

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЭКСПАНСИИ АКТИВИРОВАННЫХ ИЛИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ В-КЛЕТОК

С. Р. Соколова, И. Л. Григорова ✉

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Культуры В-клеток *in vitro* имеют важное значение для фундаментальной и прикладной науки: они могут быть использованы для изучения антигенной специфичности В- и Т-клеток, а также для получения моноклональных антител и других биопрепаратов. Поэтому создание оптимальных протоколов культивирования активированных В-клеток, антитело-секретирующих клеток (АСК) и В-клеток герминативных центров (ГЦ) *in vitro* остается актуальной задачей. Целью работы было подобрать условия, обеспечивающие: высокий уровень экспансии и выживаемости В-клеток, накопление АСК, образование и накопление В-клеток ГЦ. Для этого В-клетки CD27⁻ и/или CD27⁺ из периферической крови человека культивировали в присутствии фидерной линии 3T3-hCD40L, различных комбинаций цитокинов (IL21, IL4, BAFF), компонентов человеческой сыворотки или в контрольных условиях в течение 7 дней. Цитофлуориметрический анализ В-клеточных культур показал, что совместное присутствие CD40L и IL21 необходимо для достижения высокой экспансии, выживаемости и дифференцировки В-клеток с образованием CD27^{high}CD38^{high} АСК и CD95^{high}Bcl-6⁺ ГЦ-подобных клеток. Наибольшая экспансия наблюдалась в культурах из CD27-наивных клеток в присутствии компонентов человеческой сыворотки, добавление IL4 умеренно повышало долю ГЦ-подобных клеток. Максимальное накопление АСК наблюдалось в культурах из CD27⁺-В-клетки памяти. Разработанный подход позволил подобрать оптимальные условия для культивирования В-клеток *in vitro*, а также наглядно продемонстрировал влияние как отдельных цитокинов IL-21, IL-4, BAFF, так и их комбинаций на В-клеточные культуры из различных субпопуляций.

Ключевые слова: В-клетки, антитело-секретирующие клетки, АСК, В-клетки герминативных центров, ГЦ, культуры лимфоцитов человека *in vitro*, 3T3-CD40L

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-15-00545).

Благодарности: авторы благодарны Е. Закатиной за помощь в редактировании статьи.

Вклад авторов: И. Л. Григорова — дизайн исследования, концепция статьи, редактирование, утверждение конечного варианта статьи; С. Р. Соколова — постановка экспериментов, обработка результатов, написание текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 240 от 23 мая 2024 г.). Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ирина Леонидовна Григорова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; grig76@gmail.com

Статья получена: 26.09.2025 **Статья принята к печати:** 10.10.2025 **Опубликована онлайн:** 30.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.053

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

OPTIMIZATION OF HUMAN B CELL CULTURE CONDITIONS FOR EXPANSION OF ACTIVATED OR DIFFERENTIATED B CELLS

Sokolova SR, Grigorova IL ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

In vitro B cell cultures are important for fundamental and applied science: these can be used to study antigenic specificity of B and T cells, as well as to produce monoclonal antibodies and other biopharmaceuticals. That is why the development of an optimal protocol for culturing of activated B cells, antibody-secreting cells (ASCs), and germinal center (GC) B cells *in vitro* remains an urgent task. The study aimed to find the conditions ensuring the following: high B cell expansion and survival rates, ASC accumulation, GC B cell production and accumulation. For that the CD27⁻ and/or CD27⁺ B cells from human peripheral blood were cultured in the presence of the feeder 3T3-hCD40L line, various combinations of cytokines (IL21, IL4, BAFF), human serum components or under the control conditions throughout 7 days. Flow cytometry analysis of B cell cultures showed that the CD40L and IL21 co-existence was essential for achieving high B cell expansion, survival, and differentiation with the production of the CD27^{high}CD38^{high} ASCs and CD95^{high}Bcl-6⁺ GC-like cells. The highest expansion was observed in the cultures of CD27 naïve cells in the presence of human serum components. The IL4 supplementation moderately increased the share of GC-like cells. The maximum ASC accumulation was observed in the cultures of CD27⁺ memory B cells. The approach developed made it possible to find the optimal conditions for *in vitro* B cell culturing and clearly demonstrated the impact of both individual IL-21, IL-4, BAFF cytokines and their combinations on the B cell cultures of various subpopulations.

Keywords: B cells, antibody-secreting cells (ASCs), germinal center (GC) B cells, human lymphocytes cultures *in vitro*, 3T3-hCD40L

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 24-15-00545).

Acknowledgements: the authors express their gratitude to E. Zakatina for assistance in manuscript editing.

Author contribution: Grigorova IL — study design, concept of the article, editing, approval of the final version of the article; Sokolova SR — experimental procedure, processing of the results, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 240 date 23 May 2024). All subjects signed the informed consent for participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina L. Grigorova
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; grig76@gmail.com

Received: 26.09.2025 **Accepted:** 10.10.2025 **Published online:** 30.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.053

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

В-клетки и продуцируемые ими антитела обеспечивают эффективный иммунный ответ на патогены и вакцины. В процессе антиген-зависимой дифференцировки наивные В-клетки дают начало антитело-секретирующим клеткам (АСК) и клеткам памяти [1]. Помимо обеспечения гуморального иммунного ответа В-клетки могут выступать в качестве антиген-презентирующих клеток (АПК) [2]. При связывании антигена с В-клеточным рецептором (ВКР) комплекс интернализуется, и процессированные пептиды представляются на поверхности клетки в комплексе с MHCII для дальнейшего взаимодействия с CD4⁺-Т-хелперами (Th) [3]. Ключевые сигналы, которые получают В-клетки в процессе клеточной кооперации с Th, включают в себя CD40-CD40L взаимодействие, а также секретируемые цитокины IL-21 и IL-4 [4]. Получившие Т-клеточную помощь В-клетки пролиферируют и могут дифференцироваться в короткоживущие АСК или В-клетки герминативных центров (ГЦ), для которых ключевым транскрипционным фактором является Bcl6 [5, 6].

