریزه می‌کند، درحالی‌که *Fdps* این مولکول‌ها را به *FPP* تبدیل می‌کند که پیش‌ساز کلیدی ترپنوئیدهاست (۳۵، ۳۶). در ادامه، *Fdft1* دو مولکول *FPP* را به اسکوالن متصل می‌کند که توسط *Sqle* به ۲،۳-اکسیداسکوالن اکسید می‌شود. این مولکول سپس توسط *Lss* به لانوسترول سیکل می‌شود که اولین استروئید در مسیر است. تبدیل لانوسترول به کلسترول شامل چندین واکنش متوالی است که ژن‌های *Hsd17B7*، *Nsdhl* و *Dhcr7* در آن دخیل هستند. به‌ویژه، *Dhcr7* مرحله نهایی را کاتالیز می‌کند و ۷-دهیدروکلسترول را به کلسترول تبدیل می‌کند؛ نقص در این ژن با اختلالات متابولیکی مرتبط است (۳۷، ۳۸).

علاوه بر این ژن *Stard4* در انتقال کلسترول درون سلولی نقش دارد و توزیع آن را بین اندامک‌ها تنظیم می‌کند که برای دسترسی به مسیر بیوسنتز حیاتی است. در مقابل *Ldlr* بیشتر در جذب کلسترول خارجی از خون دخیل است و از طریق بازخورد منفی، بیان ژن‌های بیوسنتزی مانند *Hmgcr* را تنظیم می‌کند. انتخاب ژن‌های *Idi1*، *Fdps*، *Stard4*، *Hmgcs1*، *Hmgcr*، *Hsd17B7*، *Lss*، *Sqle*، *Nsdhl*، *Mvd*، *Dhcr7* و *Ldlr* برای مطالعه بیوسنتز کلسترول کبدی مبتنی بر نقش‌های محوری آن‌ها در مسیر موالونات و تنظیم همئوستاز لیپیدی است. این ژن‌ها به‌طور استراتژیک در مراحل مختلف این مسیر، از تولید پیش‌سازهای اولیه تا سنتز نهایی کلسترول، قرار دارند و تعاملات پیچیده آن‌ها در شبکه‌های متابولیکی کبد را نمایان می‌کنند. انتخاب این مجموعه ژن‌ها بر اساس تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، مانند غنی‌سازی مسیرهای *GO*، *KEGG* و همچنین داده‌های تجربی از مطالعات اخیر صورت گرفته که نشان‌دهنده نقش حیاتی آن‌ها در متابولیسم لیپیدها و پتانسی آن‌ها به‌عنوان اهداف درمانی در اختلالات کلسترول است. علاوه بر این این ژن‌ها به‌دلیل پوشش کامل مراحل بیوسنتز کلسترول انتخاب شدند. این انتخاب نه تنها نمایانگر یک دید جامع از مسیر است، بلکه امکان مطالعه تعاملات سیستمی و شناسایی نقاط کنترل کلیدی را فراهم می‌کند (۴۱-۳۹).

ژن‌های *Idi1*، *Mvd*، *Fdps*، *Lss* و *Sqle* به‌عنوان ژن‌های هاب شناسایی شدند، زیرا در تحلیل شبکه‌های تعامل پروتئین - پروتئین (*PPI*) و غنی‌سازی مسیرها، درجه اتصال بالا (*High Degree of Connectivity*) و نقش مرکزی در تنظیم بیوسنتز کلسترول نشان داده‌اند. ژن‌های هاب معمولاً در شبکه‌های بیولوژیکی به‌عنوان گره‌هایی با تعداد بالای تعاملات شناخته می‌شوند که حذف آن‌ها می‌تواند ساختار شبکه را به طور قابل توجهی مختل کند (۴۵-۴۲).

