



Research Article

Exploring the ceRNA Network in Multiple Sclerosis: Implications for B-Cell Receptor Signaling Pathway and Therapeutic Targets

Shirin Jalili^{1*}, Mohammad Panji²

¹Ph.D. in Biochemistry, Institute of Police Equipment and Technologies, Policing Sciences and Social Studies Research Institute, Tehran, Iran

²Ph.D. in Medical Biotechnology, Research Center for Life & Health Sciences & Biotechnology of the Police, Directorate of Health, Rescue & Treatment, Police Headquarter, Tehran, Iran

***Corresponding author:** Shirin Jalili, Research Institute of Police Sciences and Social Studies, Shahid Yasemi Street, Kordestan Highway, Tehran, Iran. E-mail: jalili.shirin@yahoo.com.

DOI: [10.32592/nkums.16.1.62](https://doi.org/10.32592/nkums.16.1.62)

How to Cite this Article:

Jalili Sh, Panji M. Exploring the ceRNA Network in Multiple Sclerosis: Implications for B-Cell Receptor Signaling Pathway and Therapeutic Targets. J North Khorasan Univ Med Sci. 2024;16(1):62-71. DOI: [10.32592/nkums.16.1.62](https://doi.org/10.32592/nkums.16.1.62)

Received: 13 Oct 2023

Accepted: 30 Dec 2023

Keywords:

B cell
ceRNA network
Gene expression
Multiple sclerosis

Abstract

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is the most common demyelinating disease of the central nervous system and the second cause of disability in adults. The exact cause and pathogenic mechanisms behind this disease have not been yet understood. Besides T cells, B cells play a role in MS pathogenesis which has received less attention.

Method: In the current study, the expression of long non-coding RNAs and four genes of the B cell receptor signaling pathway (CR2, BLK, BLNK, and RASGRP3) were investigated in the GSE21942 microarray dataset. Then, miRNAs targeting these genes and lncRNAs were predicted using miRWalk and DIANA-LncBase databases. Finally, the ceRNA network was constructed using desired genes, lncRNAs, and predicted miRNAs.

Results: Seven differentially expressed lncRNAs were identified that all had high expression in MS patients compared with control subjects. Moreover, the expression levels of desired genes (CR2, BLK, BLNK, and RASGRP3) were upregulated in MS patients. Finally, the ceRNA network including one lncRNA (MALAT1), two predicted miRNAs (hsa-miR-92a-3p and hsa-miR-548a-3p), and three genes (CR2, RASGRP3, and BLK) was constructed. In this network, hsa-miR-92a-3p and hsa-miR-548a-3p target CR2, RASGRP3, and BLK genes, and MALAT1 constrains the effect of these miRNAs on desired genes through sponging them.

Conclusion: The constructed ceRNA network can be considered a novel mechanism of MS pathogenesis and may play a key role in MS development and progression by influencing the B cell receptor signaling pathway. Furthermore, each of the components of this network can be considered a potential therapeutic target.



بررسی شبکه ceRNA در مولتیپل اسکلروزیس: پیامدهایی برای مسیرهای پیام‌رسانی گیرنده سلول B و اهداف درمانی

شیرین جلیلی^{۱*}، محمد پنجی^۲

^۱دکترای بیوشیمی، پژوهشکده تجهیزات و فناوری‌های انتظامی، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی فراجا، تهران، ایران
^۲دکترای بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم و فناوری‌های زیستی و سلامت پلیس، معاونت بهداشت، امداد و درمان، فرماندهی انتظامی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: شیرین جلیلی، تهران، اتوبان کردستان به سمت شمال، خیابان شهید یاسمی، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، پژوهشکده تجهیزات و فناوری‌های انتظامی. ایمیل: jalili.shirin@yahoo.com

DOI: 10.32592/nkums.16.1.62

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۱	چکیده
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۹	مقدمه: بیماری مولتیپل اسکلروزیس (MS) رایج‌ترین بیماری دمی‌لینه‌کننده سیستم عصبی مرکزی و دومین بیماری ناتوان‌کننده در بالغان به شمار می‌آید. تاکنون، علت دقیق و مکانیسم‌های پاتوژنز MS مشخص نشده است. در پاتوژنز MS، علاوه بر سلول‌های T، سلول‌های B نیز نقش دارند که کمتر به آن‌ها توجه شده است.
واژگان کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس سلول B بیان ژن شبکه ceRNA	روش کار: در این مطالعه، بیان RNAهای غیرکدکننده بلند و چهار ژن از مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B (BLNK، BLK، CR2) و RASGRP3 در دیتاست میکروآرای GSE21942 بررسی شد. سپس، با استفاده از دیتابیس‌های miRNA و miRNA و DIANA-LncBase، هدف قراردونده ژن‌ها و lncRNAها شناسایی شد و در نهایت، شبکه ceRNA ترسیم شد.
	یافته‌ها: هفت lncRNA با بیان متفاوت در بیماران MS شناسایی شد که همگی دارای افزایش بیان در بیماران در مقایسه با گروه کنترل بودند. همچنین، بیان چهار ژن BLNK، BLK، CR2 و RASGRP3 نیز در بیماران MS افزایش داشت. در نهایت، شبکه ceRNA متشکل از یک lncRNA (MALAT1) و دو miRNA از miRNAهای شناسایی‌شده (hsa-miR-548a-3p و hsa-miR-92a-3p) و سه ژن (CR2، RASGRP3 و BLK) ساخته شد. در این شبکه، hsa-miR-92a-3p و hsa-miR-548a-3p ژن‌های CR2، RASGRP3 و BLK را هدف قرار می‌دهند. از طرفی، MALAT1 نیز با اتصال به miRNAهای ذکرشده، اثر آن‌ها را بر ژن‌ها می‌کاهد.
	نتیجه‌گیری: شبکه ceRNA شناسایی‌شده می‌تواند مکانیسم جدیدی در پاتوژنز MS باشد و از طریق تأثیر بر مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B در بیماری MS نقش داشته باشد. همچنین، هریک از اجزای آن می‌تواند به عنوان هدف درمانی بالقوه‌ای در نظر گرفته شود.

مقدمه

بیماری MS رایج‌ترین بیماری دمی‌لینه‌کننده سیستم عصبی مرکزی (CNS) است. MS بیماری پیچیده‌ای است و در ابتدا به آن، عوامل ژنتیکی و عوامل محیطی متعددی از جمله ریسک‌فاکتورهای همچون اضطراب، خواب نامنظم، تروما و عوارض همراه تروما، سیگار کشیدن، سطح پایین ویتامین D و... نقش دارند [۱]. MS نوعی بیماری ناتوان‌کننده با آثار مخرب اجتماعی و اقتصادی است و دومین بیماری ناتوان‌کننده بعد از تروما در بالغان به شمار می‌آید. در این بیماری، قسمت‌های مختلف CNS درگیر می‌شوند و بسته به اینکه سیستم حرکتی، حسی، بینایی یا عصب خودمختار درگیر باشد، علائم متفاوت است [۲].

در سال ۲۰۲۰، تعداد افراد مبتلا به MS در جهان ۲/۸ میلیون نفر برآورد شد که شیوع و بروز آن در مناطق مختلف جهان متفاوت بود [۳]. شیوع MS در آفریقا و جنوب شرقی آسیا کمترین میزان را دارد و به ترتیب، ۰/۵ و ۲/۸ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر است. همچنین، شیوع MS در آمریکا

۸/۳ در هر ۱۰۰ هزار نفر و در اروپا، بیش از ۸۰ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر است [۴]. با توجه به مطالعاتی که در ایران انجام شده است، شیوع MS در جمعیت معمولی ۱۰۰ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر برآورد شده است که رقم بالایی است [۵]. همچنین، بروز MS نیز در ایران، ۶/۷ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر برآورد شده است [۶].

