

## НОВЫЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОСУПРЕССИИ, ОПОСРЕДОВАННОЙ РЕГУЛЯТОРНЫМИ В-КЛЕТКАМИ

© 2023 Э.А. Жеремян<sup>1,2\*</sup>, А.С. Устюгова<sup>1</sup>, А.И. Радько<sup>3</sup>, Е.М. Стасевич<sup>1,3</sup>,  
А.Н. Уварова<sup>1,2</sup>, Н.А. Митькин<sup>1</sup>, Д.В. Купраш<sup>1,2,3</sup>, К.В. Корнеев<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: elyazheretyan@mail.ru; kirkorneev@gmail.com

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119234 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

<sup>4</sup> Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России,  
125167 Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.10.2022

После доработки 11.11.2022

Принята к публикации 16.11.2022

В-Лимфоциты играют важную роль в регуляции иммунного ответа как в норме, так и при патологических состояниях. Традиционно основной функцией В-лимфоцитов считалась продукция антител и презентация антигенов, однако за последние десятилетия было обнаружено несколько субпопуляций регуляторных В-лимфоцитов (Bregs), поддерживающих иммунологическую толерантность и предотвращающих избыточную активацию иммунной системы. В контексте изучения роли таких В-клеток в различных патологиях человека обычно рассматривают субпопуляции регуляторных В-клеток памяти (mBregs, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>) и транзиторных Bregs (tBregs, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>), однако механизмы, за счет которых эти субпопуляции Bregs осуществляют иммуносупрессивную активность, остаются недостаточно изученными. В данной работе с помощью биоинформатического анализа открытых данных РНК-секвенирования были предложены потенциальные механизмы реализации иммуносупрессии каждой из субпопуляций регуляторных В-клеток. Анализ дифференциальной экспрессии генов до и после активации данных субпопуляций позволил идентифицировать 6 кандидатных молекул, которые могут определять функциональность mBregs и tBregs. IL411-, SIRPA- и SLAMF7-зависимые механизмы иммуносупрессии могут быть свойственны обеим субпопуляциям Bregs, а NID1-, CST7- и ADORA2B-зависимые механизмы могут быть характерны, преимущественно, для tBregs. Глубокое понимание молекулярных механизмов противовоспалительного иммунного ответа В-лимфоцитов является важной задачей как фундаментальной науки, так и прикладной медицины и может способствовать внедрению новых подходов к терапии комплексных заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** регуляторные В-клетки, иммуносупрессия, противовоспалительные молекулы, регуляция иммунного ответа.

**DOI:** 10.31857/S0320972523010013, **EDN:** PAZXJS

### ВВЕДЕНИЕ

Впервые иммуносупрессивные свойства В-клеток были показаны на модели отложенной гиперчувствительности почти полвека назад [1]. Однако, поскольку молекулярные механизмы функционирования таких В-клеток

были неизвестны, то концепция противовоспалительных В-лимфоцитов не была широко принята научным сообществом. Сам термин «регуляторные В-клетки» (Bregs) возник относительно недавно после публикации данных об иммуносупрессивной роли В-лимфоцитов в воспалительных заболеваниях кишечника [2].

Принятые сокращения: ADO – аденозин; Bregs – регуляторные В-лимфоциты; mBregs – регуляторные В-клетки памяти; tBregs – транзиторные регуляторные В-клетки; iNKT – инвариантные естественные киллерные Т-клетки; NK – естественные киллеры; SLAMF7 – 7-й член семейства сигнальных молекул активации лимфоцитов; TCR – Т-клеточный рецептор; Tregs – регуляторные Т-лимфоциты.

\* Адресат для корреспонденции.

Регуляторные В-клетки могут дифференциально регулировать патогенез различных заболеваний: с одной стороны, показана их протективная роль при аутоиммунных патологиях (ревматоидный артрит, псориаз, рассеянный склероз, диабет типа I, синдром Шегрена, системная красная волчанка), аллергии, миокардите и реакции «трансплантат против хозяина», с другой стороны, Bregs могут усугубить течение бактериальных и вирусных инфекций, а также онкологических заболеваний [3–5]. Кроме того, известна способность некоторых субпопуляций В-регуляторных клеток подавлять эффекторные Т-лимфоциты и естественные киллеры (NK) в опухолевом микро-

окружении, что облегчает ускользание опухоли от иммунного ответа [6, 7].

Наиболее известным механизмом иммуносупрессии, осуществляемой В-регуляторными клетками, является продукция противовоспалительного цитокина IL10. Не так давно был описан репертуар молекулярных механизмов В-клеточной иммуносупрессии. Среди молекул, определяющих функциональность Bregs, есть как растворимые факторы, так и мембранные молекулы (см. таблицу) [8–13].

В литературе встречаются лишь единичные сравнительные исследования механизмов иммуносупрессии основных субпопуляций регуляторных В-клеток периферической крови чело-

Наиболее известные молекулы регуляторных В-лимфоцитов, опосредующие иммуносупрессию

Класс	Название	Роль
Растворимые факторы	IL10	IL10, IL35 и TGFβ – противовоспалительные цитокины, которые подавляют иммунный ответ [14]; их действие опосредовано механизмами, включающими как врожденные, так и адаптивные ветви иммунитета; такие механизмы включают ингибирование выработки провоспалительных цитокинов в иммунных клетках, снижение экспрессии одного из главных комплексов гистосовместимости, МНС-II, и ограничение экспрессии костимулирующих молекул [15]; эти цитокины продуцируются клетками с регуляторным фенотипом (такими как Tregs и Bregs) и способствуют индукции и поддержанию пула регуляторных клеток в целом
	IL35	
	TGFβ	
	GrB	
Мембранные молекулы	PD-L1	является лигандом для PD-1, который экспрессируется на поверхности Т-клеток; такое связывание приводит к инактивации эффекторных клеток и приобретению ими регуляторного фенотипа [18]
	CD1d	CD1d является МНС-I-подобной липид-презентирующей молекулой, которая опосредует взаимодействие с инвариантными естественными киллерными Т-клетками (iNKT), экспрессирующими CD1d-рестриктированный TCR; презентация CD1d-липидов В-клетками необходима для активации иммунных клеток и выполнения эффекторной функции в iNKT-клетках; индукция супрессивных iNKT-клеток является способом повышения иммунной толерантности для борьбы с аутоиммунными заболеваниями за счет опосредованной iNKT-клетками регуляции патогенных Т-хелперных клеток [19]
	FasL	FasL индуцирует апоптоз при связывании с Fas, экспрессируемым на эффекторных Т-клетках, а также других иммуноцитах и неиммунных клетках [20]
	TIM-1	естественным лигандом для TIM-1 является фосфатидилсерин, который обычно находится на поверхности апоптотических клеток [21]
	CD39 и CD73	CD39 (NTPDase1) – эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаза, гидролизующая АТФ до АМР, который может быть преобразован в аденозин (ADO) молекулой CD73 (экто-5'-нуклеотидаза); АДО принимает участие в индукции иммуносупрессивного ответа, так как он усиливает противовоспалительную функцию регуляторных Т-лимфоцитов (Tregs) и подавляет эффекторные ответы Т-клеток [22]; избыток АДО при мутациях в гене аденозиндезаминазы приводит к тяжелому иммунодефициту [23]; CD39 широко представлен на В-клетках, но высокая экспрессия CD39 в комбинации с CD73 специфичны для В-клеток с иммуносупрессивной активностью [4]

века – CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> и CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> Bregs [24]. Надо иметь в виду, что эти субпопуляции скорее обогащены регуляторными В-клетками, чем полностью являются регуляторными, поскольку четкое фенотипическое разделение Bregs на субпопуляции является предметом дискуссии [25, 26]. Обычно субпопуляцию лимфоцитов CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> рассматривают в качестве регуляторных В-клеток памяти (mBregs), а CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> клетки – как транзиторные tBregs [4, 27, 28].

Определение возможных механизмов реализации иммуносупрессии представляет особый интерес, поскольку разные субпопуляции Bregs могут вносить дифференциальный вклад в патогенез различных заболеваний: так, показано преимущественное участие tBregs в прогрессии инвазивной карциномы молочной железы и рака желудка [29, 30], в то же время при системной красной волчанке и аллергическом рините наиболее выражено нарушение функционирования mBregs [31, 32]. Понимание основных молекулярных механизмов иммуносупрессии субпопуляциями Bregs может способствовать развитию подходов по тонкой настройке их противовоспалительной активности, что в случае онкологических заболеваний позволит преодолеть нежелательные эффекты, связанные с иммуносупрессией, а в случае аллергии и аутоиммунных заболеваний – усилить активность Bregs.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Поиск данных РНК-секвенирования, оценка их качества и количественное определение чтений.** Поиск данных РНК-секвенирования регуляторных В-клеток происходил с помощью общедоступного открытого геномного репозитория NCBI Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Для дальнейшего анализа был использован набор данных GSE151415 в формате FASTQ, полученный в работе Hasan et al. [33] путем РНК-секвенирования (платформа Illumina NextSeq 500) В-лимфоцитов, выделенных из периферической крови 6 здоровых доноров. Нами были проанализированы сиквенсы из P1 (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>IgD<sup>+</sup>) субпопуляции, а также объединенные сиквенсы из P2 (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD39<sup>hi</sup>IgD<sup>+</sup>) и P4 (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD39<sup>hi</sup>IgD<sup>-</sup>) субпопуляций В-клеток до и после 16-часовой активации с помощью CpG. Для оценки качества образцов использовалась программа MultiQC [34], которая производит анализ качества данных секвенирования и составляет отчет о них в

формате HTML. Внутри себя MultiQC использует такие инструменты, как Subread featureCounts [35], STAR (универсальный выравниватель РНК-секвенирования) [36], Cutadapt (находит и удаляет последовательности адаптеров, праймеры, хвосты поли-А и другие типы нежелательных последовательностей из прочтений) [37], а также FastQC (программа контроля качества для последовательностей, полученных в результате высокопроизводительного секвенирования).

Для количественного анализа результатов РНК-секвенирования с высокой точностью использовалась программа Kallisto [38], которая позволяет проводить псевдо-выравнивание нуклеотидных последовательностей. На выходе Kallisto выдавал экспрессию генов в estimated counts (количество чтений, которые были выравнены на транскрипт в каждом образце).

**Анализ дифференциальной экспрессии генов и визуализация.** Для идентификации дифференциально экспрессируемых транскриптов внутри образцов нестимулированных и активированных tBregs (P1) и mBregs (P2 + P4) субпопуляций была использована программа edgeR (программный пакет Bioconductor) [39]. Дифференциальная экспрессия оценивалась для каждого гена с использованием точного теста, аналогичного точному тесту Фишера, но адаптированного для сверхдисперсных данных. Для подсчета дифференциальной экспрессии применялся  $\log_2FC$ . FC (fold change) – это мера, показывающая изменение величины между значениями, она определяется как отношение между двумя величинами (в нашем случае – экспрессия каждого гена до и после активации). Логарифм использовался для упрощения интерпретации результатов. Для анализа отбирались гены, разница дифференциальной экспрессии которых имела значение  $p < 0,05$ .

Тепловая карта была построена с помощью функции heatmap из пакета seaborn (библиотека визуализации данных Python; <https://seaborn.pydata.org/generated/seaborn.heatmap.html>) [40].

**Анализ обогащения функциональных групп генов (enrichment analysis).** Для идентификации биологических процессов, в которые вовлечены наиболее дифференциально экспрессируемые гены после активации Bregs была использована интегральная онлайн-платформа metascape.org [41], с помощью которой также были получены  $-\log_{10}(P)$  значения обогащения групп генов, позволяющие судить о достоверности такого обогащения. Для аннотации генов данная платформа, используя словарь геной онтологии (Gene Ontology, GO),