۴,۲ تاثیر فعالیت ورزشی بر بیوسنتز کلاسترول

تنظیم بیوسنتز کلاسترول تحت تاثیر ورزش

بیوسنتز کلاسترول در کبد یک فرآیند پیچیده و به دقت تنظیم شده است که به شدت تحت تاثیر فعالیت بدنی قرار می‌گیرد. تحقیقات نشان می‌دهد که تمرینات طولانی مدت (چه هوازی و چه مقاومتی) می‌توانند بیان ژن‌های کلیدی این مسیر را به طور قابل توجهی تغییر دهند: تمرینات استقامتی (%۸۰-۶۰ حداکثر ضربان قلب، ۱۵۰ دقیقه/هفته) بیان HMGCR را تا ۴۰٪ کاهش می‌دهند. این کاهش عمدتاً از طریق فعال سازی مسیر AMPK رخ می‌دهد که با فسفوریلاسیون HMGCR در سرین-۸۷۲، فعالیت آن را مهار می‌کند. از طرفی تمرینات مقاومتی (70-85% 1RM، ۳ جلسه/هفته) بیان SREBP-2 را تا ۳۵٪ کاهش می‌دهند و در نتیجه ترانس کریپشن ژن‌های پایین دست مانند Hmgcs1 و Fdps را مهار می‌کنند (۴۶-۴۸).

پاسخ دوگانه به ورزش: حاد و مزمن

مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که پاسخ ژن‌های بیوسنتز کلاسترول به ورزش به شدت و مدت آن بستگی دارد. ورزش مزمن منجر به کاهش پایدار بیان ژن‌هایی مانند Hmgcr, Hmgcs1, Mvd, Idi1, Fdps, Sqle, Lss و Dhcr7 به دلیل بهبود متابولیسم لیپیدی و کاهش نیاز به سنتز کلاسترول می‌شود. از طرفی ورزش حاد یا شدید منجر به افزایش موقت بیان این ژن‌ها برای تأمین نیازهای ترمیم غشا و تولید هورمون‌های استروئیدی می‌شود. این دوگانگی نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری مسیر موالونات در پاسخ به استرس‌های فیزیولوژیکی است (۴۹-۵۱).

ژن‌های هاب و نقش محوری آن‌ها در سازگاری ورزشی

تحلیل‌های شبکه‌ای نشان می‌دهند که برخی ژن‌ها به دلیل موقعیت مرکزی در مسیر متابولیک، تأثیرپذیری بیشتری از ورزش دارند. به عنوان مثال Fdps و Idi1 نه تنها برای کلاسترول، بلکه برای سنتز کوآنزیم Q10 (ضروری برای تولید انرژی میتوکندریایی) حیاتی است. Mvd تنظیم کننده اصلی ورود به مسیر ایزوپرنوئیدها. Sqle و Lss کاتالیزورهای مراحل کلیدی تبدیل اسکوالن به لانوسترول هستند. مطالعات نشان داده‌اند که این ژن‌های هاب در پاسخ به ورزش به عنوان گره‌های کلیدی عمل می‌کنند و تعادل متابولیکی را در شرایط مختلف ورزشی حفظ می‌نمایند (۴۹-۵۱). به عنوان مثال، ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) می‌تواند بیان Sqle و Lss را تا ۵۰٪ کاهش دهد (۵۲).

پیامدهای بالینی و راهکارهای تمرینی

یکی از راه‌های تمرینی ترکیب تمرینات با یکدیگر است. پروتکل‌های ترکیبی (۳ جلسه هوازی + ۲ جلسه مقاومتی در هفته) همزمان هم سنتز کلاسترول را کاهش می‌دهند و هم جذب آن را از طریق افزایش LDLR بهبود می‌بخشند (۳). راه دیگر

مدیریت شدت تمرین است. در افراد با هایپرکلسترولمی خانوادگی (FH)، تمرینات با شدت متوسط (۴۰-۶۰٪ حداکثر ضربان قلب) برای جلوگیری از افزایش موقت سنتز کلسترول توصیه می‌شود و در نهایت تاثیرات سازوکارهای اپیژنتیک است. اخیراً مشخص شده که ورزش می‌تواند از طریق تغییرات متیلاسیون DNA در پروموتور ژن‌هایی مانند HMGCR، اثرات بلندمدت بر متابولیسم کلسترول داشته باشد (۵۳-۵۵).