علی‌رغم پیشرفت‌های قابل توجه در دانش مربوط به پاتوفیزیولوژی MS و ابداع درمان‌های جدید برای درمان MS، علت دقیق و مکانیسم‌های سلولی و مولکولی MS مشخص نیست [۷]. در پاتوژنز MS هم سلول‌های T و هم سلول‌های B نقش دارند. سلول‌های T در ایجاد آسیب‌های آکسونی و دمی‌لیناسیون نقش دارند. در کنار سلول‌های T، سلول‌های B نقش تعیین‌کننده‌ای در پاتوژنز این بیماری و ایجاد التهاب عصبی دارند که کمتر به آن توجه شده است [۸]. سلول‌های B می‌توانند از طریق مسیرهای مختلف مانند ارائه آنتی‌ژن به سلول‌های T خودواکنشگر،

تولید سیتوکین‌ها و کموکاین‌های التهابی و تولید اتوانتی‌بادی در پاتوژن MS نقش داشته باشند [۹]. مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B مسیری بسیار حیاتی در سلول‌های B است و برای تکوین و بقای سلول‌های B و همچنین، تولید آنتی‌بادی در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک ضروری است. میزان فعالیت این مسیر در زیرجمعیت‌های مختلف سلول B و مراحل مختلف تکوین سلول B متفاوت است. به‌طور کلی، فعالیت پایه این مسیر برای بقا و تکوین سلول B لازم است، اما فعالیت افزایش‌یافته آن در بیماری‌هایی مثل بیماری‌های خودایمن و بیماری‌های عفونی، دیده می‌شود [۱۰]. گیرنده کمپلمان ۲ (CR2) از طریق اتصال با C3d متصل به آنتی‌ژن، نقشی کلیدی در فعال‌سازی سلول B و تقویت انتقال سیگنال توسط گیرنده سلول B دارد و از واکنش خودایمن (ناشی از خاصیت ادجوانت آنتی‌ژن متصل به C3d) جلوگیری می‌کند. CR2 به اتصال صحیح آنتی‌ژن به گیرنده سلول B کمک می‌کند و همچنین، آستانه تحریک گیرنده سلول B را کاهش می‌دهد و انتقال سیگنال توسط گیرنده سلول B را تقویت می‌کند [۱۱].

BLK یا تیروزین کیناز لنفوئیدی B پس از تحریک گیرنده سلول B فعال می‌شود و مولکول‌های CD79 متصل به گیرنده سلول B را فسفریله می‌کند و باعث راه‌اندازی آبشار مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B در داخل سلول می‌شود؛ در نتیجه، در شروع مسیر سیگنالینگ، نقش مهمی دارد [۱۲]. در مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B، BLNK به‌عنوان داریست عمل می‌کند و تیروزین کینازهای SYK و BTK را همراه با PLCγ2 در کنار هم جمع می‌کند و باعث تشکیل سیگنالوزوم می‌شود که در انتقال سیگنال و فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ پایین‌دست همچون مسیرهای NFAT-PLCγ2- NFκB نقش مهمی دارد [۱۳]. BLNK نقشی حیاتی در تشکیل سیگنالوزوم و فعال شدن مسیرهای پایین‌دست دارد و مطالعات نشان داده‌اند که جهش‌هایی که باعث از دست رفتن بیان BLNK شوند، به بلوکه شدن کامل مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B، توقف تکوین سلول‌های B در مرحله pre-B و در نهایت، آگامگلوبولینمی (agammaglobulinemia) منجر می‌شوند [۱۴]. RASGRP3 نیز از طریق فعال کردن RAS، موجب انتقال سیگنال و فعال شدن مسیر سیگنالینگ پایین‌دست ERK-MAP می‌شود و نقش مهمی در تکثیر سلول B و حفظ سطح پایه فعالیت مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B دارد [۱۵]. با توجه به نقش کلیدی هریک از اجزای فوق‌الذکر در مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B و نقش این مسیر سیگنالینگ در تکوین و فعالیت سلول‌های B، ژن‌های CR2، BLK، BLNK و RASGRP3 از این مسیر سیگنالینگ برای بررسی در این مطالعه انتخاب شدند.

مطالعات بیانی و عملکردی سلول‌های ایمنی می‌تواند درک ما را از مکانیسم‌های مولکولی زمینه‌ساز MS بهبود بخشد. پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌هایی که بازده بالایی دارند (high throughput techniques)، مانند توالی‌یابی RNA و ریزآرایه (microarray)، ارزیابی هم‌زمان بیان ژن‌های

تعدد را ممکن کرده است؛ در نتیجه، حجم قابل توجهی از داده در مورد پروفایل بیان ژن نمونه‌های مختلف به‌راحتی در دسترس جامعه علمی قرار گرفته است [۱۶]. بنابراین، استفاده از این داده‌ها و تجزیه و تحلیل آن‌ها به روش‌های مختلف می‌تواند در درک مکانیسم بیماری و پیدا کردن ژن‌های کلیدی مؤثر در پاتوژن بیماری کمک‌کننده باشد.

RNAهای غیرکدکننده نقش مهمی در تنظیم بیان ژن دارند. یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی نسبتاً جدید برای دخالت این رونوشت‌ها در تنظیم بیان ژن، فرضیه شبکه رقابتی RNA درون‌زا (Competing endogenous RNA، ceRNA) است. در این مکانیسم تنظیمی جدید، RNAهای غیرکدکننده، به‌ویژه RNAهای غیرکدکننده بلند (Long non coding RNA، lncRNA)، رونوشت‌های RNA دیگر را از طریق رقابت برای اتصال به miRNA هدف قراردهنده آن‌ها تنظیم می‌کنند [۱۷]. lncRNAها دسته‌ای از RNAها هستند که طولشان بیشتر از ۲۰۰ نوکلئوتید است و توانایی کد کردن پروتئین ندارند. همچنین، نشان داده شده است که در فرایندهای گوناگون سلولی و بسیاری از بیماری‌ها نقش دارند [۱۸]. بلوغ و فعال شدن سلول‌های ایمنی مستلزم بیان کنترل‌شده و یکپارچه بسیاری از ژن‌هاست. با توجه به نقش lncRNAها در تنظیم بیان ژن، این رونوشت‌های غیرکدکننده نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی بازی می‌کنند [۱۹]. بیان غیرعادی تعداد زیادی lncRNA در لنفوسیت‌ها، PBMC و حتی خون تام افراد مبتلا به MS در مقایسه با افراد سالم، در مطالعات مختلف گزارش شده است [۲۰]. برای مثال، در مطالعه‌ای، افزایش بیان DDIT4 و lncDDIT4 در بیماران MS گزارش شده است. lncDDIT4 با هدف قرار دادن DDIT4 و تبدیل سیگنالینگ DDIT4/mTOR تمایز سلول‌های Th17 را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۱]. MicroRNAها (miRNAs) نیز دسته‌ای از مولکول‌های RNA کوتاه، بسیار حفاظت‌شده و تک‌رشته‌ای هستند که طول آن‌ها حدود ۱۹ تا ۲۵ نوکلئوتید است و بیان ژن را در سطح پس از رونویسی از طریق اتصال به mRNA هدف که به جلوگیری از ترجمه یا تخریب mRNA منجر می‌شود، تنظیم می‌کنند [۲۲]. یک miRNA می‌تواند هم‌زمان در تنظیم چندین ژن هدف شرکت کند و به همین ترتیب، هر ژن نیز می‌تواند به‌وسیله بیش از یک miRNA تنظیم شود. مطالعات نشان داده‌اند که بیماری‌های مختلف، از جمله سرطان و بیماری‌های مرتبط با سیستم ایمنی، با بیان غیرطبیعی miRNAها همراه است [۲۳]. miRNAها نیز در تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش مهمی بازی می‌کنند و مطالعات نشان داده‌اند که پروفایل بیان miRNAها هنگام تحریک سلول ایمنی یا در زمان تمایز آن‌ها دچار تغییر می‌شود [۲۴]. همچنین، بیان غیرطبیعی miRNAها نیز در بیماری MS گزارش شده است. برای نمونه، در مطالعه‌ای، افزایش بیان miR-326 در سلول‌های Th17 به‌دست‌آمده از بیماران MS گزارش شده است که با شدت بیماری و تولید IL-17 مرتبط بوده است [۲۵]. در مطالعه دیگری، کاهش بیان miR-320a در لنفوسیت‌های B بیماران