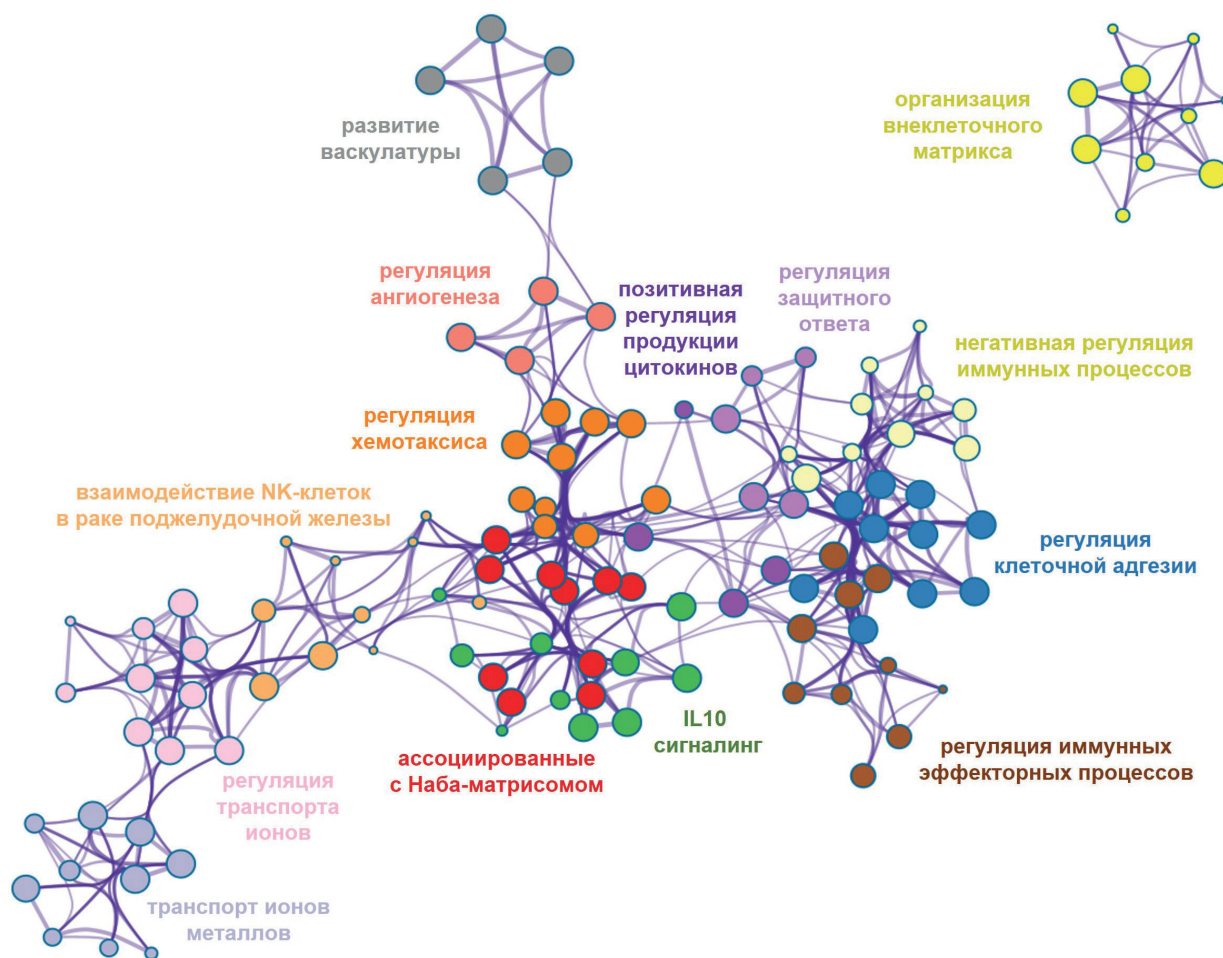
присваивала каждому гену термин GO (GO term) на основании трех переменных: специфической молекулярной функции, клеточной локализации и участия в комплексных биологических процессах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

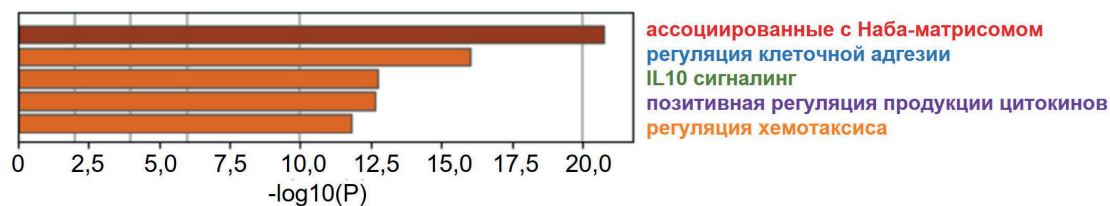
Для исследования потенциальных механизмов реализации иммуносупрессии каждой из субпопуляций регуляторных В-клеток мы

провели биоинформатический анализ данных РНК-секвенирования из работы Hasan et al. [33]. В этой статье было выделено несколько субпопуляций В-клеток, из которых субпопуляция CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>IgD<sup>+</sup> (P1) соответствовала tBregs, а субпопуляции CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD39<sup>hi</sup>IgD<sup>+</sup> (P2) и CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD39<sup>hi</sup>IgD<sup>-</sup> (P4) были объединены в mBregs. Субпопуляции P2 и P4 отличаются лишь по экспрессии IgD, т.е. являются клетками памяти с непереключенным и переключенным изотипом соответственно. В рамках нашей работы статус

**а**



**б**



**Рис. 1.** Дифференциально экспрессируемые после активации mBregs и tBregs гены ( $p < 0,05$ ) кластеризуются в иммунологически релевантные группы по данным интегральной платформы metascape.org. Каждый круг представляет собой термин GO, причем его размер пропорционален количеству распределенных в него генов, а цвет идентифицирует кластерную принадлежность (а). Наиболее обогащенные ключевые функциональные кластеры групп генов, ранжированные согласно  $-\log_{10}(P)$  значениям обогащения групп генов (б)



экспрессии IgD не имеет функционального значения, поэтому сиквенсы были объединены. Данные в формате FASTQ мы использовали для расчета дифференциальных экспрессий при помощи пакета edgeR. Чтобы определить биологические процессы, в которые вовлечены 1000 наиболее дифференциально экспрессируемых генов после активации каждой из изучаемых субпопуляций Bregs, мы провели анализ обогащения функциональных групп генов (enrichment analysis). В результате было выявлено большое число таких генов в группах, связанных с межклеточными контактами и цитокиновым сигналингом (рис. 1). Это согласуется с основными механизмами реализации иммуносупрессии Bregs.

Далее в результате дополнительного анализа существующих литературных данных из объединенного списка наиболее дифференциально экспрессируемых генов (с достоверно увеличивающейся или уменьшающейся экспрессией) были отобраны 12 генов, кодирующих молекулы, потенциально задействованные в реализации иммуносупрессии. Продукты экспрессии отобранных генов представляли собой как цитокины (IL10, IL411, TGFβ, IL35, IL27 и др.), так и мембранные молекулы (PD-L1, NID1 и др.). Отбор кандидатных генов производился на основании существующих литературных данных с использованием следующих критериев: 1) способность молекулы подавлять активность клеток-эффекторов; 2) способность молекулы индуцировать приобретение супрессорного фенотипа окружающими клетками; 3) высокая экспрессия молекулы раковыми клетками и/или опухоль-ассоциированными клетками. Затем была построена тепловая карта дифференциальной экспрессии выбранных генов в субпопуляциях mBregs и tBregs с помощью функции heatmap из пакета seaborn (рис. 2).

Анализ дифференциальной экспрессии генов до и после активации позволил идентифицировать кандидатные молекулы, которые могут определять функциональность mBregs и tBregs: как ранее известные PD-L1, EB13, IL2RA, TIGIT, IL10, IL27, так и на данный момент не охарактеризованные в контексте Bregs – ADORA2B, CST7, SIRPA, SLAMF7, NID1, IL411. Далее мы предположили несколько вариантов возможного участия выбранных молекул в реализации иммуносупрессивной функции Bregs на основании имеющейся информации об их функциональности (рис 3).