بنابراین، فعالیت ورزشی از طریق مکانیسم‌های چندگانه (کاهش بیان ژن‌های سنتز کلسترول، افزایش جذب LDL، و تنظیم اپیژنتیک) بر هموستاز کلسترول تأثیر می‌گذارد. درک این مکانیسم‌ها می‌تواند به طراحی برنامه‌های ورزشی شخصی‌سازی شده برای مدیریت دیس لیپیدمی کمک کند.

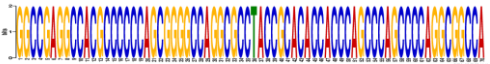
۴،۳ تجزیه و تحلیل موتیف پروموتور ژن هاب

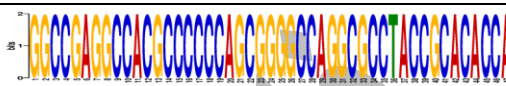
UFRs (1kbp) ژن هاب برای کشف نقوش حفظ شده و عناصر نظارتی مشترک سیس (CREs) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. UFRها از Ensemble Plants بازیابی شدند. با استفاده از MEME، شش موتیف قابل توجه با طول‌های ۱۱ تا ۲۹ جفت باز در پروموتورهای ژن‌ها کشف شد. چندین عملکرد بیولوژیکی با تجزیه و تحلیل GOMo برای نقوش فاکتور رونویسی (TFs) از جمله BP، MF، و CC شناسایی شد. GO نشان داد که این CREها در اتصال یون روی و ATP که احتمالاً در فرآیندهای تولید انرژی و سیگنالینگ داخل سلول و تنظیم رونویسی نقش دارند.

این یافته‌ها درک ما از تنظیم ژن‌های مسیر بیوسنتز کلسترول را عمیق‌تر می‌کند و می‌تواند به شناسایی اهداف جدید برای مداخلات متابولیکی منجر شود. CREs نقاطی از DNA هستند که توسط عوامل نظارتی (TFs) شناخته می‌شوند و به تنظیم فعالیت ژن‌ها کمک می‌کنند. تحلیل CREها به شناسایی نقاط اتصال فاکتورهای رونویسی و نحوه هماهنگی بیان ژن‌های کلیدی در بیوسنتز کلسترول کمک می‌کند. این اطلاعات می‌تواند به شناسایی اهداف دارویی جدید برای دیس لیپیدمی کمک کند، مثلاً باهدف قراردادن CREها برای تغییر بیان ژن‌ها. همچنین، این تحلیل نشان می‌دهد که ژن‌های هاب ممکن است به صورت گروهی تنظیم شوند که برای پاسخ‌های متابولیکی در شرایط مختلف حیاتی است.

جدول ۳: موتیف‌های حفاظت‌شده شناسایی‌شده در پروموتورهای ژن‌های هاب DEGs بر اساس آنالیز MEME

Table 3: Conserved Motifs Identified in the Promoters of Hub Genes (DEGs) Based on MEME Analysis

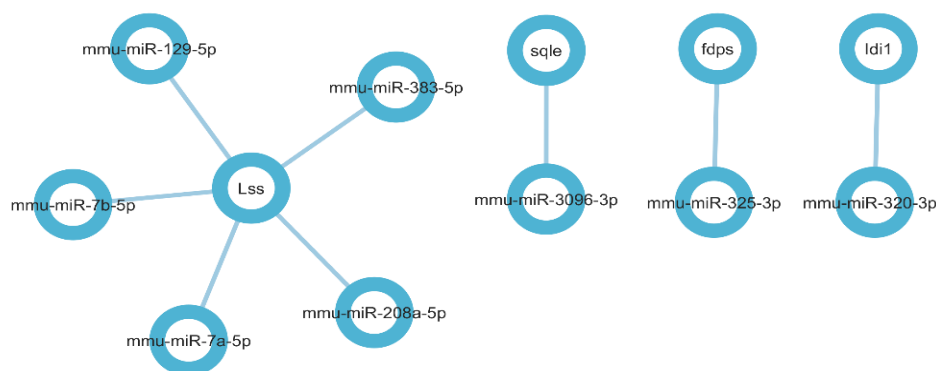
موتیف	لوگو	عرض	پیش بینی خاص 5
MA0741.1		980	BP transcription MF ATP binding MF zinc ion binding BP positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter BP negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
MA1890.1		974	BP transcription MF ATP binding