LncBase، قسمت Species گزینه Homo Sapiens انتخاب شد تا miRNAهایی که در انسان، lncRNAهای مدنظر را هدف قرار می دهند به دست آیند و در قسمت miRNA Confidence Levels، گزینه high انتخاب شد تا miRNAها با اطمینان بالایی پیش بینی شوند. سپس، با استفاده از دیتابیس miRWalk، برای پیش بینی miRNAهایی که ژن های *CR2*، *BLK*، *BLNK* و *RASGRP3* را هدف قرار می دهند، استفاده شد. در این دیتابیس نیز فقط miRNAهایی انتخاب شدند که در هر دو دیتابیس miRDB و TargetScan گزارش شده بودند. در نهایت، اشتراک بین miRNAهای به دست آمده از DIANA-LncBase و دیتابیس miRWalk بررسی شد تا miRNAهایی که هم lncRNAهای مدنظر و هم چهار ژن مدنظر را هدف قرار می دهند، به دست آیند.

ترسیم شبکه ceRNA

بر اساس اطلاعات به دست آمده و برهم کنش های پیش بینی شده، شبکه ceRNA متشکل از چهار ژن *CR2*، *BLK*، *BLNK* و *RASGRP3* و DElncRNAهای مدنظر و miRNAهای پیش بینی شده با استفاده از نرم افزار Cytoscape نسخه ۳٫۹٫۱ (Cytoscape software version 3.9.1) ترسیم شد.

یافته ها

شناسایی DElncRNAs و DEmRNAs

پس از انجام تصحیح نویز پس زمینه و نرمالیزاسیون داده GSE21942، ژن های با بیان متفاوت یا DEmRNAs و lncRNAهای با بیان متفاوت یا DElncRNAs بین بیماران MS و افراد سالم با استفاده از آنالیز به وسیله پکیج limma و با توجه به cutoffهای در نظر گرفته شده ($1 \geq |LogFC|$ و $P\text{-value} < 0.05$)، شناسایی شدند. در مجموع، ۲۶۶ DEmRNA شناسایی شد که شامل ۱۸۳ ژن با افزایش بیان و ۸۳ ژن با کاهش بیان در بیماران MS بود (شکل ۱). چهار ژن مدنظر *CR2*، *BLK*، *BLNK* و *RASGRP3* از مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B، همگی دارای افزایش بیان معنی دار در بیماران MS در مقایسه با افراد سالم بودند. همچنین، هفت DElncRNA شامل *MALAT1*، *LINC00926*، *ASMTL-AS1*، *LINC01215*، *ANKRD10-IT1*، *NEAT1* و *RUSC1* شناسایی شدند که همگی دارای افزایش بیان در گروه بیمار بودند.

بررسی همبستگی بین ژن های مدنظر و DElncRNAs

همبستگی مثبت بین سطح بیان چهار ژن مدنظر *CR2*، *BLK*، *BLNK* و *RASGRP3* و هفت DElncRNA به دست آمده با استفاده از روش آنالیز همبستگی Pearson بررسی شد و مشخص شد که از بین هفت DElncRNA به دست آمده، چهار lncRNA شامل *MALAT1*، *LINC00926*، *ASMTL-AS1* و *LINC01215* با چهار ژن مدنظر همبستگی مثبت و معنی دار دارند؛ بنابراین، این چهار lncRNA برای مراحل بعدی و پیش بینی miRNA انتخاب شدند. نتایج آنالیز همبستگی بین ژن های مدنظر و DElncRNAها در جدول ۱ نشان داده شده است.

MS با افزایش بیان و ترشح MMP-9 که یکی از اهداف miR-320a است، همراه بوده است که سبب تخریب سد خونی مغزی می شود [۲۶]. با توجه به نقش سلول های B در پاتوژنز MS و نقش RNAهای غیرکدکننده در فرایندهای بیولوژیک، در این مطالعه، بر آن شدیم که شبکه ceRNA مرتبط با چهار ژن *CR2*، *BLK*، *BLNK* و *RASGRP3* از مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B را در بیماری MS بررسی کنیم.

روش کار

جمع آوری داده مورد مطالعه

مطالعه حاضر مطالعه ای بیوانفورماتیکی است. پس از جست و جو در پایگاه داده GEO و بررسی چندین دیتاست مربوط به بیان ژن در بیماران MS، در نهایت، دیتاست GSE21942 برای انجام مطالعات بیوانفورماتیکی انتخاب شد. سپس، داده خام مربوط به دیتاست GSE21942 که حاوی داده های بیان ژن در ۱۴ بیمار مبتلا به MS و ۱۵ فرد سالم است، از پایگاه داده GEO دانلود شد و برای آنالیزهای بعدی به کار رفت.

تجزیه و تحلیل داده میکروآری

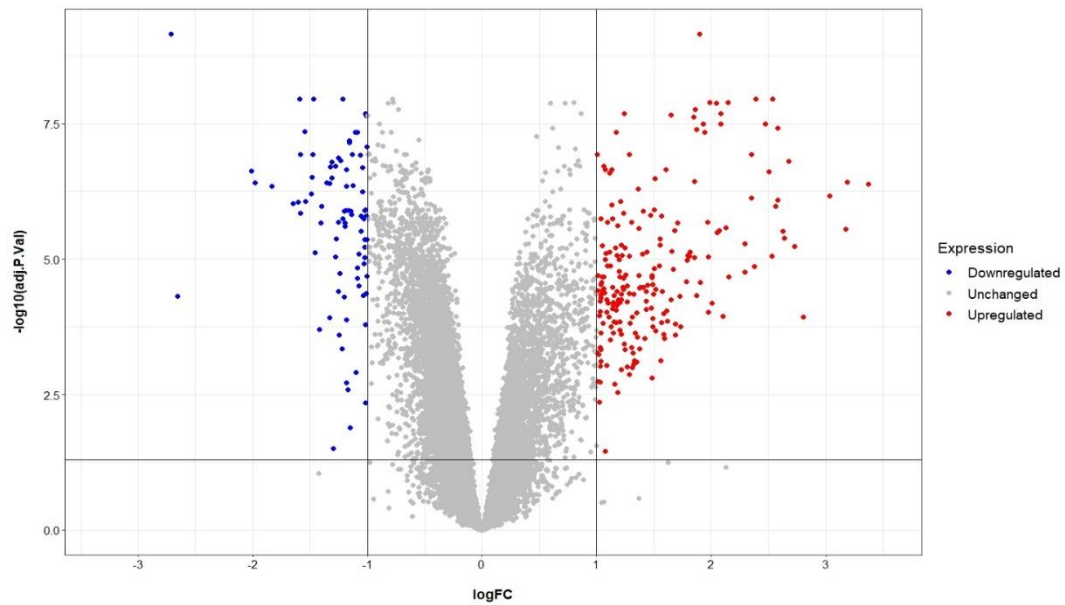
پلتفرم میکروآری مورد استفاده در این دیتاست GPL570 متعلق به شرکت Affymetrix بود و داده ها از نوع تک کاناله بودند. گفتنی است که پلتفرم GPL570 هم برای ژن ها و هم برای lncRNAها پروب دارد. برای اصلاح نویز پس زمینه و نرمال کردن داده های خام، از روش RMA که روشی معمول برای داده های Affymetrix است، استفاده شد که با استفاده از پکیج affy در نرم افزار R انجام شد. سپس، برای پیدا کردن ژن ها با بیان متفاوت (DEmRNAs) و lncRNAها با بیان متفاوت (DElncRNAs) بین بیماران MS و افراد سالم، از پکیج limma استفاده شد. برای بررسی معناداری، از adjusted P-Value به روش FDR استفاده شد و سطح معناداری برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. علاوه بر این، cutoff در نظر گرفته شده برای میزان تغییر بیان به این صورت بود که ژن های با LogFC کوچک تر از ۱- و بزرگ تر از ۱+ انتخاب شوند ($1 \geq |LogFC|$).