SLAMF7 является трансмембранным гликопротеином из семейства сигнальных лимфоцитарных молекул активации и экспрессиру-

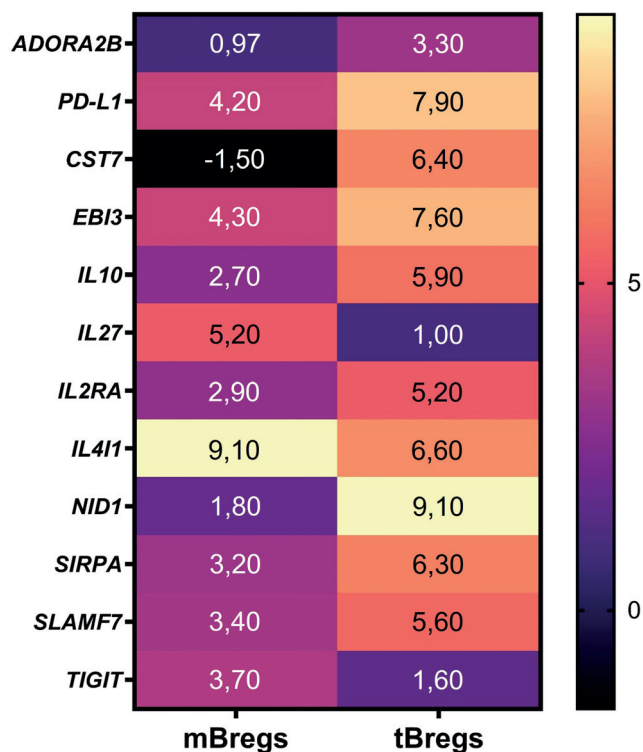


Рис. 2. Тепловая карта log<sub>2</sub>FC значений дифференциальной экспрессии отобранных кандидатных генов в субпопуляциях mBregs и tBregs. Положительные значения log<sub>2</sub>FC свидетельствуют о повышении уровня экспрессии соответствующего гена после активации клеток. Цветовая шкала указывает на уровень экспрессии гена от низкого (темный) до высокого (светлый)

ется макрофагами, Т- и NK-клетками, а также на высоком уровне представлен на поверхности опухолей В-клеточного происхождения, в частности при множественной миеломе, где представляет собой перспективную терапевтическую мишень [42]. O’Connell et al. [43] показали, что в экспериментах *ex vivo* взаимодействия SLAMF7–SLAMF7 между опухоль-ассоциированными макрофагами и CD8<sup>+</sup> Т-клетками индуцировали экспрессию ингибиторных рецепторов Т-клетками, а также способствовали приобретению ими истощенного фенотипа. Также они обнаружили, что мыши, нокаутные по SLAMF7, менее восприимчивы к экспериментальной пересаживаемой меланоме. Анализ дифференциальной экспрессии генов показывает, что SLAMF7 на высоком уровне представлен в активированных регуляторных В-клетках, особенно в субпопуляции tBregs (рис. 2). Согласно нашей гипотезе, Bregs могут реализовывать свою иммуносупрессивную активность за счет образования контактов SLAMF7–SLAMF7 с эффекторными клетками, инактивируя их, а также с опухолевыми клетками, способствуя их пролиферации (рис. 3).

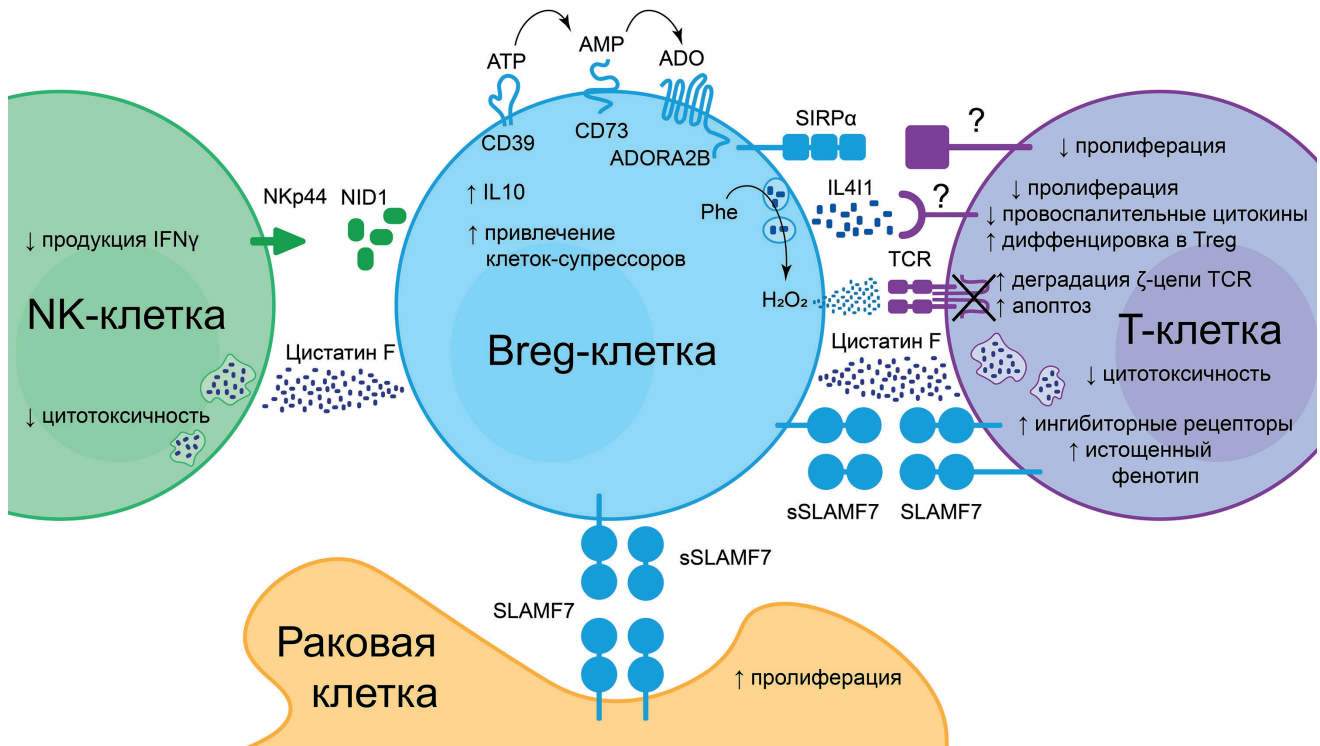


Рис. 3. Новые потенциальные механизмы функционирования регуляторных В-клеток

Также существуют сведения о том, что клетки множественной миеломы способны производить растворимый SLAMF7 (sSLAMF7), повышенные концентрации которого обнаруживаются в сыворотке больных [44, 45]. Мы предполагаем, что Bregs также могут осуществлять иммуносупрессию и способствовать пролиферации опухолевых клеток не только за счет мембранных взаимодействий SLAMF7–SLAMF7, но и при помощи продукции растворимой формы sSLAMF7.