MF zinc ion binding		
BP positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter		
BP negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter		
BP transcription	980	
MF ATP binding		
MF zinc ion binding		
BP positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter		
BP negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter		
BP negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter		

۴,۴ شناسایی miRNA هایی که ژن هاب را هدف قرار می دهند

برای بررسی تعاملات نظارتی احتمالی بین ژن های هاب و میکرو RNA ها از تحلیل جامع بیوانفورماتیکی استفاده شد. در ابتدا، نواحی ۳' غیرترجمه شده (UTRs) ژن های هاب از پایگاه داده (Ensembl نسخه ۱۱۰، <http://asia.ensembl.org>) استخراج شدند. سپس، پیش بینی اهداف miRNA با استفاده از ابزار (TargetScan نسخه ۸، <http://www.targetscan.org>) که به طور گسترده برای شناسایی سایت های اتصال miRNA در پستانداران به کار می رود، انجام شد. توالی های ۳' UTR ژن های هاب در برابر پایگاه داده موش TargetScan (Mus musculus) بررسی شدند و تمرکز بر خانواده های miRNA های با درجه تعامل بالا بود. پارامترهای TargetScan به گونه ای تنظیم شد که تعاملات با اطمینان بالا را اولویت دهد و سایت هایی با هم خوانی های با درصد بالای ۹۰ انتخاب شدند. برای اعتبارسنجی تعاملات پیش بینی شده miRNA-هدف، از پایگاه داده miRTarBase (نسخه ۲۰۲۵، <http://mirtarbase.cuhk.edu.cn>) استفاده شد. در نهایت، شبکه تعاملات miRNA-ژن های هاب با استفاده از نرم افزار (Cytoscape نسخه ۳,۱۰، <https://cytoscape.org>) ساخته شد.

miRNA ها به عنوان تنظیم کننده های کلیدی بیان ژن در سطح پسا - ترانسکریپتومی شناخته می شوند و نقش مهمی در متابولیسم لیپیدها و هومئوستاز کلسترول دارند. این تحلیل نه تنها درک ما از مکانیسم های تنظیم ژنی را عمیق تر می کند، بلکه پتانسیل توسعه استراتژی های درمانی نوآورانه را فراهم می آورد. این تنظیم می تواند نقاط کلیدی برای مداخلات دارویی فراهم کند، به ویژه برای درمان هایی که هدفشان کاهش سطح کلسترول در دیس لیپیدمی است. با شناسایی miRNA هایی که ژن های هاب را هدف قرار می دهند، می توان آنتاگونیست ها یا آگونیست های miRNA را طراحی کرد تا بیان ژن ها را به صورت هدفمند تغییر دهد.



شکل ۷. شبکه تعاملات پیش‌بینی شده بین ژن‌های هاب و miRNA ها در Mus musculus. ساخته شده با Cytoscape

Figure 7: Predicted Interaction Network Between Hub Genes and miRNAs in Mus musculus, Constructed Using Cytoscape

پیام مقاله

این مطالعه با شناسایی و تحلیل پنج ژن هاب در بیوسنتز کلسترول، درک ما از شبکه‌های تنظیم ژنی و نقش ER سلولی را عمیق‌تر کرد. تحلیل GO و KEGG نشان داد که این ژن‌ها در فرایندهای متابولیکی کلیدی دخیل‌اند و پتانسیل بالایی برای مدیریت بیماری‌های مرتبط با اختلال در بیوسنتز کلسترول دارند. تعامل پویا بین بیوسنتز کلسترول و فعالیت ورزشی می‌تواند به عنوان استراتژی‌ای برای کنترل مؤثر این فرایند استفاده شود، و ژن‌های شناسایی شده به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی امیدوارکننده برای بیماری‌های متابولیکی مطرح هستند. این یافته‌ها پایه‌ای برای تحقیقات آینده در توسعه درمان‌های نوآورانه و مدیریت اختلالات لیپیدی فراهم می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه اصفهان (کد اخلاق: IR.UI.REC.1403.005) تأیید شده است.
<https://ethics.research.ac.ir/EthicsProposalView.php?id=455176>

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، جمع‌آوری داده‌ها، نگارش مقاله: میلاد عبداللہی

مدیر پروژه، بررسی و ویرایش: سید محمد مرندي

تحلیل، بررسی و ویرایش داده‌ها: زهرا صفایی‌نژاد

بررسی ادبیات، بررسی و ویرایش: محمد حسین نصر اصفهانی

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

ما صمیمانه از پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی به خاطر حمایت‌های بی دریغ در انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی کنیم.