Уникальные свойства В-клеток положили начало разработке методик для их культивации *in vitro* с целью использования для различных прикладных задач: получения АПК с дальнейшим анализом антиген-специфичного Т-клеточного ответа, генерации АСК для производства антител [7, 8], создания клеточных моделей для изучения биологии лимфом [9]. Во многих работах оценивали влияние CD40L и его уровня, цитокинов, продуцируемых Т-клетками, а также цитокинов, секретируемых микроокружением внутри ГЦ, например BAFF, на В-клеточные культуры с целью изучения экспансии В-клеток и образования АСК [10–12]. Однако исследования образования Bcl6⁺-В-клеток ГЦ в культурах из человеческих В-клеток были ограниченными. Цель данной работы — подобрать оптимальные условия для экспансии В-клеток, а также для эффективной генерации АСК и/или В-клеток ГЦ *in vitro*.

В нашем исследовании был проведен анализ культур, полученных из наивных В-клеток и CD27⁺-В-клеток памяти из периферической крови человека под влиянием Т-клеточных сигналов (CD40L, IL-21, IL-4), BAFF и дополнительных компонентов среды, а также проведена оценка экспансии В-клеток и накопления АСК и Bcl6⁺-В-клеток ГЦ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн плазмиды pcDNA-hCD40LG

Последовательность гена человеческого CD40LG (NM_000074.3) была получена с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) из тотальной кДНК мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови человека с использованием прямого 5'-ATATGGATCCGC CACCATGATCGAAACATACAACCA-3' и обратного 5'- ATAT GAATTCACACTGTTTCAGAGTTTGAGTAAGCC-3' праймеров. В последовательности праймеров были включены сайты рестрикции BamHI и EcoRI на 5' и 3'-концах гена CD40LG соответственно, а также последовательность Козак (GCCACCATG) на 5'-конце гена. После обработки полученного ПЦР-продукта и вектора pcDNA3.1+ (Thermo Fisher Scientific, США, кат. № V79020) эндонуклеазами рестрикции BamHI-HF и EcoRI-HF (New England Biolabs, США, кат. № R3136 и № R3101) было проведено их лигирование с использованием набора Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs, США, кат. № M2200) с последующей

трансформацией *E. coli* штамм NEB Stable (New England Biolabs, США, кат. № C3040H). Очистку и выделение плазмиды для дальнейшей трансфекции производили с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0 («Евроген», Россия, кат. № BC221).

Получение фидерной линии мышинных фибробластов, экспрессирующих человеческий CD40L (3T3-hCD40L)

Фидерная линия 3T3-hCD40L была получена на основе клеточной линии мышинных фибробластов NIH 3T3 из коллекции клеточных культур Института вирусологии имени Д. И. Ивановского. Культивирование NIH 3T3 клеток производили в среде DMEM («ПанЭко», Россия, кат. № C415п) с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки (FBS, STEMCELL Technologies, Канада, кат. № 06472), 1× смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина («ПанЭко», Россия, кат. № A065п). Пассирование клеток осуществляли каждые 3–4 дня. Для получения клонов NIH 3T3, стабильно экспрессирующих hCD40L, клетки трансфецировали плазмидой pcDNA-hCD40LG с использованием реагента Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher Scientific, США, кат. № L3000015) согласно инструкции с последующей селекцией клонов на среде DMEM с добавлением генетицина G418 (0,5 мг/мл; Thermo Fisher Scientific, США, кат. № 10131027). Получение моноклональной линии производили методом предельных разведений. Экспрессию CD40L оценивали методом проточной цитометрии с использованием анти-CD154-FITC-антител (1 : 20; клон TRAP1, BD Bioscience, США, кат. № 561721). В работе использовали моноклональную линию с самым высоким уровнем экспрессии CD40L (рис. 1А).

Выделение МНК из периферической крови здоровых доноров

Исследование проводили в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации 2013 г. Критерии исключения пациентов: наличие инфекционного заболевания в острой фазе; наличие аутоиммунных, хронических заболеваний. Периферическую кровь здоровых доноров отбирали в вакуумные пробирки, содержащие КЗЭДТА в качестве антикоагулянта. Всего в исследовании приняли участие четыре донора, не связанные генетическим родством, возрастом от 21 до 65 лет (медиана — 39 лет). Соотношение мужчин и женщин — 1 : 1. Выделение МНК производили на градиенте фиколла («ПанЭко», Россия, кат. № P050E) в соответствии с протоколом [13]. Полученные клетки в охлажденном буфере для сортировки клеток (0,5% FBS в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS)). Подсчет клеток осуществляли на счетчике CytoSMART Cell Counter (Corning, США) с использованием трипанового синего. Выживаемость клеток была > 95%.