بررسی همبستگی بین بیان DElncRNAs و DEmRNAs

lncRNAها و mRNAهای موجود در شبکه ceRNA با هم همبستگی مثبت دارند. همبستگی مثبت بین DEmRNAs و DElncRNAs به روش آنالیز همبستگی Pearson و با استفاده از پکیج Hmisc در R بررسی شد. DElncRNAهایی انتخاب شدند که همبستگی مثبت و معنی داری با چهار ژن *CR2*، *BLK*، *BLNK* و *RASGRP3* از مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B داشتند. معیارهای انتخاب lncRNAها ضریب همبستگی بزرگ تر از ۰/۷ و P-value کوچک تر از ۰/۰۵ بود.

پیش بینی برهم کنش های miRNA

برای شناسایی miRNAهایی که lncRNAهای انتخاب شده در مرحله قبل را هدف قرار می دهند، از DIANA-LncBase ورژن ۳ (DIANA-LncBase v3) استفاده شد [۲۷]. هنگام جست و جو در DIANA-



شکل ۱. نمودار آتش‌فشانی حاصل از آنالیز داده GSE21942. نقاط قرمز نشان‌دهنده ژن‌های با افزایش بیان معنی‌دار و نقاط آبی نیز نشان‌دهنده ژن‌های با کاهش بیان معنی‌دار هستند.

جدول ۱. نتایج آنالیز هم‌بستگی بین ژن‌های مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B و DElncRNAها

lncRNA	Gene	R	P-Value
MALAT1	RASGRP3	۰/۷۵۶	P < ۰/۰۰۱
MALAT1	BLK	۰/۷۱۹	P < ۰/۰۰۱
MALAT1	BLNK	۰/۶۲۱	P < ۰/۰۰۱
MALAT1	CR2	۰/۷۶۷	P < ۰/۰۰۱
LINC00926	RASGRP3	۰/۸۸۵	P < ۰/۰۰۱
LINC00926	BLK	۰/۹۱۰	P < ۰/۰۰۱
LINC00926	BLNK	۰/۸۲۸	P < ۰/۰۰۱
LINC00926	CR2	۰/۸۵۵	P < ۰/۰۰۱
ASMTL-AS1	RASGRP3	۰/۷۹۴	P < ۰/۰۰۱
ASMTL-AS1	BLK	۰/۶۷۸	P < ۰/۰۰۱
ASMTL-AS1	BLNK	۰/۶۹۰	P < ۰/۰۰۱
ASMTL-AS1	CR2	۰/۷۱۵	P < ۰/۰۰۱
LINC01215	RASGRP3	۰/۷۰۱	P < ۰/۰۰۱
LINC01215	BLK	۰/۵۹۶	P < ۰/۰۰۱
LINC01215	BLNK	۰/۶۷۹	P < ۰/۰۰۱
LINC01215	CR2	۰/۸۱۲	P < ۰/۰۰۱
ANKRD10-IT1	RASGRP3	-۰/۵۹۲	P < ۰/۰۰۱
ANKRD10-IT1	BLK	-۰/۴۷۸	۰/۰۰۸
ANKRD10-IT1	BLNK	-۰/۵۲۵	۰/۰۰۳
ANKRD10-IT1	CR2	-۰/۵۳۴	۰/۰۰۲
NEAT1	RASGRP3	۰/۶۷۶	P < ۰/۰۰۱
NEAT1	BLK	۰/۵۲۱	۰/۰۰۳
NEAT1	BLNK	۰/۵۹۰	P < ۰/۰۰۱
NEAT1	CR2	۰/۵۷۷	۰/۰۰۱
RUSC1-AS1	RASGRP3	۰/۶۲۷	P < ۰/۰۰۱
RUSC1-AS1	BLK	۰/۵۰۹	۰/۰۰۴
RUSC1-AS1	BLNK	۰/۵۰۶	۰/۰۰۵
RUSC1-AS1	CR2	۰/۵۷۳	۰/۰۰۱

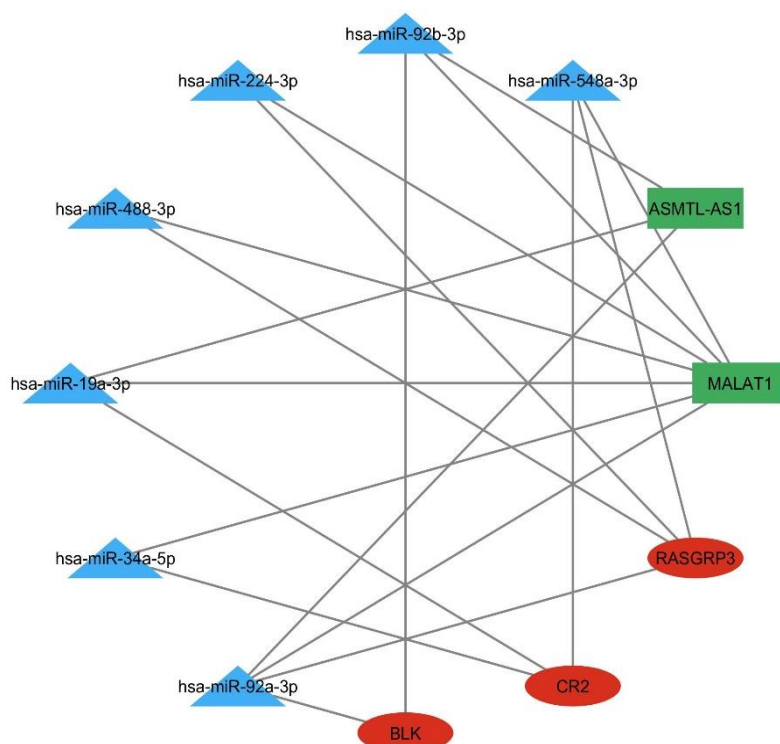
استفاده شد. از دیتابیس miRWalk نیز برای شناسایی miRNAهایی که چهار ژن *BLK*، *BLNK* و *RASGRP3* را هدف قرار می‌دهند، استفاده شد و miRNAهایی انتخاب شدند که در دو دیتابیس miRDB و TargetScan گزارش شده بودند. سپس، برای شناسایی miRNAهایی که

پیش‌بینی برهم‌کنش‌های miRNA و ترسیم شبکه ceRNA برای شناسایی miRNAهایی که چهار lncRNA (*MALAT1*، *LINC00926*، *ASMTL-AS1* و *LINC01215*) با هم‌بستگی مثبت با ژن‌های مدنظر را هدف قرار می‌دهند، از دیتابیس DIANA-LncBase

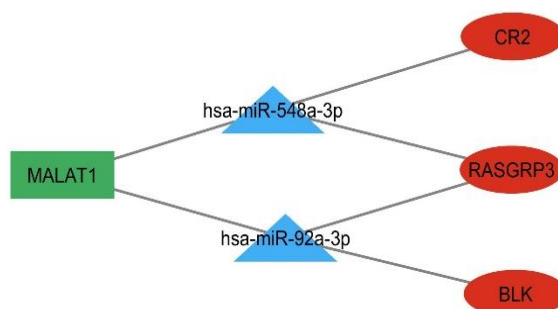
ژن مدنظر از مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B (*CR2*, *BLK*) و *RASGRP3* با استفاده نرم افزار Cytoscape ترسیم شد که در شکل ۲ نشان داده شده است.