منابع

- 1.Wang L, Duan W, Ruan C, Liu J, Miyagishi M, Kasim V, Wu S. YY2-CYP51A1 signaling suppresses hepatocellular carcinoma progression by restraining de novo cholesterol biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2025;1871.۱۶۷۶۵۸:(۳)
- 2.Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell*. 2015;161(1):161-72.
- 3.Mann S, Beedie C, Jimenez A. Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. *Sports medicine*. 2014;44:211-21.
- 4.Noubiap JJN, Nansseu JRN, Bigna JJR, Jingi AM, Kengne AP. Prevalence and incidence of dyslipidaemia among adults in Africa: a systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ open*. 2015;5(3):e007404.
۵. تیموری، عجمی، شاکریان، ساره، عبدالحی. بررسی وضعیت بیماری‌های غیرواگیر و الگوی غذایی بیماران مبتلا به اختلالات چربی خون در شهر الوند. *مجله اپیدمیولوژی ایران*. ۲۰۲۴;۲۰(۲):۱۰۶-۱۷.
- 6.Brooks GA, Fahey TD, Baldwin KM. *Exercise physiology: human bioenergetics and its applications*. 2005.
- 7.Liu C, Chen H, Hu B, Shi J, Chen Y, Huang K. New insights into the therapeutic potentials of statins in cancer. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14:118892.۶
- 8.Kenney WL, Wilmore JH, Costill DL. *Physiology of sport and exercise: Human kinetics*; 2022.
- 9.Smart NA, Downes D, Van Der Touw T, Hada S, Dieberg G, Pearson MJ, et al. The effect of exercise training on blood lipids: a systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*. 2024:1-12.
- 10.Long T, Debler EW, Li X. Structural enzymology of cholesterol biosynthesis and storage. *Current opinion in structural biology*. 2022;74:102369.
- 11.Duan Y, Gong K, Xu S, Zhang F, Meng X, Han J. Regulation of cholesterol homeostasis in health and diseases: from mechanisms to targeted therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1):265. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01125-5>.
- 12.Shi Q, Chen J, Zou X, Tang X. Intracellular cholesterol synthesis and transport. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10:819281.
- 13.Xie H, Weinstein H. Recognition of Specific Pip2-Subtype Composition Triggers the Allosteric Control Mechanism for Selective Membrane Targeting of Cargo Loading and Release Functions of the Intracellular Sterol Transporter Stard4. Available at SSRN 5071483. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.5071483>