IL411 является IL4-индуцируемой оксидазой аминокислот и может катаболизировать фенилаланин до перекиси водорода, которая вызывает деградацию ζ-цепей TCR и индуцирует апоптоз Т-клеток [46]. В то же время особым действием этот фермент обладает по отношению к наивным Т-клеткам: он способствует их дифференцировке в Tregs [47]. Boulland et al. [48] показали, что IL411 оказывает антипролиферативное действие на Т-клетки, причем в качестве клеток-продуцентов IL411 изучали дендритные клетки, которые способны образовывать иммунологический синапс с Т-клетками в ходе презентации антигена. Ранее также было показано, что макрофаги, экспрессирующие IL411, аутокринно воздействуют сами на себя, приобретая M2-фенотип [49], также известно, что этот фермент производится В-клетками под воздействием IL4 [50]. Результаты нашего анализа показывают, что

экспрессия *IL411* значительно возрастает в обеих субпопуляциях после активации (рис. 2). Мы предполагаем, что при воспалительных реакциях Bregs также способны продуцировать IL411, что может привести к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-зависимому подавлению функции эффекторных клеток и образованию Tregs и M2-макрофагов (рис. 3).

**Цистатин F**, кодируемый геном *CST7*, является ингибитором цистеиновых пептидаз, в частности, катепсинов С и Н, активирующих гранзимы, и катепсина L – активатора перфорины [51], т.е. является естественным регулятором активности цитотоксических лимфоцитов [52]. Prunk et al. [53] доказали, что повышенный уровень цистатина F коррелирует с пониженной цитотоксической активностью клеток-эффекторов. В другой работе было выдвинуто предположение, что супрессия катепсина С цистатином F может представлять собой новый механизм противовоспалительного действия нейтрофилов [54]. Интересно, что по результатам анализа дифференциальной экспрессии генов транскрипция *CST7* значительно усиливается после активации tBregs, но понижается после активации субпопуляции mBregs (рис. 2). Мы предполагаем, что секретуемый tBregs цистатин F способен также ингибировать ферменты, вовлеченные в активацию гранзимов и перфоринов, тем самым подавляя цитотоксическую активность лимфоцитов (рис. 3).

**NID1** является лигандом рецептора НКр44, экспрессируемого НК-лимфоцитами, причем взаимодействие этого активирующего рецептора с секретируемой формой NID1 приводит к нарушению продукции провоспалительных цитокинов, в частности  $IFN\gamma$ , естественными киллерами [55]. В ходе анализа дифференциальной экспрессии генов оказалось, что уровень транскрипции *NID1* существенно возрастает после активации tBregs, но не mBregs (рис. 2). Мы предполагаем, что субпопуляция tBregs может оказывать супрессивное воздействие на НК-лимфоциты в том числе и путем NID1-зависимой активации их рецептора НКр44 (рис. 3).

**SIRPA** является ингибиторным рецептором, взаимодействующим с CD47. Такое взаимодействие блокирует фагоцитоз за счет нарушения интегринавого сигналинга в макрофагах [56]. Известно, что субпопуляция  $SIRPA^+$ -макрофагов оказывала супрессивное воздействие на функциональность Т-лимфоцитов. Кроме того, было показано, что клетки  $CD14^+SIRPA^+$  подавляют пролиферативные способности  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток *in vitro*, в то время как  $SIRPA^-$ -макрофаги не влияли на скорость деления Т-лимфоцитов, однако механизм данного процесса пока неизвестен [57]. mBregs и tBregs после активации экспрессируют *SIRPA* на высоком уровне (рис. 2), поэтому существует вероятность, что эти субпопуляции Bregs способны подавлять активность Т-лимфоцитов, а также другие эффекторные клетки подобным образом (рис. 3).

**ADORA2B** – один из четырех рецепторов естественного иммуносупрессанта аденозина. ADORA2B активно экспрессируется на опухолевых клетках [58]. Bregs экспрессируют CD39 и CD73, которые в результате последовательных реакций метаболизируют АТФ в АДО [12]. Взаимодействие АДО–ADORA2B запускает внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к подавлению иммунного ответа путем повышения экспрессии хемокинов, привлекающих клетки-супрессоры в опухолевое микроокружение [59] или продукции IL10 клетками опухолевого микроокружения [60]. Согласно проведенному анализу, ADORA2B-опосредованная иммуносупрессия наиболее характерна для

субпопуляции tBregs (рис. 2). Мы полагаем, что Bregs, экспрессирующие рецептор ADORA2B, могут в ходе аденозин-зависимой активации продуцировать противовоспалительный цитокин IL10 и хемокины, тем самым привлекая к месту воспаления дополнительные регуляторные клетки иммунной системы и повышая уровень иммуносупрессии (рис. 3).

В представленном исследовании были выдвинуты гипотезы о возможном существовании новых, ранее не исследованных механизмов иммуносупрессии, осуществляемых основными субпопуляциями регуляторных В-клеток периферической крови человека. В ходе последовательного анализа открытых транскриптомных данных было отобрано 6 кандидатных генов, которые могут определять иммуносупрессивную активность субпопуляций mBregs и tBregs. Причем IL4I1-, SIRPA- и SLAMF7-зависимые механизмы иммуносупрессии могут быть свойственны для обеих субпопуляций Bregs, а CST7-, NID1- и ADORA2B-зависимые механизмы могут быть характерны, преимущественно, для субпопуляции tBregs. Для подтверждения предложенных гипотез планируется экспериментальная верификация роли отобранных кандидатных молекул в релевантных клеточных системах.