سپس، با استفاده از این شبکه، ceRNA ترسیم شده و ارتباط اجزای این شبکه، *hub-gene*ها (ژن های با بیشترین اتصالات)، *hub-miRNA*ها (miRNA های با بیشترین اتصالات) و *hub-lncRNA*ها (lncRNA های با بیشترین اتصالات) شناسایی شدند و زیر شبکه متشکل از این *hub-node*ها (*hub-gene*، *hub-miRNA* و *hub-lncRNA*) ترسیم شد. *hub-node*ها مهم ترین اجزای شبکه به حساب می آیند و بیشترین ارتباط را با سایر اجزای شبکه دارند و حذف هریک از آنها می تواند به قطع ارتباط اجزای بسیاری از یک شبکه منجر شود. شبکه ceRNA حاصل از *hub-node*ها در شکل ۳ نشان داده شده است.

هم *lncRNA*ها و هم ژن های مدنظر را هدف قرار می دهند، اشتراک بین *miRNA*های به دست آمده از دیتابیس DIANA-LncBase و *miRNA*های به دست آمده از دیتابیس miRWalk بررسی شد و *miRNA*های مشترک بین این دو مجموعه انتخاب شدند که شامل هفت *miRNA* بود. این هفت *miRNA* عبارتند از: *hsa-miR-92a-3p*، *hsa-miR-548a-3p*، *hsa-miR-224-3p*، *hsa-miR-488-3p*، *hsa-miR-19a-3p*، *hsa-miR-34a-5p* و *miR-92b-3p*. هفت *miRNA* مشترک دو *lncRNA* (*MALAT1* و *ASMTL-AS1*) از چهار مدنظر را هدف قرار می دهند. در نهایت، شبکه ceRNA شامل هفت *miRNA* پیش بینی شده (*hsa-miR-92a-3p*، *hsa-miR-548a-3p*، *hsa-miR-224-3p*، *hsa-miR-488-3p*، *hsa-miR-19a-3p*، *hsa-miR-34a-5p* و *miR-92b-3p*)، دو *lncRNA* (*MALAT1* و *ASMTL-AS1*) به دست آمده از آنالیز داده میکروآری و سه



شکل ۲. شبکه ceRNA. بیضی های قرمز رنگ نشان دهنده ژن های مدنظر، مثلث های آبی رنگ نشان دهنده *miRNA*ها و مستطیل های سبز رنگ نشان دهنده *lncRNA*ها هستند



شکل ۳. شبکه ceRNA متشکل از *hub-node*ها. بیضی های قرمز رنگ نشان دهنده ژن های مدنظر، مثلث های آبی رنگ نشان دهنده *miRNA*ها و مستطیل های سبز رنگ نشان دهنده *lncRNA*ها هستند.

کردیم و از بین آن‌ها، miRNAهای مشترک را که هم ژن‌های مدنظر و هم lncRNAها را هدف قرار دهند، انتخاب کردیم. در نهایت، یک شبکه ceRNA متشکل از hub-node شامل یک (MALAT1) lncRNA، دو miRNA (hsa-miR-548a-3p و hsa-miR-92a-3p) و سه ژن (CR2، RASGRP3 و BLK) به دست آوردیم که می‌تواند نقش مهمی در تعدیل مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B داشته باشد.

CR2 پروتئینی غشایی است و در سطح سلول‌های B بیان می‌شود و به‌عنوان گیرنده‌ای برای ویروس اپشتین بار (EBV) عمل می‌کند. از طرفی، عفونت با EBV نیز ریسک فاکتوری شناخته‌شده برای ابتلا به MS است. نشان داده شده است که هاپلوتیپ رایجی در ژن CR2 که سه پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (SNP) را شامل می‌شود، با خطر ابتلا به لوپوس (نوعی بیماری خودایمن) مرتبط است [۳۰]. در مطالعه حاضر، بر اساس آنالیز داده میکرواری، دریافتیم که CR2 دارای افزایش بیان در بیماران MS در مقایسه با گروه کنترل است. مطابق با یافته‌های ما، لیندبلوم و همکاران، مقادیر بالای CR2 را در CSF بیماران MS در مقایسه با افراد سالم گزارش کرده‌اند. علاوه بر این، آن‌ها دریافتند که CR2 می‌تواند از طریق تعدیل جزء C3 کمپلمان در تنظیم فعال‌سازی سیستم کمپلمان نقش داشته باشد [۳۱].

در مطالعه دیگری، محققان نشان دادند که CR2 می‌تواند به درونی‌سازی (internalization) و ارائه پروتئین پایه میلین (MBP) به عنوان اتوانتی‌ژنی مرتبط با MS، توسط سلول‌های B کمک کند. آن‌ها بر اساس یافته‌های خود که نشان‌دهنده رسوب C3 و C1q همراه با MBP بر سلول‌های B هستند، دریافتند که CR2 از طریق کمپلمان به این فرایند (ارائه آنتی‌ژن خودی MBP) کمک می‌کند [۳۲]. در این مطالعه، بر اساس شبکه ceRNA به‌دست‌آمده، مشخص شد که ژن CR2 می‌تواند توسط hsa-miR-548a-3p هدف قرار گیرد و بیان آن دچار تغییر شود. از طرفی، lncRNA MALAT1 نیز می‌تواند به hsa-miR-548a-3p متصل شود و تأثیر این miRNA بر CR2 را کاهش دهد. همچنین، همان‌طور که از شبکه ceRNA معلوم است، hsa-miR-548a-3p ژن RASGRP3 را نیز هدف قرار می‌دهد که باز هم تأثیر آن بر این ژن از طریق اتصال با MALAT1 تعدیل می‌شود. در مطالعه وانگ و همکاران، نشان داده شده است که بیان miR-548a-3p در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) و آگزوزوم‌های سرمی به‌دست‌آمده از بیماران مبتلا به بیماری خودایمن آرتریت روماتوئید (RA) در مقایسه با افراد سالم، کاهش یافته است. همچنین، آن‌ها دریافتند که miR-548a-3p می‌تواند پاسخ‌های التهابی را از طریق تعدیل مسیر TLR4/NF-κB در بیماری RA تنظیم کند [۳۳]. در مطالعه دیگری، سطح بیان miR-548a-3p با پاسخ به درمان با فینگولیمود در بیماران مبتلا به MS همراه بود. بیان miR-548a-3p در بیمارانی که پس از دو سال درمان با فینگولیمود، فعالیت بیماری را نشان می‌دادند، در مقایسه با بیمارانی که پس از دو سال درمان با فینگولیمود، فعالیتی از بیماری

این شبکه متشکل از یک lncRNA (MALAT1)، دو miRNA (hsa-miR-548a-3p و miR-92a-3p) و سه ژن (CR2، RASGRP3 و BLK)، می‌تواند شبکه‌ای مهم در تعدیل مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B باشد. همچنین، برهم‌کنش RNAهای غیرکدکننده این شبکه با یکدیگر و با ژن‌های این شبکه می‌تواند نقش مهمی در تنظیم ژن‌های این شبکه و در نتیجه، عملکرد مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B داشته باشد. در این شبکه، hsa-miR-548a-3p با اتصال به ژن‌های CR2 و RASGRP3 بیان آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین، hsa-miR-92a-3p نیز با هدف قرار دادن دو ژن RASGRP3 و BLK موجب تغییر در بیان این دو ژن می‌شود. از طرفی، MALAT1 نیز برای اتصال به hsa-miR-548a-3p و hsa-miR-92a-3p با سه ژن CR2، RASGRP3 و BLK رقابت می‌کند و از طریق اتصال به این miRNAها، از تأثیر آن‌ها بر بیان سه ژن موجود در شبکه می‌کاهد.