- 14.Kumar R, Chhillar N, Gupta DS, Kaur G, Singhal S, Chauhan T. Cholesterol homeostasis, mechanisms of molecular pathways, and cardiac health: a current outlook. *Current Problems in Cardiology*. 2024;49(1):102081.
- 15.Li M, Li D, Tang Y, Wu F, Wang J. CytoCluster: a cytoscape plugin for cluster analysis and visualization of biological networks. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(9):1880. <https://doi.org/10.3390/ijms18091880>
- 16.Ma Y, Kan C, Qiu H, Liu Y, Hou N, Han F, et al. Transcriptomic analysis reveals the protective effects of empagliflozin on lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:793586.
- 17.Arivazhagan L, Delbare S, Wilson RA, Manigrasso MB, Zhou B, Ruiz HH, et al. Sex differences in murine MASH induced by a fructose-palmitate-cholesterol-enriched diet. *JHEP Reports*. 2025;7(2):101222.
- 18.Wang W, Chen Y, Bai L, Zhao S, Wang R, Liu B, et al. Transcriptomic analysis of the liver of cholesterol-fed rabbits reveals altered hepatic lipid metabolism and inflammatory response. *Scientific Reports*. 2018;8(1):6437.
- 19.Cheng CW, Pedicini L, Alcala CM, Deligianni F, Smith J, Murray RD, et al. RNA-seq analysis reveals transcriptome changes in livers from Efcab4b knockout mice. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2025;41:101944. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2025.101944>
- 20.Melo L, Hagar A, Klaunig J. Gene expression signature of exercise and change of diet on non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Comparative Exercise Physiology*. 2022;18(2):143-54. <https://doi.org/10.3920/CEP210033>
- 21.Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*. 2011;27(3):431-2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq675>
- 22.Chin C-H, Chen S-H, Wu H-H, Ho C-W, Ko M-T, Lin C-Y. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC systems biology*. 2014;8:1-7. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-S4-S11>
- 23.Yon Rhee S, Wood V, Dolinski K, Draghici S. Use and misuse of the gene ontology annotations. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(7):509-15. <https://doi.org/10.1038/nrg2363>
- 24.Aguilera-Olguín M, Leiva A. The LDL receptor: Traffic and function in trophoblast cells under normal and pathological conditions. *Placenta*. 2022;127:12-9.
- 25.Zhou F, Sun X. Cholesterol metabolism: a double-edged sword in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:762828.
- 26.Zhao Z, Li B, Chen Q, Xiang X, Xu X, Han S, et al. Dietary palm oil enhances Sterol regulatory element-binding protein 2-mediated cholesterol biosynthesis through inducing endoplasmic reticulum stress in muscle of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *British Journal of Nutrition*. 2024;131(4):553-66.
- 27.Xia Q, Lu F, Chen Y, Li J, Huang Z, Fang K, et al. 6-Gingerol regulates triglyceride and cholesterol biosynthesis to improve hepatic steatosis in MAFLD by activating the AMPK-SREBPs signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024;170:116060. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.116060>
- 28.Dao W, Chen H, Ouyang Y, Huang L, Fan X, Miao Y. Molecular Characteristics and Role of Buffalo SREBF2 in Triglyceride and Cholesterol Biosynthesis in Mammary Epithelial Cells. *Genes*. 2025;16(2):237. <https://doi.org/10.3390/genes16020237>
- 29.Ribas V. Role of cholesterol homeostasis in MASH-driven hepatocellular carcinoma: not just a neutral fat. *Exploration of Digestive Diseases*. 2024;3(3):203-25.
- 30.Xu H, Li Y, Guo N, Wu S, Liu C, Gui Z, et al. Caveolin-1 mitigates the advancement of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease by reducing endoplasmic reticulum stress and pyroptosis through the restoration of cholesterol homeostasis. *International Journal of Biological Sciences*. 2025;21(2):490.
- 31.Zhang C, Dai W, Yang S, Wu S, Kong J. Resistance to cholesterol gallstone disease: hepatic cholesterol metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2024;109(4):912-23. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgad528>