**Вклад авторов.** Э.А. Жеремян и К.В. Корнеев – концепция и руководство работой; Э.А. Жеремян, А.С. Устюгова, А.И. Радько, К.В. Корнеев – экспериментальная работа; Э.А. Жеремян и Е.М. Стасевич – подготовка иллюстраций; А.Н. Уварова, Н.А. Митькин и Д.В. Купраш – обсуждение результатов исследования; Э.А. Жеремян – написание текста; Д.В. Купраш и К.В. Корнеев – редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-00106 (биоинформатический анализ) и грант № 22-14-00398 (анализ литературных данных)).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Katz, S. I., Parker, D., and Turk, J. L. (1974) B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions, *Nature*, **251**, 550-551, doi: 10.1038/251550a0.
2. Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S., and Bhan, A. K. (2002) Chronic intestinal inflammatory condition generates IL10-



- producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation, *Immunity*, **16**, 219-230, doi: 10.1016/s1074-7613(02)00274-1.
3. Wu, H., Su, Z., and Barnie, P. A. (2020) The role of B regulatory (B10) cells in inflammatory disorders and their potential as therapeutic targets, *Int. Immunopharmacol.*, **78**, 106111, doi: 10.1016/j.intimp.2019.106111.
  4. Jansen, K., Cevhertas, L., Ma, S., Satitsuksanoa, P., Akdis, M., and van de Veen, W. (2021) Regulatory B cells, A to Z, *Allergy*, **76**, 2699-2715, doi: 10.1111/all.14763.
  5. Yanaba, K., Kamata, M., Ishiura, N., Shibata, S., Asano, Y., Tada, Y., Sugaya, M., Kadono, T., Tedder, T. F., and Sato, S. (2013) Regulatory B cells suppress imiquimod-induced, psoriasis-like skin inflammation, *J. Leukoc. Biol.*, **94**, 563-573, doi: 10.1189/jlb.1112562.
  6. Inoue, S., Leitner, W. W., Golding, B., and Scott, D. (2006) Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity, *Cancer Res.*, **66**, 7741-7747, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3766.
  7. Sarvaria, A., Madrigal, J. A., and Saudemont, A. (2017) B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity, *Cell. Mol. Immunol.*, **14**, 662-674, doi: 10.1038/cmi.2017.35.
  8. Mauri, C., and Menon, M. (2015) The expanding family of regulatory B cells, *Int. Immunol.*, **27**, 479-486, doi: 10.1093/intimm/dxv038.
  9. Nouel, A., Pochard, P., Simon, Q., Segalen, I., Le Meur, Y., Pers, J. O., and Hillion, S. (2015) B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in A CTLA-4 dependent manner, *J. Autoimmun.*, **59**, 53-60, doi: 10.1016/j.jaut.2015.02.004.
  10. Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R. A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang V. D., Jaimes, Y., Daridon, C., Li, R., Jouneau, L., Boudinot, P., Wilantri, S., Sakwa, I., Miyazaki, Y., Leech, M. D., McPherson, R. C., Wirtz, S., Neurath, M., Hoehlig, K., Meinl, E., Grutzkau, A., Grun, J. R., Horn, K., Kuhl, A. A., Dorner, T., Bar-Or, A., Kaufmann, S. H. E., Anderton, S. M., and Fillatreau, S. (2014) IL35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases, *Nature*, **507**, 366-370, doi: 10.1038/nature12979.
  11. Xu, L., Liu, X., Liu, H., Zhu, L., Zhu, H., Zhang, J., Ren, L., Wang, P., Hu, F., and Su, Y. (2017) Impairment of granzyme B-producing regulatory B cells correlates with exacerbated rheumatoid arthritis, *Front. Immunol.*, **8**, 768, doi: 10.3389/fimmu.2017.00768.
  12. Figueiro, F., Muller, L., Funk, S., Jackson, E. K., Battastini, A. M., and Whiteside, T. L. (2016) Phenotypic and functional characteristics of CD39(high) human regulatory B cells (Breg), *Oncoimmunology*, **5**, e1082703, doi: 10.1080/2162402X.2015.1082703.
  13. Sokolov, A. V., Shmidt, A. A., and Lomakin, Y. A. (2018) B cell regulation in autoimmune diseases, *Acta Naturae*, **10**, 11-22, doi: 10.32607/20758251-2018-10-3-11-22.
  14. Matsushita, T. (2019) Regulatory and effector B cells: friends or foes? *J. Dermatol. Sci.*, **93**, 2-7, doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.11.008.
  15. Kalampokis, I., Yoshizaki, A., and Tedder, T. F. (2013) IL10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease, *Arthritis Res. Ther.*, **15**, S1, doi: 10.1186/ar3907.
  16. Bots, M., and Medema, J. P. (2006) Granzymes at a glance, *J. Cell Sci.*, **119**, 5011-5014, doi: 10.1242/jcs.03239.
  17. Wieckowski, E., Wang, G. Q., Gastman, B. R., Goldstein, L. A., and Rabinowich, H. (2002) Granzyme B-mediated degradation of T-cell receptor zeta chain, *Cancer Res.*, **62**, 4884-4889.
  18. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999) B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion, *Nat. Med.*, **5**, 1365-1369, doi: 10.1038/70932.
  19. Oleinika, K., Rosser, E. C., Matei, D. E., Nistala, K., Bosma, A., Drozdov, I., and Mauri, C. (2018) CD1d-dependent immune suppression mediated by regulatory B cells through modulations of iNKT cells, *Nat. Commun.*, **9**, 684, doi: 10.1038/s41467-018-02911-y.
  20. Tao, H., Lu, L., Xia, Y., Dai, F., Wang, Y., Bao, Y., Lundy, S. K., Ito, F., Pan, Q., Zhang, X., Zheng, F., Shu, G., Fang, B., Jiang, J., Xia, J., Huang, S., Li, Q., and Chang, A. E. (2015) Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL10, *Eur. J. Immunol.*, **45**, 999-1009, doi: 10.1002/eji.201444625.
  21. Cherukuri, A., Mohib, K., and Rothstein, D. M. (2021) Regulatory B cells: TIM-1, transplant tolerance, and rejection, *Immunol. Rev.*, **299**, 31-44, doi: 10.1111/imr.12933.
  22. Zacca, E. R., Amezcua Vesely, M. C., Ferrero, P. V., Acosta, C. D. V., Ponce, N. E., Bossio, S. N., Mus-sano, E., Onetti, L., Cadile, I., Acosta Rodriguez, E. V., Montes, C. L., and Gruppi, A. (2021) B cells from patients with rheumatoid arthritis show conserved CD39-mediated regulatory function and increased CD39 expression after positive response to therapy, *J. Mol. Biol.*, **433**, 166687, doi: 10.1016/j.jmb.2020.10.021.
  23. Moens, L., Hershfield, M., Arts, K., Aksenitjevich, I., and Meyts, I. (2019) Human adenosine deaminase 2 deficiency: a multi-faceted inborn error of immunity, *Immunol. Rev.*, **287**, 62-72, doi: 10.1111/imr.12722.
  24. Hasan, M. M., Thompson-Snipes, L., Klintmalm, G., Demetris, A. J., O'Leary, J., Oh, S., and Joo, H. (2019) CD24hiCD38hi and CD24hiCD27+ human regulatory B cells display common and distinct functional characteristics, *J. Immunol.*, **203**, 2110-2120, doi: 10.4049/jimmunol.1900488.