Окрашивание В-клеток для анализа на проточном цитофлуориметре (FACS)

Анализ В-клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием антител к поверхностным клеточным маркерам CD19, CD27, CD38, CD95 (Fas), а также внутриклеточному транскрипционному фактору Bcl6. Окрашивание и хранение клеток производили при +4 °С. Для сортировки всех В-клеток (CD3⁺CD19⁺CD20⁺) 20 × 10⁶ МНК предварительно инкубировали в блокирующем растворе с добавлением 10 мкг/мл Human Fc-block (клон K112-91, BD

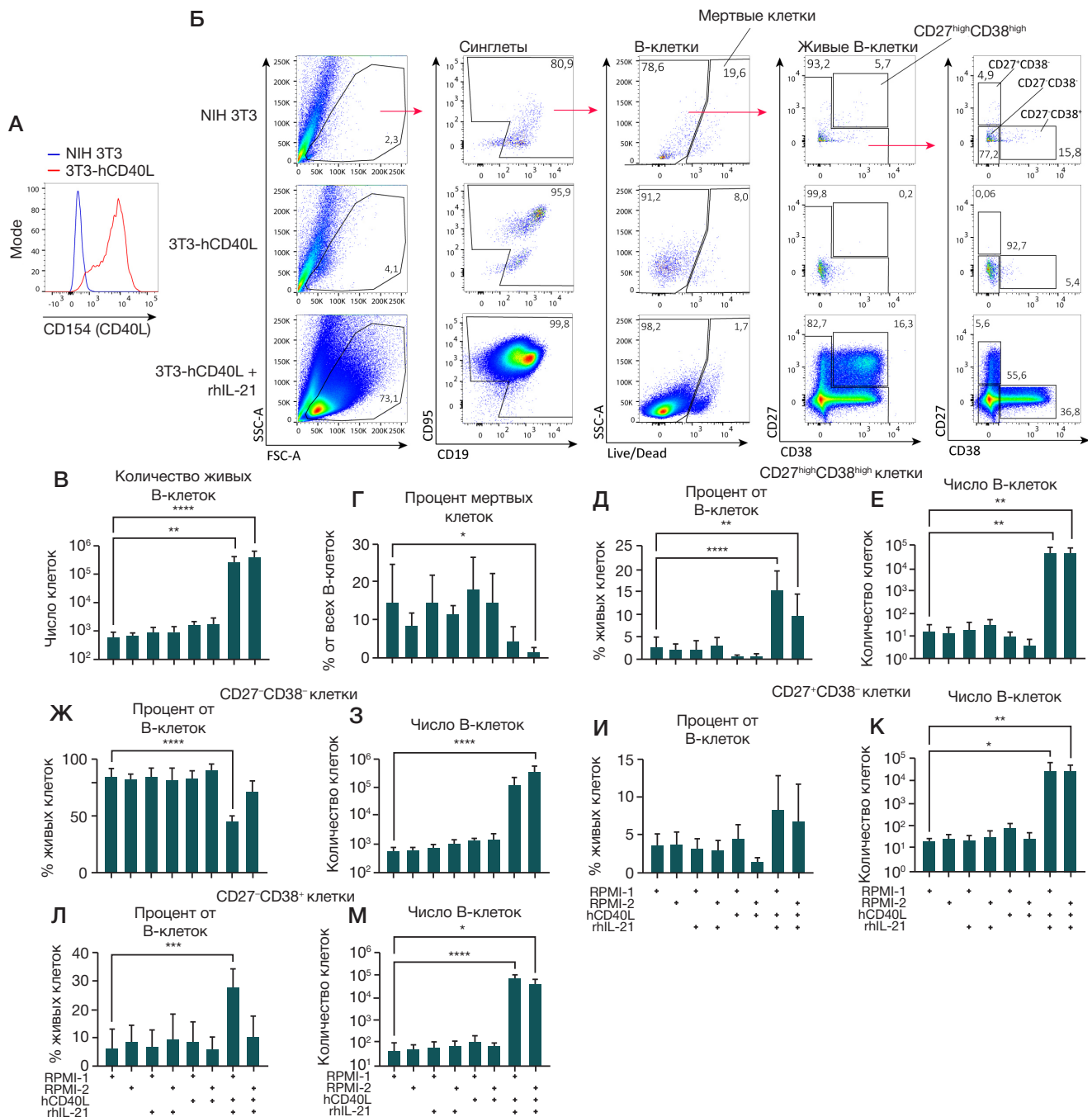


Рис. 1. Анализ влияния фидерной линии, экспрессирующей rhCD40L, цитокина IL-21 и состава культуральной среды на рост культуры В-клеток. Фидерная линия 3T3-hCD40L была получена путем трансфекции линии мышиных фибробластов NIH 3T3 плазмидой pcDNA3.1-hCD40L с получением клеточной линии, стабильно экспрессирующей трансген, и последующим отбором моноклона с наивысшим уровнем hCD40L. $1,5 \times 10^4$ (CD19⁺ CD20⁺) В-клеток, полученных в результате флуоресцентного сортирования из МНК периферической крови человека, культивировали на фидерной линии 3T3-hCD40L с/без добавления rhIL-21 (50 нг/мл) в двух различных по составу культуральных средах (RPMI-1 и RPMI-2) в течение 7 дней. Сравнение проводили относительно В-клеток, культивируемых в присутствии нетрансфицированной фидерной линии NIH 3T3. Анализ В-клеточных культур проводили методом проточной цитометрии. **А.** Гистограмма распределения уровня экспрессии hCD40L (CD154) на поверхности фидерных клеток 3T3-hCD40L (отмечена красной линией) в сравнении с контрольными нетрансфицированными фибробластами NIH 3T3 (отмечена синей линией). **Б.** Репрезентативные графики цитометрического анализа. Стратегия гейтирования указана стрелками. **В, Г.** Количество живых В-клеток (**В**) и процент мертвых В-клеток (**Г**) в культурах. **Д–М.** Количественный анализ процентного содержания среди живых В-клеток и общего числа живых В-клеток фенотипически разделенных по поверхностной экспрессии CD27 и CD38 на CD27^{high}CD38^{high}-плазматические клетки и плазмобласты (**Д, Е**), CD27^{high}CD38^{high} клетки (**Ж, З**), CD27^{high}CD38^{high} клетки (**И, К**) и CD27^{high}CD38^{high}-В-клетки (**Л, М**). На графиках представлены данные в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD) для четырех независимых опытов ($n = 4$), каждый опыт выполнен в двух репликах. Статистический анализ проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием поправки Даннетта для множественных сравнений, *, **, ***, **** — $p \leq 0,05$; 0,001; 0,0001; 0,0001 соответственно