- 32.Jang W, Haucke V. ER remodeling via lipid metabolism. Trends in Cell Biology. 2024. DOI: [10.1016/j.tcb.2024.01.011](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2024.01.011)
- 33.Knoblach B, Rachubinski RA. Peroxisome population control by phosphoinositide signaling at the endoplasmic reticulum-plasma membrane interface. Traffic. 2024;25(1):e12923. <https://doi.org/10.1111/tra.12923>
- 34.Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic acids research. 2000;28(1):27-30.
- 35.Waterham HR, Vaz FM. Cholesterol Biosynthesis Metabolites. Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics: Springer; 2024. p. 267-82.
- 36.Zhang X, Chen Y, Sun G, Fei Y, Zhu H, Liu Y, et al. Farnesyl pyrophosphate potentiates dendritic cell migration in autoimmunity through mitochondrial remodelling. Nature Metabolism. 2024;1-20. <https://doi.org/10.1038/s42255-024-01149-x>
- 37.Chen M, Yang Y, Chen S, He Z, Du L. Targeting squalene epoxidase in the treatment of metabolic-related diseases: current research and future directions. PeerJ. 2024;12:e18522. <https://doi.org/10.7717/peerj.18522>
- 38.Picón DF, Skouta R. Unveiling the therapeutic potential of squalene synthase: Deciphering its biochemical mechanism, disease implications, and intriguing ties to ferroptosis. Cancers. 2023;15(14):3731.
- 39.Kakiyama G, Rodriguez-Agudo D, Pandak WM. Mitochondrial cholesterol metabolites in a bile acid synthetic pathway drive nonalcoholic fatty liver disease: a revised “two-hit” hypothesis. Cells. 2023;12(10):1434. <https://doi.org/10.3390/cells12101434>
- 40.Russo-Savage L, Schulman IG. Liver X receptors and liver physiology. Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease. 2021;1867(6):166121.
- 41.Kennewick KT, Bensinger SJ. Decoding the crosstalk between mevalonate metabolism and T cell function. Immunological Reviews. 2023;317(1):71-94.
- 42.Liu J ,Zhang X, Zhang Y, Qian M, Yang M, Yang S, Wang L. Farnesyl diphosphate synthase exacerbates nonalcoholic steatohepatitis via the activation of AHR-CD36 axis. The FASEB Journal. 2023;37(7):e23035.
- 43.Liebl M, Olander F, Müller C. Targeting the isoprenoid pathway in cholestere biosynthesis: An approach to identify isoprenoid biosynthesis inhibitors. Archiv der Pharmazie. 2025;358(2):e2400807. <https://doi.org/10.1002/ardp.202400807>
- 44.Li X, Li M. Unlocking cholesterol metabolism in metabolic-Associated Steatotic Liver Disease: molecular targets and natural product interventions. Pharmaceuticals. 2024;17(8):1073. <https://doi.org/10.3390/ph17081073>
- 45.Kamel EM, Othman SI, Alkhayl FFA, Rudayni HA, Allam AA, Lamsabhi AM. Mechanistic insights into alkaloid-based inhibition of squalene epoxidase: A combined in silico and experimental approach for targeting cholesterol biosynthesis. International Journal of Biological Macromolecules. 2025;140609. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140609>
- 46.Spaulding HR, Yan Z. AMPK and the adaptation to exercise. Annual review of physiology. 2022;84(1):209-27.
- 47.Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. Biochemical Journal. 2009;418(2):261-75.
- 48.Lee TV. Dietary Cholesterol and Resistance Training as Countermeasures to Accelerated Muscle Loss 2015.
- 49.Maleki S, Azarbayjani MA, Riyahi MS, Peeri M, Rahmati AS. The Effect of Aerobic Exercise and Ethanolic Extract of Rice Bran on The Expression of Acetyl-CoA Carboxylase and HMGCR Genes in the Liver Tissue of Rats Fed with a High-Fat Diet. Health. 2024;2(3):89-100.
- 50.Kahl CG ,Deas C. Exercise-Induced Anaphylaxis in an Air Force Aviator Taking a HMG-CoA Reductase Inhibitor: A Case Report and Review of the Presentation, Diagnoses, and Treatment. Military Medicine. 2017;182(5-6):e1816-e9. <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-16-00247>
- 51.Kugler BA, Maurer A, Fu X, Franczak E, Ernst N, Schwartze K, et al. Aerobic capacity and exercise mediate protection against hepatic steatosis via enhanced bile acid metabolism. bioRxiv. 2024.

52. Berglund I, Vesterbekkmo EK, Retterstøl K, Anderssen SA, Singh MAF, Helge JW, et al. The long-term effect of different exercise intensities on high-density lipoprotein cholesterol in older men and women using the per protocol approach: the Generation 100 Study. *Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes*. 2021;5(5):859-71.
53. Zhang L, Cao Z, Hong Y, He H, Chen L, Yu Z, Gao Y. Squalene epoxidase: its regulations and links with cancers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(7):3874.
54. Liu J, Liu W, Wan Y, Mao W. Crosstalk between Exercise and Immunotherapy: Current Understanding and Future Directions. *Research*. 2024;7:0360. DOI: [10.34133/research.0360](https://doi.org/10.34133/research.0360)
55. Fan X, Wang H, Wang W, Shen J, Wang Z. Exercise training alleviates cholesterol and lipid accumulation in mice with non-alcoholic steatohepatitis: Reduction of KMT2D-mediated histone methylation of IDI1. *Experimental Cell Research*. 2024;442(2):114265. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2024.114265>