25. Catalán, D., Mansilla, M. A., Ferrier, A., Soto, L., Oleinika, K., Aguillón, J. C., and Aravena, O. (2021) Immunosuppressive mechanisms of regulatory B cells, *Front. Immunol.*, **12**, 611795, doi: 10.3389/fimmu.2021.611795.
26. Glass, M. C., Glass, D. R., Oliveria, J. P., Mbiribindi, B., Esquivel, C. O., Krams, S. M., Bendall, S. C., and Martinez, O. M. (2022) Human IL-10-producing B cells have diverse states that are induced from multiple B cell subsets, *Cell Rep.*, **39**, 110728, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110728.
27. Zhou, Y., Zhang, Y., Han, J., Yang, M., Zhu, J., and Jin, T. (2020) Transitional B cells involved in autoimmunity and their impact on neuroimmunological diseases, *J. Transl. Med.*, **18**, 1-12, doi: 10.1186/s12967-020-02289-w.
28. Lomakin, Y. A., Zvyagin, I. V., Ovchinnikova, L. A., Kabilov, M., Staroverov, D. B., Mikelov, A., Tupikin, A. E., Zakharova, M. Y., Bykova, N. A., Mukhina, V. S., Favorov, A. V., Ivanova, M., Simaniv, T., Rubtsov, Y. P., Chudakov, D. M., Zakharova, M. N., Illarioshkin, S. N., Belogurov, A. A. Jr., and Gabibov, A. G. (2022) Deconvolution of B cell receptor repertoire in Multiple Sclerosis patients revealed a delay in tBreg maturation, *Front. Immunol.*, **13**, 803229, doi: 10.3389/fimmu.2022.803229.29.
29. Guan, H., Wan, Y., Lan, J., Wang, Q., Wang, Z., Li, Y., Zheng, J., Zhang, X., Wang, Z., Shen, Y., and Xie, F. (2016) PD-L1 is a critical mediator of regulatory B cells and T cells in invasive breast cancer, *Sci. Rep.*, **6**, 35651, doi: 10.1038/srep35651.
30. Murakami, Y., Saito, H., Shimizu, S., Kono, Y., Shishido, Y., Miyatani, K., Matsunaga, T., Fukumoto, Y., Ashida, K., Sakabe, T., Nakayama, Y., and Fujiwara, Y. (2019) Increased regulatory B cells are involved in immune evasion in patients with gastric cancer, *Sci. Rep.*, **9**, 1-9, doi: 10.1038/s41598-019-49581-4.
31. Blair, P. A., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., and Mauri, C. (2010) CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients, *Immunity*, **32**, 129-140, doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009.
32. Kamekura, R., Shigehara, K., Miyajima, S., Jitsukawa, S., Kawata, K., Yamashita, K., Nagaya, T., Kumagai, A., Sato, A., Matsumiya, H., Ogasawara, N., Seki, N., Takano, K., Kokai, Y., Takahashi, H., Himi, T., and Ichimiya, S. (2015) Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma, *Clin. Immunol.*, **158**, 204-211, doi: 10.1016/j.clim.2015.02.016.
33. Hasan, M. M., Nair, S. S., O'Leary, J. G., Thompson-Snipes, L., Nyarige, V., Wang, J., Park, W., Stegall, M., Heilman, R., Klintmalm, G. B., Joo, H., and Oh, S. (2021) Implication of TIGIT<sup>+</sup> human memory B cells in immune regulation, *Nat. Commun.*, **12**, 1534, doi: 10.1038/s41467-021-21413-y.
34. Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., and Kaller, M. (2016) MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report, *Bioinformatics*, **32**, 3047-3048, doi: 10.1093/bioinformatics/btw354.
35. Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, *Bioinformatics*, **30**, 923-930, doi: 10.1093/bioinformatics/btt656.
36. Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, **29**, 15-21, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
37. Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads, *EMBnet J.*, **17**, 10-12, doi: 10.14806/ej.17.1.200.
38. Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., and Pachter, L. (2016) Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 525-527, doi: 10.1038/nbt.3519.
39. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010) EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics*, **26**, 139-140, doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
40. Waskom, M. L. (2021) Seaborn: statistical data visualization, *J. Open Source Software*, **6**, 3021, doi: 10.21105/joss.03021.
41. Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S. K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets, *Nat. Commun.*, **10**, 1523, doi: 10.1038/s41467-019-09234-6.
42. Awwad, M. H. S., Mahmoud, A., Bruns, H., Echchannaoui, H., Kriegsmann, K., Lutz, R., Raab, M. S., Bertsch, U., Munder, M., Jauch, A., Weisel, K., Maier, B., Weinhold, N., Salwender, H. J., Eckstein, V., Hanel, M., Fenk, R., During, J., Brors, B., Benner, A., Muller-Tidow, C., Goldschmidt, H., and Hundemer, M. (2021) Selective elimination of immunosuppressive T cells in patients with multiple myeloma, *Leukemia*, **35**, 2602-2615, doi: 10.1038/s41375-021-01172-x.
43. O'Connell, P., Hyslop, S., Blake, M.K., Godbehere, S., Amalfitano, A., and Aldhamen, Y. A. (2021) SLAMF7 signaling reprograms T cells toward exhaustion in the tumor microenvironment, *J. Immunol.*, **206**, 193-205, doi: 10.4049/jimmunol.2000300.
44. Kikuchi, J., Hori, M., Iha, H., Toyama-Sorimachi, N., Hagiwara, S., Kuroda, Y., Koyama, D., Izumi, T., Yasui, H., Suzuki, A., and Furukawa, Y. (2020) Soluble SLAMF7 promotes the growth of myeloma