Biosciences, США, кат. № 564220) в течение 10 мин на льду, после чего окрашивали смесью антител анти-CD3-R718 (1 : 100, клон SK7; BD Biosciences, США, кат. № 751978), анти-CD19-BV510 (1 : 100, клон SJ25C1; BD Biosciences, США, кат. № 562947), анти-CD20-FITC (1 : 20, клон L27; BD Biosciences, США, кат. № 347673) в течение 30 мин на льду

в темноте. Для сортирования CD3-CD19⁺CD20⁺CD27⁺ наивных В-клеток и CD3-CD19⁺CD20⁺CD27⁺ В-клеток памяти МНК дополнительно окрашивали анти-CD27-PerCP-Cy5.5 (1 : 50, клон М-Т271; BioLegend, США, кат. № 356408). После окрашивания клетки ресуспендировали в буфере для сортировки. Для оценки фенотипа В-клеточных

Таблица 1. Схема эксперимента для оптимизации условий культивирования CD19⁺CD20⁺ В-клеток

3T3	3T3-hCD40L	3T3	3T3-hCD40L	3T3	3T3-hCD40L	3T3	3T3-hCD40L
RPMI-1		RPMI-2		RPMI-1		RPMI-2	
-				+ IL-21			

Таблица 2. Схема эксперимента для исследования культур из CD20⁺CD27[–]-наивных В-клеток и CD20⁺CD27⁺-В-клеток памяти

3T3-hCD40L							
RPMI-2 + IL21							
CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 [–]				CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺			
–	+IL-4	–	+IL-4	–	+IL-4	–	+IL-4
–	–	+BAFF	+BAFF	–	–	+BAFF	+BAFF

культур на 7-й день клеточный супернатант отбирали из лунок без последующей трипсинизации. Отобранные клетки ресуспендировали в блокирующем буфере, после чего окрашивали с использованием следующей смеси антител: анти-CD19-BV510 (1 : 100), анти-CD27-PerCP-Cy5.5 (1 : 50), анти-CD38-APC-R700 (1 : 50, клон HIT2; BD Biosciences, США, кат. № 564979), анти-CD95-PE (1 : 100, клон DX2; BioLegend, США, кат. № 305608). Перед цитометрическим анализом клетки окрашивали с использованием Helix NP Blue в концентрации 25 нМ (Biolegend, США, кат. № 425305) для исключения мертвых клеток. Внутриклеточное окрашивание клеток производили с использованием набора True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, США, кат. № 424401) и антител анти-Bcl-6-AlexaFluor488 (1 : 20, клон: K112-91; BD Biosciences, США, кат. № 561524) в течение 12 ч. При цитометрическом анализе культур определяли следующие субпопуляции: CD19⁺CD27^{high}CD38^{high} (определяемые как ACK), CD19⁺CD38[–]CD27[–], CD19⁺CD38[–]CD27⁺, CD19⁺CD38[–]CD27[–] В-клетки, CD19⁺CD95^{high} В-клетки (соответствующие активированным В-клеткам), CD19⁺CD95^{high}Bcl6⁺ В-клетки (определяемые как В-клетки ГЦ). Сортинг В-клеток и цитометрический (FACS)-анализ В-клеточных культур проводили на клеточном сортере BD FACSAria™ III с использованием программного обеспечения FACSDiva™. Для обработки данных использовали FlowJo версии 10.8.1.

Культивирование В-клеток в присутствии клеток фидерной линии

Фибробласты 3T3-hCD40L или контрольные нетрансфецированные клетки инактивировали в среде DMEM митомицином C (5 мкг/мл; Sigma Aldrich, США, кат. № 50-07-7) в течение 2 ч, отмывали DPBS («ПанЭко», Россия, кат. № P060E) не менее 3 раз и пересаживали на шестилуночный планшет (Wuxi NEST, кат. № 703002) в количестве 3 × 10⁵ кл./луночка. На следующий день добавляли 1,5 × 10⁴ отсортированных CD19⁺CD20⁺ В-клеток. Культивирование производили в средах: RPMI-1 на основе RPMI-1640 («ПанЭко», Россия, кат. № C330п) с включением 10% FBS, 1× пирувата натрия («ПанЭко», Россия, кат. № Ф023), 1× GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, США, кат. № 35050061), 1× смеси антибиотиков) и RPMI-2 на основе richRPMI (BioinnLabs, кат. № bn-3A3R), содержащую человеческий трансферрин, инсулин, альбумин, а также глутатион и дополнительные микроэлементы и витамины, с включением 10% FBS, 1× GlutaMAX™, 1× антибиотики. Рекombинантный человеческий IL-21 (rhIL-21, SCL-store, Россия, кат. № PSG260) добавляли в среды в концентрации 50 нг/мл. CD20⁺CD27[–] и CD20⁺CD27⁺ В-клетки культивировали в RPMI-2 с добавлением

IL-21 ± IL-4 (SCL-store, Россия, кат. № PSG040, 10 нг/мл) и ± BAFF (BioLegend, США, кат. № 559604, 100 нг/мл). Культивирование производили в течение 7 дней с обновлением среды на 3-й и 5-й дни. Схемы экспериментов с культивированием всех CD19⁺CD20⁺ В-клеток, а также CD19⁺CD20⁺CD27[–] наивных и CD19⁺CD20⁺CD27⁺ В-клеток памяти в исследуемых и контрольных условиях представлены в табл. 1 и 2.