بحث

علی‌رغم شواهدی که نشان می‌دهد که سلول‌های B می‌توانند در پاتوژنز MS نقش داشته باشند، نقش آن‌ها در MS نادیده گرفته شده است و به‌طور کامل، شناخته نشده است. مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های B در ضایعات مغزی بیماران MS وجود دارد. علاوه بر این، شناسایی باند‌های اولیگوکلونال در الکترفورز مایع مغزی نخاعی (CSF) حدود ۹۰ درصد از بیماران MS تأییدی بر نقش سلول‌های B در این بیماری خودایمنی است [۲۸]. همچنین، نشان داده شده است که سلول B را می‌توان با استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد CD20 هدف قرار داد و باعث کاهش تعداد این سلول‌ها شد که در مهار فعالیت و پیشرفت بیماری بسیار مؤثر است. هدف قرار دادن سلول‌های B همچنین، از فعال شدن سلول‌های T جلوگیری می‌کند و به کاهش سیتوکین‌های پیش‌التهابی منجر می‌شود [۲۹]. علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های B می‌توانند از طریق مسیرهای مختلف، همچون ارائه آنتی‌ژن به سلول‌های T خودواکنشگر، در تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی و التهابی، تولید کموکاین‌ها و تولید اتوانتی‌بادی در پاتوژنز MS نقش داشته باشند [۹]. همه این مطالعات بر نقش بالقوه سلول‌های B در پاتوژنز MS تأکید دارند و بنابراین، در این مطالعه، بر آن شدیم که شبکه ceRNA مرتبط با مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B را در بیماری MS بررسی کنیم. در مطالعه حاضر، بیان چهار ژن CR2، BLK، BLNK و RASGRP3 از مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B را در دیتاستی میکرواری که حاوی داده‌های پروفایل بیانی ۱۴ فرد مبتلا به MS و ۱۵ فرد سالم بود، بررسی کردیم و دریافتیم که بیان هر چهار ژن در بیماران MS نسبت به افراد سالم، به‌طور معنی‌داری، افزایش یافته است. علاوه بر این، هفت DElncRNA را نیز شناسایی کردیم که همگی دارای افزایش بیان در بیماران MS در مقایسه با افراد سالم بودند. سپس، miRNAهای هدف قراردهنده ژن‌های مدنظر و lncRNAهای شناسایی‌شده را به‌ترتیب، به‌وسیله دیتابیس‌های miRWalk و DIANA-LncBase شناسایی

بیماران MS در مقایسه با افراد سالم دارند. علاوه بر این، بر اساس شبکه ceRNA به دست آمده، مشخص شد که ژن *BLK* را *hsa-miR-92a-3p* هدف قرار می دهد. *BLNK* که پیونددهنده سلول B (B cell linker) نیز شناخته می شود، پروتئینی آداپتور در سیگنالینگ BCR است. پس از تحریک BCR، *BLNK* فسفریله می شود و کینازهای Syk و Btk را به کار می گیرد و فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ پایین دست، مانند مسیر PLC- γ 2 را میانجی گری می کند [44]. لیوپچنکو و همکارانش، طی مطالعه ای، ثابت کردند که فسفوریلاسیون *BLNK* در سلول های B به دست آمده از بیماران آرتریت روماتوئید (RA) بیشتر از فسفوریلاسیون *BLNK* در سلول های B به دست آمده از افراد سالم است که می تواند حاکی از فعالیت بالای مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B و افزایش فعالیت *BLNK* در این بیماری خودایمن باشد [45]. *BLK* که تیروزین کیناز لنفوئیدی B نیز شناخته می شود، یک پروتئین غیرگیرنده تیروزین کیناز است و به خانواده تیروزین کینازهای Src متعلق است. *BLK* عمدتاً در رده سلولی B بیان می شود، اما بیان آن در رده های سلولی غیر B مانند سلول های β پانکراس نیز در مقادیر کمتری یافت شده است. *BLK* در تکوین سلول B و سیگنال دهی گیرنده سلول B نقش دارد [46]. مطالعات نشان داده اند که واریانت های متعدد در ژن *BLK* با بیماری های خودایمنی مختلف مرتبط هستند. به عنوان مثال، هوم و همکاران، نشان دادند که پلی مورفیزم rs13277113 در ژن *BLK* با استعداد ابتلا به SLE مرتبط است [47].

در این مطالعه، با آنالیز داده بیان ژن میکرواری، شاهد افزایش بیان lncRNA *MALAT1* در بیماران مبتلا به MS در مقایسه با افراد سالم بودیم. همچنین، در شبکه ceRNA به دست آمده، *MALAT1* از طریق اتصال به دو *hsa-miR-92a-3p* و *hsa-miR-548a-3p* می تواند نقش بسزایی در تعدیل بیان ژن های *CR2*، *RASGRP3* و *BLK* داشته باشد و مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B را تحت تأثیر قرار دهد. در مطالعه ای، بیان افزایش یافته *MALAT1* در بیماران MS نسبت گروه کنترل گزارش شده است [48]. در مطالعه دیگری نیز محققان نشان دادند که بیان *MALAT1* در بیماران مبتلا به MS افزایش یافته است و همچنین، این lncRNA قدرت تشخیصی خوبی در تشخیص افراد بیمار از افراد سالم دارد [49]. علاوه بر این، در مطالعه ای، همراهی واریانت rs619586 در *MALAT1* با خطر ابتلا به MS گزارش شده است. آلل A در این SNP با افزایش خطر ابتلا به MS همراه است. همچنین، محققان نشان دادند که هاپلوتاایپ AT (آلل T در rs3200401 و آلل A در rs619586) در این lncRNA با افزایش خطر ابتلا به MS همراه است [50].

شبکه ceRNA شبکه تنظیمی پیچیده ای است که شامل برهم کنش های متعدد بین lncRNA ها، miRNA ها و ژن های هدف می شود. این مطالعه بر مجموعه خاصی از ژن ها و lncRNA های مرتبط با مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B در MS متمرکز است. با این حال، مهم است که در نظر بگیریم که شبکه های ceRNA پویا و به زمینه وابسته هستند و عوامل

را نشان نمی دهند، پایین تر بود. محققان دریافتند که *miR-548a-3p* می تواند بیومارکری بالقوه برای بررسی پاسخ به درمان با فینگولیمود در بیماران MS در نظر گرفته شود [34].