- cells via homophilic interaction with surface SLAMF7, *Leukemia*, **34**, 180-195, doi: 10.1038/s41375-019-0525-6.
45. Ishibashi, M., Soeda, S., Sasaki, M., Handa, H., Imai, Y., Tanaka, N., Tanosaki, S., Ito, S., Odajima, T., Sugimori, H., Asayama, T., Sunakawa, M., Kaito, Y., Kinoshita, R., Kuribayashi, Y., Onodera, A., Moriya, K., Tanaka, J., Tsukune, Y., Komatsu, N., Inokuchi, K., and Tamura, H. (2018) Clinical impact of serum soluble SLAMF7 in multiple myeloma, *Oncotarget*, **9**, 34784-34793, doi: 10.18632/oncotarget.26196.
  46. Otsuji, M., Kimura, Y., Aoe, T., Okamoto, Y., and Saito, T. (1996) Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13119-13124, doi: 10.1073/pnas.93.23.13119.
  47. Cousin, C., Aubatin, A., Le Gouvello, S., Apetoh, L., Castellano, F., and Molinier-Frenkel, V. (2015) The immunosuppressive enzyme IL4I1 promotes FoxP3(+) regulatory T lymphocyte differentiation, *Eur. J. Immunol.*, **45**, 1772-1782, doi: 10.1002/eji.201445000.
  48. Boulland, M. L., Marquet, J., Molinier-Frenkel, V., Moller, P., Guiter, C., Lasoudris, F., Copie-Bergman, C., Baia, M., Gaulard, P., Leroy, K., and Castellano, F. (2007) Human IL4I1 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation, *Blood*, **110**, 220-227, doi: 10.1182/blood-2006-07-036210.
  49. Yue, Y., Huang, W., Liang, J., Guo, J., Ji, J., Yao, Y., Zheng, M., Cai, Z., Lu, L., and Wang, J. (2015) IL4I1 is a novel regulator of M2 macrophage polarization that can inhibit T cell activation via L-tryptophan and arginine depletion and IL10 production, *PLoS One*, **10**, e0142979, doi: 10.1371/journal.pone.0142979.
  50. Prevost-Blondel, A., and Richard, Y. (2019) Interleukin 4-induced gene 1 as an emerging regulator of B-cell biology and its role in cutaneous melanoma, *Crit. Rev. Immunol.*, **39**, 39-57, doi: 10.1615/CritRevImmunol.2019030020.
  51. Ni, J., Fernandez, M. A., Danielsson, L., Chillakuru, R. A., Zhang, J., Grubb, A., Su, J., Gentz, R., and Abrahamson, M. (1998) Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor, *J. Biol. Chem.*, **273**, 24797-24804, doi: 10.1074/jbc.273.38.24797.
  52. Kos, J., Nanut, M. P., Prunk, M., Sabotic, J., Dautovic, E., and Jewett, A. (2018) Cystatin F as a regulator of immune cell cytotoxicity, *Cancer Immunol. Immunother.*, **67**, 1931-1938, doi: 10.1007/s00262-018-2165-5.
  53. Prunk, M., Nanut, M. P., Sabotic, J., Svajger, U., and Kos, J. (2019) Increased cystatin F levels correlate with decreased cytotoxicity of cytotoxic T cells, *Radiol. Oncol.*, **53**, 57-68, doi: 10.2478/raon-2019-0007.
  54. Sawyer, A. J., Garand, M., Chaussabel, D., and Feng, C. G. (2021) Transcriptomic profiling identifies neutrophil specific upregulation of cystatin f as a marker of acute inflammation in humans, *Front. Immunol.*, **12**, 634119, doi: 10.3389/fimmu.2021.634119.
  55. Gaggero, S., Bruschi, M., Petretto, A., Parodi, M., Del Zotto, G., Lavarello, C., Prato, C., Santucci, L., Barbuto, A., Bottino, C., Candiano, G., Moretta, A., Vitale, M., Moretta, L., and Cantoni, C. (2018) Nidogen-1 is a novel extracellular ligand for the NKp44 activating receptor, *Oncoimmunology*, **7**, e1470730, doi: 10.1080/2162402X.2018.1470730.
  56. Morrissey, M. A., Kern, N., and Vale, R. D. (2020) CD47 ligation repositions the inhibitory receptor SIRPA to suppress integrin activation and phagocytosis, *Immunity*, **53**, 290-302, doi: 10.1016/j.immuni.2020.07.008.
  57. Chen, Y. P., Kim, H. J., Wu, H., Price-Troska, T., Villasboas, J. C., Jalali, S., Feldman, A. L., Novak, A. J., Yang, Z. Z., and Ansell, S. M. (2019) SIRPalpha expression delineates subsets of intratumoral monocyte/macrophages with different functional and prognostic impact in follicular lymphoma, *Blood Cancer J.*, **9**, 84, doi: 10.1038/s41408-019-0246-0.
  58. Mittal, D., Sinha, D., Barkauskas, D., Young, A., Kalimutho, M., Stannard, K., Caramia, F., Haibe-Kains, B., Stagg, J., Khanna, K. K., Loi, S., and Smyth, M. J. (2016) Adenosine 2B receptor expression on cancer cells promotes metastasis, *Cancer Res.*, **76**, 4372-4382, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0544.
  59. Ryzhov, S., Novitskiy, S. V., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A. E., Carbone, D. P., Biaggioni, I., Dikov, M. M., and Feoktistov, I. (2008) Host A(2B) adenosine receptors promote carcinoma growth, *Neoplasia*, **10**, 987-995, doi: 10.1593/neo.08478.
  60. Morello, S., and Miele, L. (2014) Targeting the adenosine A2b receptor in the tumor microenvironment overcomes local immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells, *Oncoimmunology*, **3**, e27989, doi: 10.4161/onci.27989.

## NOVEL POTENTIAL MECHANISMS OF REGULATORY B CELL-MEDIATED IMMUNOSUPPRESSION

E. A. Zheremyan<sup>1,2\*</sup>, A. S. Ustiugova<sup>1</sup>, A. I. Radko<sup>3</sup>, E. M. Stasevich<sup>1,3</sup>, A. N. Uvarova<sup>1,2</sup>,  
N. A. Mitkin<sup>1</sup>, D. V. Kuprash<sup>1,2,3</sup>, and K. V. Korneev<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; e-mail: elyazheremyan@mail.ru, kirkorneev@gmail.com*

<sup>2</sup> *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

<sup>4</sup> *National Research Center for Hematology, 125167 Moscow, Russia*

B lymphocytes play an important role in the regulation of immune response in both normal and pathological conditions. Traditionally, the main functions of B cells were considered to be antibody production and antigen presentation, but in recent decades there have been discovered several subpopulations of regulatory B lymphocytes (Bregs) which maintain immunological tolerance and prevent overactivation of the immune system. Memory (mBregs, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>) and transitional (tBregs, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) subpopulations of Bregs are usually considered in the context of studying the role of these B cells in various human pathologies. However, the mechanisms by which these Breg subpopulations exert their immunosuppressive activity remain poorly understood. In this work, we used bioinformatic analysis of open-source RNA sequencing data to propose potential mechanisms of B cell immunosuppression. Analysis of differential gene expression before and after activation of these subpopulations allowed us to identify six candidate molecules that may determine the functionality of mBregs and tBregs. IL4I1-, SIRPA-, and SLAMF7-dependent mechanisms of immunosuppression may be characteristic of both Breg subsets, while NID1-, CST7-, and ADORA2B-dependent mechanisms may be predominantly characteristic of tBregs. An in-depth understanding of the molecular mechanisms of anti-inflammatory immune response of B lymphocytes is an important task for both basic science and applied medicine and can facilitate the introduction of new approaches to the therapy of complex diseases.

*Keywords:* regulatory B cells, immunosuppression, anti-inflammatory molecules, immune response regulation