Статистический анализ результатов

Независимые опыты, указанные в исследовании, проводили на МНК из крови четверых генетически не связанных взрослых доноров. Статистический анализ был проведен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версия 9.5.1 (GraphPad Software Inc, США). Применяемые статистические методы указаны в подписях к рисункам. Различия между группами, не имеющие статистической значимости, не отмечены на графиках. Выбросы не исключены.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе работы было установлено, каким образом наличие CD40L, цитокина IL-21 или специализированных добавок в клеточной среде воздействует на выживаемость и экспансию В-клеток, а также образование ACK и В-клеток ГЦ (рис. 1, 2). Для продолжительной кокультивации В-клеток с человеческим CD40L (hCD40L) была получена трансгенная клеточная линия мышиных фибробластов NIH 3T3, стабильно экспрессирующая hCD40L (3T3-hCD40L) (рис. 1А).

В-клетки (CD19⁺CD20⁺) были получены из МНК периферической крови человека в результате флуоресцентного сортирования (с чистотой популяции > 99%). 1,5 × 10⁴ В-клеток культивировали в течение 7 дней в шестилуночном планшете в присутствии фидеров 3T3-hCD40L, или контрольных нетрансфецированных 3T3-клеток. Для культивации использовали две среды: стандартную RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, натрия пирувата, глутамин (обозначенная как RPMI-1) или такую же среду, обогащенную добавками из человеческой сыворотки, включая рекомбинантный инсулин, трансферрин, липид-обогащенный альбумин, глутатион, а также дополнительными микроэлементами и витаминами (RPMI-2). IL-21 добавляли в концентрации 50 нг/мл (табл. 1).

Цитометрический анализ полученных В-клеточных культур (рис. 1Б) показал, что при совместном действии hCD40L и IL-21 достигается наибольший уровень экспансии В-клеток (рис. 1В) и увеличивается выживаемость