در این مطالعه، شاهد افزایش بیان *RASGRP3* در بیماران MS در مقایسه با افراد کنترل بودیم. همانند مطالعه ما، محققان نشان دادند که بیان *RASGRP3* در سلول های PBMCs و سلول های B به دست آمده از بیماران سیستمیک اریتماتوز لوپوس (SLE) در مقایسه با گروه کنترل، افزایش یافته است. همچنین، سطح بیان *RASGRP3* با شاخص فعالیت بیماری SLE (SLEDAI) همبستگی مثبت داشت. علاوه بر این، آن ها نشان دادند که ناک داون *RASGRP3* از فعال شدن سیگنالینگ *Erk1/2* جلوگیری و تولید سایتوکاین های پیش التهابی را محدود می کند [25]. پروتئین های آزادکننده نوکلئوتید گوانیل Ras (*RasGRPs*) خانواده ای پروتئینی هستند که به عنوان فاکتورهای تبادل نوکلئوتید گوانیل عمل می کنند و نقشی کلیدی در فعال سازی *Ras GTPases* دارند که عمدتاً، در سلول های خونی بیان می شوند و اختلال در تنظیم آن ها در بیماری های خودایمنی و نئوپلاسم های خونی مشاهده شده است [26]. در یک مطالعه همراهی گسترده ژنومی (GWAS) نیز مشخص شد که پلی مورفیزم rs13385731 در ژن *RASGRP3* با خطر ابتلا به بیماری خودایمنی SLE همراه است [27]. در شبکه ceRNA به دست آمده، ژن *RASGRP3* را دو *miRNA*، *hsa-miR-92a-3p* و *hsa-miR-548a-3p* هدف قرار می دهند که البته، *MALAT1* نیز از طریق اتصال به این دو *miRNA*، اثر آن ها را بر *RASGRP3* کاهش می دهد. در مطالعه ای، نشان داده شده است که بیان *miR-92a-3p* در قطره اشک بیماران مبتلا به سندرم شوگرن (نوعی بیماری خودایمنی که چشم را تحت تأثیر قرار می دهد)، در مقایسه با افراد سالم، کاهش یافته است [28]. در مطالعه دیگری نیز افزایش بیان *miR-92a-3p* در بیماران مبتلا به SLE در مقایسه با افراد سالم گزارش شده است. همچنین، نشان داده شده است که *miR-92a-3p* می تواند بیومارکر تشخیصی بالقوه ای در بیماری MS در نظر گرفته شود [39]. رگو و همکاران، در مطالعه ای درباره بیماران MS، دریافتند که سطح بیان *miR-92a-3p* در سرم بیماران مبتلا به MS با نسبت T1:T2 در تصویربرداری MRI همبستگی مثبت دارد و می تواند فاکتوری پاتوژنیک در نظر گرفته شود [40]. همچنین، *miR-92a-3p* متعلق به خوشه *miR17-92* است که بیان بالایی در سلول های B [41] و سرم [42] بیماران MS در مقایسه با افراد سالم دارد.

در مطالعه ای با هدف بررسی پروفایل بیان ژن به روش میکرواری، بیان تغییر یافته ژن های *BLK* و *BLNK* در بیماران MS در مقایسه با گروه کنترل گزارش شد. همچنین، بین عملکرد شناختی بیماران MS و سطح بیان ژن های *BLK* و *BLNK* ارتباط معنی داری مشاهده شد [43]. به طور مشابه، در مطالعه حاضر نیز با تجزیه و تحلیل داده بیان ژن میکرواری، مشاهده کردیم که ژن های *BLK* و *BLNK* بیان بالایی در

مرتبط با مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B، متشکل از یک lncRNA (MALAT1)، دو miRNA (hsa-miR-92a-3p و hsa-miR-548a-3p) و سه ژن (RASGRP3، CR2، و BLK) ساخته شد. برهم کنش بین اجزای این شبکه می‌تواند نقش مهمی در پاتوژنز MS از طریق تأثیر بر مسیر سیگنالینگ گیرنده سلول B داشته باشد و در درک مکانیسم‌های سلولی و مولکولی دخیل در پاتوژنز MS کمک‌کننده باشد. همچنین، هریک از اجزای این شبکه می‌تواند هدف درمانی بالقوه‌ای برای MS در نظر گرفته شود که تأیید آن نیازمند مطالعات عملکردی است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله، از پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی فراجا و مرکز تحقیقات علوم و فناوری‌های زیستی و سلامت پلیس تشکر می‌کنیم. مطالعه حاضر تحت نظر کمیته اخلاق و با کد اخلاق IR.SBMU.TEB.POLICE. REC.1402.003 انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

References

- Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis—a review. *Eur J Neurol*. 2019;26(1):27-40. DOI: 10.1111/ene.13819 PMID: 30300457
- Doshi A, Chataway J. Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clin Med (Lond)*. 2017;17(6):530-6. DOI: 10.7861/clinmedicine.17-6-530 PMID: 29196354
- Lane J, Ng HS, Poyser C, Lucas RM, Tremlett H. Multiple sclerosis incidence: A systematic review of change over time by geographical region. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;63:103932. DOI: 10.1016/j.msard.2022.103932 PMID: 35667315
- Howard J, Trevick S, Younger DS. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2016;34(4):919-39. DOI: 10.1016/j.ncl.2016.06.016 PMID: 27720001
- Mirmosayyeb O, Shaygannejad V, Bagherieh S, Hosseiniabadi AM, Ghajarzadeh M. Prevalence of multiple sclerosis (MS) in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci*. 2022;43(1):233-41. DOI: 10.1007/s10072-021-05750-w PMID: 34787755
- Hosseinzadeh A, Baneshi M, Sedighi B, Kermanchi J, Haghdoust A. Incidence of multiple sclerosis in Iran: a nationwide, population-based study. *Public Health*. 2019;175:138-44. DOI: 10.1016/j.puhe.2019.07.013 PMID: 31476710
- Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol*. 2010;9(7):727-39. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70094-6 PMID: 20610348
- Dendrou CA, Fugger L, Frieze MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545-58. DOI: 10.1038/nri3871 PMID: 26250739
- Jelicic I, Sospedra M, Martin R. When a T cell engages a B cell: novel insights in multiple sclerosis. *Swiss Med Wkly*. 2020;150:w20330. DOI: 10.4414/sm.w.2020.20330 PMID: 32920791
- Liu W, Tolar P, Song W, Kim TJ. BCR signaling and B cell activation. *Front Immunol*. 2020;11:45. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00045 PMID: 32063903
- Rickert RC. Regulation of B lymphocyte activation by complement C3 and the B cell coreceptor complex. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(3):237-43. DOI: 10.1016/j.coi.2005.03.001 PMID: 15886112
- Skaggs BJ, Clark MR. Proximal B cell receptor signaling pathways. *Signal Transduct*. 2004;4(5-6):173-94. DOI: 10.1002/sita.200400034
- Wang JY. B Cells in immunity and tolerance. *Adv Exp Med Biol*. Springer. 2020:23-36.
- Durandy A, Kracker S, Fischer A. Primary antibody deficiencies. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(7):519-33. DOI: 10.1038/nri3466 PMID: 23765059
- Coughlin JJ, Stang SL, Dower NA, Stone JC. RasGRP1 and RasGRP3 regulate B cell proliferation by facilitating B cell receptor-Ras signaling. *J Immunol*. 2005;175(11):7179-84. DOI: 10.4049/jimmunol.175.11.7179 PMID: 16301621
- Kemppinen A, Kaprio J, Palotie A, Saarela J. Systematic review of genome-wide expression studies in multiple sclerosis. *BMJ Open*. 2011;1(1):e000053. DOI: 10.1136/bmjopen-2011-000053 PMID: 22021740
- Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*. 2011;146(3):353-8. DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.014 PMID: 21802130
- Wu GC, Pan HF, Leng RX, Wang DG, Li XP, Li XM, et al. Emerging role of long noncoding RNAs in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2015;14(9):798-805. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.05.004 PMID: 25989481
- Chen YG, Satpathy AT, Chang HY. Gene regulation in the immune system by long noncoding RNAs. *Nat Immunol*. 2017;18(9):962-972. DOI: 10.1038/ni.3771 PMID: 28829444
- Ghaderian S, Shomali N, Behraves S, Danbaran GR, Hemmatzadeh M, Aslani S, et al. The emerging role of lncRNAs in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2020;347:577347. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2020.577347 PMID: 32745803
- Zhang F, Liu G, Li D, Wei C, Hao J. DDIT4 and associated lncDDIT4 modulate Th17 differentiation through the DDIT4/TSC/mTOR pathway. *J Immunol*. 2018;200(5):1618-26. DOI: 10.4049/jimmunol.1601689 PMID: 29378913
- Luo D, Fu J. Identifying characteristic miRNAs-genes and risk pathways of multiple sclerosis based on bioinformatics analysis. *Oncotarget*. 2018;9(4):5287-300. DOI: 10.18632/oncotarget.23866 PMID: 29435179
- Xu ZB, Feng X, Zhu WN, Qiu ML. Identification of key genes and microRNAs for multiple sclerosis using bioinformatics analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(48):e27667. DOI: 10.1097/