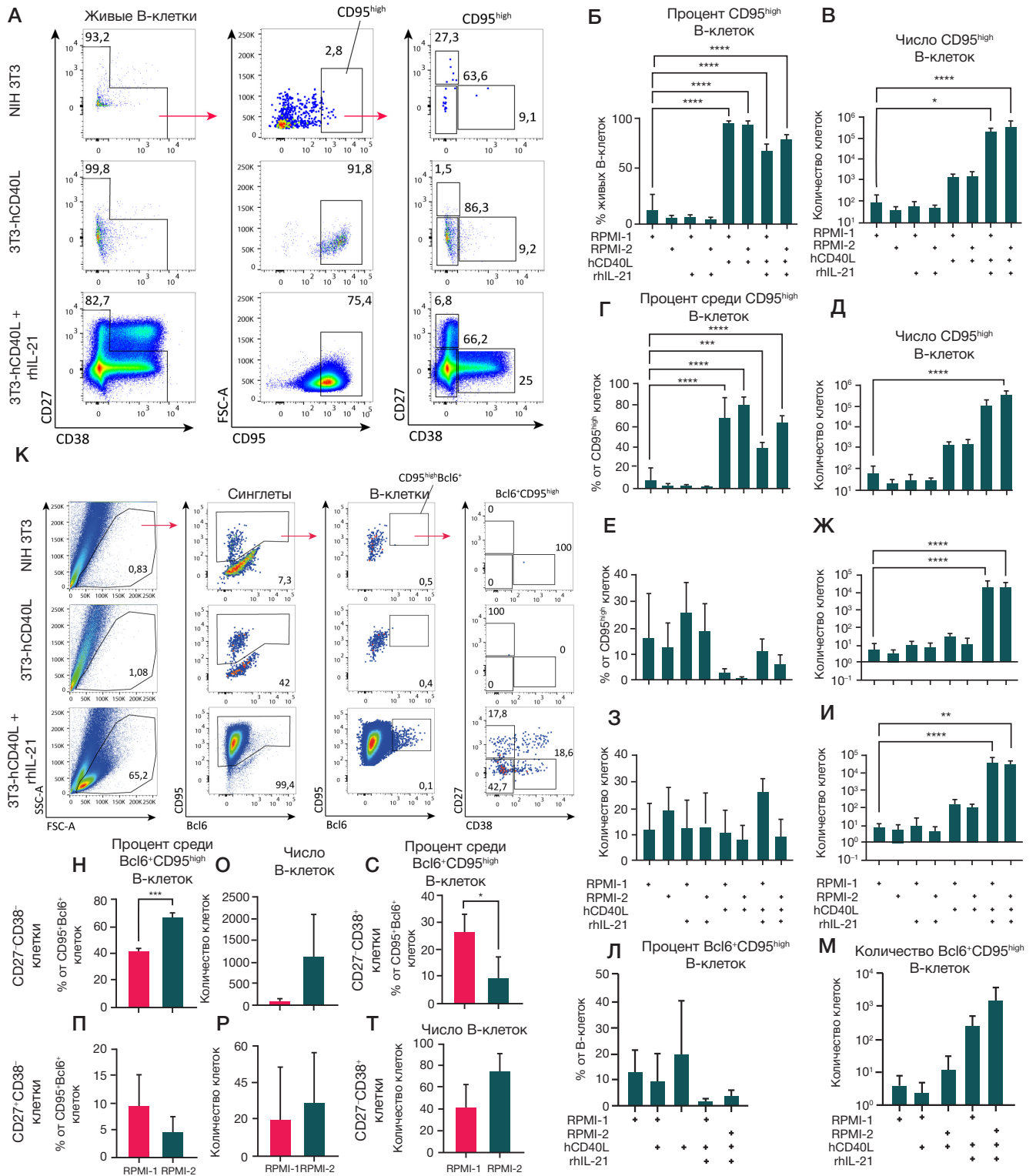


Рис. 2. Анализ влияния CD40L, IL-21 и состава культуральной среды на поверхностную экспрессию CD95 и внутриклеточную экспрессию транскрипционного фактора Bcl6 в В-клеточных культурах. **А–И.** Анализ поверхностной экспрессии CD95 и коэкспрессии CD27 и CD38 на В-клетках в культурах (исключаящий CD27^{high}CD38^{high}-плазматические клетки). Репрезентативные графики цитометрического анализа (**А**). Стратегия гейтирования указана стрелками. **Б, В.** Количественный анализ процентного содержания (**Б**) и абсолютное число (**В**) CD95^{high}-В-клеток в культурах. **Г–И.** Количественный анализ процентного содержания В-клеток и абсолютное число живых CD95^{high}-В-клеток для CD27⁺CD38⁺ (**Г, Д**), CD27⁺CD38⁺ (**Е, Ж**) и CD27⁺CD38⁺ (**З, И**) В-клеток. **К–Т.** Культивированные в присутствии фидерной линии NIH 3Т3, экспрессирующей hCD40L, с/без rhIL-21 (50 нг/мл) в RPMI-1 или RPMI-2 культуры В-клеток были фиксированы и пермеабелизированы для окрашивания внутриклеточного транскрипционного фактора Bcl6. Сравнение проводили относительно В-клеток, культивируемых в присутствии нетрансфецированной линии NIH 3Т3. Репрезентативные графики цитометрического анализа фиксированных В-клеток из культуры. Стратегия гейтирования указана стрелками (**К**). Количественный анализ процентного содержания (**Л**) и абсолютного числа (**М**) Bcl6⁺CD95^{high}-В-клеток от общего клеточного В-клеток. Количественный анализ процентного содержания и абсолютного числа CD27⁺CD38⁺ (**Н, О**), CD27⁺CD38⁺ (**П, Р**) и CD27⁺CD38⁺ (**С, Т**) Bcl6⁺CD95^{high}-В-клеток. На графиках представлены данные в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD) для четырех независимых опытов ($n = 4$), каждый опыт выполнен в двух репликах. Статистический анализ субпопуляций CD95^{high}-В-клеток (**Б–И**), а также Bcl6⁺CD95^{high}-В-клеток (**Л, М**) проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием поправки Даннета для множественных сравнений. Статистический анализ субпопуляций Bcl6⁺CD95^{high}-В-клеток (**Н–Т**) проводили методом непарного Т-теста. *, **, ***, **** — $p \leq 0,05$; 0,001; 0,0001; 0,0001 соответственно

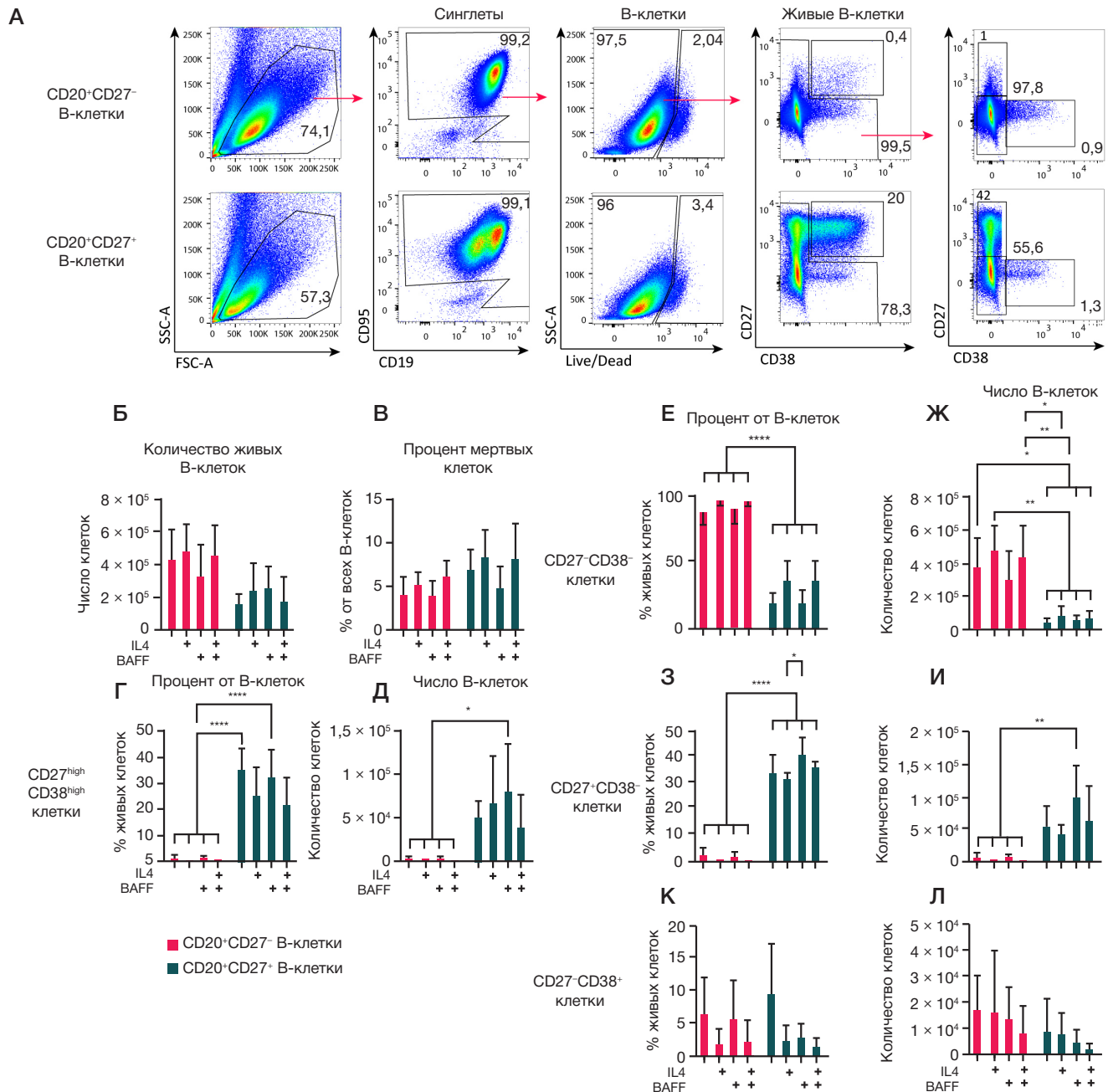


Рис. 3. Анализ влияния различных композиций цитокинов на культуры из CD27⁻-В-клеток и CD27⁺-В-клеток памяти. Преимущественно наивные В-клетки (CD19⁺CD20⁺CD27⁻) и В-клетки памяти (CD19⁺CD20⁺CD27⁺), полученные из МНК крови в результате FACS, в количестве $1,5 \times 10^4$ культивировали на фидерных клетках 3T3, экспрессирующих hCD40L, в культуральной среде RPMI-2 в присутствии rhIL-21 (50 нг/мл), с/без добавления цитокинов rhIL-4 (10 нг/мл) и rhBAFF (100 нг/мл) в течение 7 дней. Анализ клеточных культур производили методом проточной цитометрии. **А**. Репрезентативные графики цитометрического анализа. Стрелками указана стратегия гейтирования. **Б**, **В**. Количество живых В-клеток (**Б**) и процент мертвых В-клеток (**В**) в культурах. **Г**–**Л**. Количественный анализ процентного содержания среди живых В-клеток и абсолютного числа CD27^{high}CD38^{high}-плазматических клеток и плазмбластов (**Г**, **Д**), CD27⁺CD38⁺ (**Е**, **Ж**), CD27⁺CD38⁺ (**З**, **И**) и CD27⁺CD38⁺ (**К**, **Л**) В-клеток. На графиках представлены данные в виде среднего значения $\pm$ стандартного отклонения (SD) для четырех независимых опытов ($n = 4$), каждый опыт выполнен в двух репликах. Статистический анализ проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием критерия Тьюки для множественных сравнений, *, **, ***, **** — $p \leq 0,05$; 0,001; 0,0001; 0,0001 соответственно

В-клеток, особенно при включении в среду добавок в виде рекомбинантных белков из человеческой сыворотки (рис. 1Г).

В культурах с hCD40L и IL-21 также наблюдается наибольшее накопление CD27^{high}CD38^{high} ACK (рис. 1Д, Е), повышение числа (но не процентного содержания) CD27⁺CD38⁺-В-клеток (рис. 1Ж, З) и накопление CD27⁺- и CD38⁺-В-клеток (рис. 1И–М), причем при культивировании в RPMI-1 процент CD27⁺CD38⁺-В-клеток был заметно выше (рис. 1Л).

В-клетки ГЦ характеризуются повышенной поверхностной экспрессией CD95 (Fas) и присутствием внутриклеточного

транскрипционного фактора Bcl6 [5]. Экспрессия CD95 также повышается на активированных В-клетках [15]. Исходя из этого, мы оценили экспрессию CD95 на поверхности В-клеток в культуре как маркера клеточной активации (рис. 2А).

Анализ полученных данных показал, что в присутствии 3T3-hCD40L-клеток до 97% В-клеток в культуре повышают поверхностную экспрессию CD95 (рис. 2А–В), а добавление IL-21 заметно не влияет на процент CD95^{high}-В-клеток (рис. 2Б). При этом до 80% всех CD95^{high}-В-клеток имеют фенотип CD27⁺CD38⁺ (рис. 2Г, Д).