- MD.000000000027667 PMID: 35049167
24. Ghafouri-Fard S, Taheri M. A comprehensive review of non-coding RNAs functions in multiple sclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2020;879:173127. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173127 PMID: 3236034
 25. Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol.* 2009;10(12):1252-9. DOI: 10.1038/ni.1798 PMID: 19838199
 26. Aung LL, Mouradian MM, Dhib-Jalbut S, Balashov KE. MMP-9 expression is increased in B lymphocytes during multiple sclerosis exacerbation and is regulated by microRNA-320a. *J Neuroimmunol.* 2015;278:185-9. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.11.004 PMID: 25468268
 27. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Tastsoglou S, Skoufos G, Karavangeli A, Pierros V, et al. DIANA-LncBase v3: indexing experimentally supported miRNA targets on non-coding transcripts. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D101-10. DOI: 10.1093/nar/gkz1036 PMID: 31732741
 28. Sospedra M. B cells in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2018;31(3):256-62. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000563 PMID: 29629941
 29. Greenfield AL, Hauser SL. B-cell therapy for multiple sclerosis: entering an era. *Ann Neurol.* 2018;83(1):13-26. DOI: 10.1002/ana.25119 PMID: 29244240
 30. Wu H, Boackle SA, Hanvivadhanakul P, Ulgiati D, Grossman JM, Lee Y, et al. Association of a common complement receptor 2 haplotype with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(10):3961-6. DOI: 10.1073/pnas.0609101104 PMID: 17360460
 31. Lindblom RP, Aeienehband S, Ström M, Al Nimer F, Sandholm K, Khademi M, et al. Complement Receptor 2 is increased in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients and regulates C3 function. *Clin Immunol.* 2016;166-167:89-95. DOI: 10.1016/j.clim.2016.04.003 PMID: 27085202
 32. Brimnes MK, Hansen BE, Nielsen LK, Dziegiel MH, Nielsen CH. Uptake and presentation of myelin basic protein by normal human B cells. *PLoS One.* 2014;9(11):e113388. DOI: 10.1371/journal.pone.0113388 PMID: 25401487
 33. Wang Y, Zheng F, Gao G, Yan S, Zhang L, Wang L, et al. MiR-548a-3p regulates inflammatory response via TLR4/NF-κB signaling pathway in rheumatoid arthritis. *J Cell Biochem.* 2019;120(2):1133-40. DOI: 10.1002/jcb.26659 PMID: 29315763
 34. Gonzalez-Martinez A, Patel R, Healy BC, Lokhande H, Paul A, Saxena S, et al. miRNA 548a-3p as biomarker of NEDA-3 at 2 years in multiple sclerosis patients treated with fingolimod. *J Neuroinflammation.* 2023;20(1):131. DOI: 10.1186/s12974-023-02811-z PMID: 37254147
 35. An XJ, Xia Y, Li J, Dong LY, Wang YJ, Yang J, et al. RasGRP3 in peripheral blood mononuclear cells is associated with disease activity and implicated in the development of systemic lupus erythematosus. *Am J Transl Res.* 2019;11(3):1800-9. PMID: 30972203
 36. Stone JC. Regulation and function of the RasGRP family of Ras activators in blood cells. *Genes Cancer.* 2011;2(3):320-34. DOI: 10.1177/1947601911408082 PMID: 21779502
 37. Han JW, Zheng HF, Cui Y, Sun LD, Ye DQ, Hu Z, et al. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2009;41(11):1234-7. DOI: 10.1038/ng.472 PMID: 19838193
 38. Kim YJ, Yeon Y, Lee WJ, Shin YU, Cho H, Sung YK, et al. Comparison of microRNA expression in tears of normal subjects and Sjögren syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(14):4889-95. DOI: 10.1167/iov.19-27062 PMID: 31752018
 39. Kim BS, Jung JY, Jeon JY, Kim HA, Suh CH. Circulating hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-92a-3p, and hsa-miR-223-3p may be novel biomarkers in systemic lupus erythematosus. *HLA.* 2016;88(4):187-93. DOI: 10.1111/tan.12874 PMID: 27596248
 40. Regev K, Healy BC, Khalid F, Paul A, Chu R, Tauhid S, et al. Association between serum MicroRNAs and magnetic resonance imaging measures of multiple sclerosis severity. *JAMA Neurol.* 2017;74(3):275-85. DOI: 10.1001/jamaneurol.2016.5197 PMID: 28114622
 41. Sievers C, Meira M, Hoffmann F, Fontoura P, Kappos L, Lindberg RL. Altered microRNA expression in B lymphocytes in multiple sclerosis: towards a better understanding of treatment effects. *Clin Immunol.* 2012;144(1):70-9. DOI: 10.1016/j.clim.2012.04.002 PMID: 22659298
 42. Gandhi R, Healy B, Gholipour T, Egorova S, Musallam A, Hussain MS, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2013;73(6):729-40. DOI: 10.1002/ana.23880 PMID: 23494648
 43. Turkoglu R, Yilmaz V, Ozdemir O, Akbayir E, Benbir G, Arsoy E, et al. Peripheral blood B cell subset ratios and expression levels of B cell-associated genes are altered in benign multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2021;52:103019. DOI: 10.1016/j.msard.2021.103019 PMID: 34020389
 44. Wen Y, Jing Y, Yang L, Kang D, Jiang P, Li N, et al. The regulators of BCR signaling during B cell activation. *Blood Sci.* 2019;1(2):119-29. DOI: 10.1097/BS9.0000000000000026 PMID: 35402811
 45. Liubchenko GA, Appleberry HC, Striebach CC, Franklin KE, Derber LA, Holers VM, et al. Rheumatoid arthritis is associated with signaling alterations in naturally occurring autoreactive B-lymphocytes. *J Autoimmun.* 2013;40:111-21. DOI: 10.1016/j.jaut.2012.09.001 PMID: 23058039
 46. Simpfendorfer KR, Olsson LM, Manjarrez Orduño N, Khalili H, Simeone AM, Katz MS, et al. The autoimmunity-associated BLK haplotype exhibits cis-regulatory effects on mRNA and protein expression that are prominently observed in B cells early in development. *Hum Mol Genet.* 2012;21(17):3918-25. DOI: 10.1093/hmg/dds220 PMID: 22678060
 47. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med.* 2008;358(9):900-9. DOI: 10.1056/NEJMoa0707865 PMID: 18204098
 48. Shaker OG, Mahmoud RH, Abdelaleem OO, Ibrahim EG, Mohamed AA, Zaki OM, et al. LncRNAs, MALAT1 and lnc-DC as potential biomarkers for multiple sclerosis diagnosis. *Biosci Rep.* 2019;39(1):BSR20181335. DOI: 10.1042/BSR20181335 PMID: 30514825
 49. Gharesouran J, Taheri M, Sayad A, Ghafouri-Fard S, Mazdeh M, Omrani MD. A novel regulatory function of long non-coding RNAs at different levels of gene expression in multiple sclerosis. *J Mol Neurosci.* 2019;67(3):434-40. DOI: 10.1007/s12031-018-1248-2 PMID: 30610590
 50. Eftekharian MM, Noroozi R, Komaki A, Mazdeh M, Ghafouri-Fard S, Taheri M. MALAT1 genomic variants and risk of multiple sclerosis. *Immunol Invest.* 2019;48(5):549-54. DOI: 10.1080/08820139.2019.1576728 PMID: 30822187