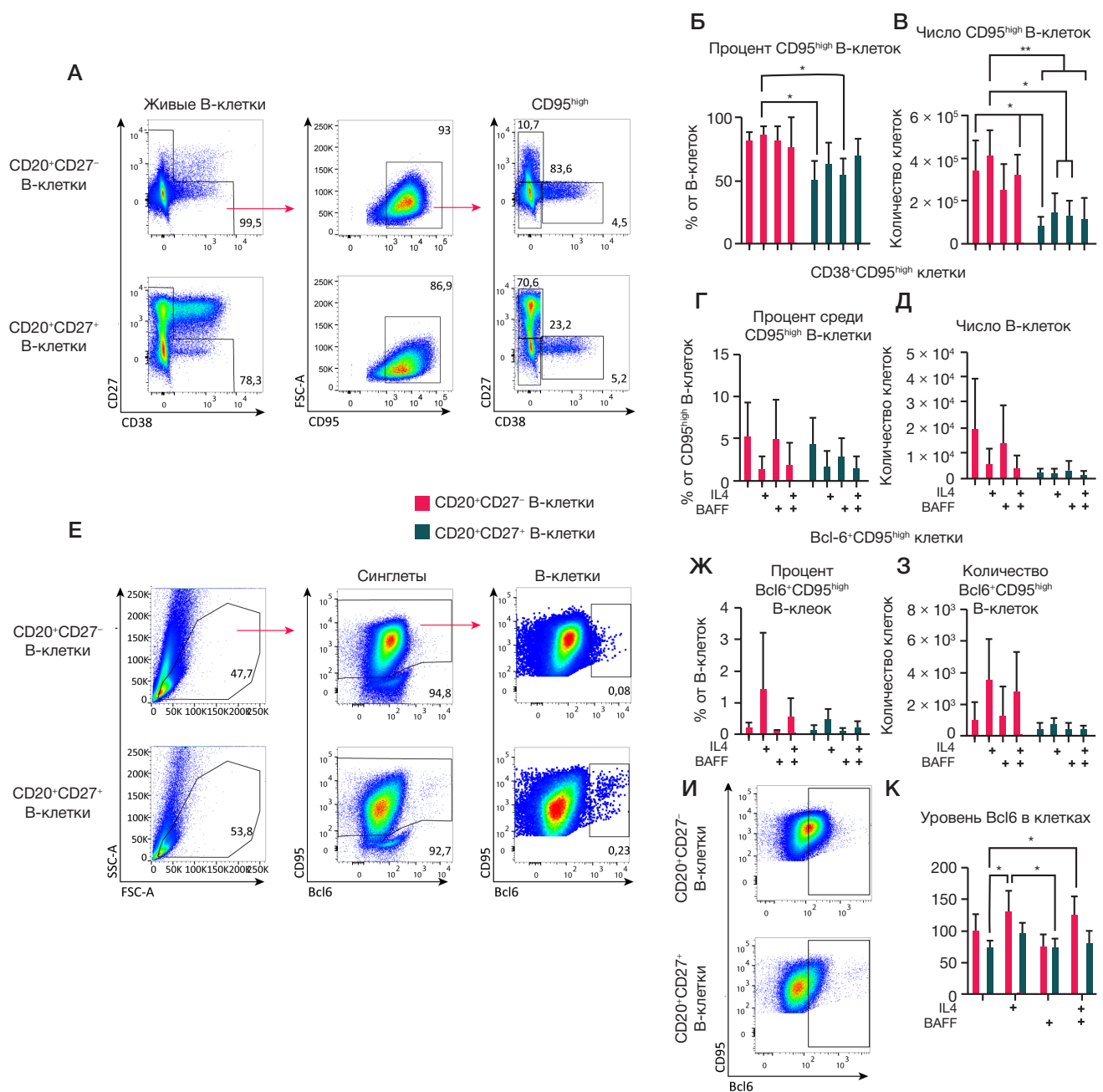


Рис. 4. Анализ влияния различных композиций цитокинов на поверхностную экспрессию CD95 и внутриклеточную экспрессию транскрипционного фактора Bcl6 на культуре из CD27⁺B-клеток и CD27⁺B-клеток памяти. $1,5 \times 10^4$ CD19⁺CD20⁺CD27⁺ и CD19⁺CD20⁺CD27⁺ В-клеток культивировали на фидерных клетках 3T3, экспрессирующих hCD40L, в культуральной среде RPMI-21 в присутствии rIL-21 (50 нг/мл), с/без добавления цитокинов rIL-4 (10 нг/мл) и rhBAFF (100 нг/мл) в течение 7 дней. **А–Д.** Анализ поверхностной экспрессии CD95 и коэкспрессии CD27 и CD38 на В-клетках в культурах (исключая CD27^{high}CD38^{high}-плазматические клетки). **А.** Репрезентативные графики цитометрического анализа поверхностной экспрессии CD95. Стратегия гейтирования указана стрелками. **Б, В.** Количественный анализ процентного содержания среди живых В-клеток (**Б**) и абсолютное число (**В**) живых CD95^{high}-В-клеток в культурах. **Г, Д.** Количественный анализ процентного содержания среди CD95^{high}-В-клеток (**Г**) и абсолютное число живых CD38⁺CD95^{high}-В-клеток (**Д**). **Е–К.** Анализ внутриклеточной экспрессии Bcl6 в клеточных культурах. Для этого клетки из культур были фиксированы и пермеабилизованы для окрашивания внутриклеточного транскрипционного фактора Bcl6. Репрезентативные графики цитометрического анализа (**Е**). Стратегия гейтирования указана стрелками. Процентное содержание (**Ж**) от В-клеток и абсолютное число (**З**) CD95^{high}Bcl6⁺-клеток. Репрезентативные панели цитометрического анализа, иллюстрирующие распределение по Bcl6 в клеточных культурах из CD20⁺CD27⁺ и CD20⁺CD27⁺ В-клеток (**И**). Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) транскрипционного фактора Bcl6 в клетках из культур (**К**). Данные количественных анализов представлены в виде среднего значения значения $\pm$ стандартное отклонение (SD) для четырех независимых опытов ($n = 4$), каждый опыт выполнен в двух репликах. Статистический анализ проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием критерия Тьюки для множественных сравнений, *, **, ***, **** — $p \leq 0,05$; 0,001; 0,0001; 0,0001 соответственно

Число CD27⁺CD38⁻CD95^{high} и CD27⁻CD38⁺CD95^{high} В-клеток в культурах возрастает при совместном добавлении hCD40L и IL-21 (рис. 2Ж, И), при этом их доля не изменяется (рис. 2Е, 3).

Для оценки накопления CD95^{high} Bcl6⁺ (ГЦ-подобных) В-клеток проводили фиксацию поверхностно окрашенных В-клеток с последующим внутриклеточным окрашиванием

антителами к Bcl6 (рис. 2К). Количественный анализ показал низкую представленность данной субпопуляции В-клеток в культурах (< 2%) (рис. 2Л). Наиболее заметное накопление ГЦ-подобных В-клеток наблюдалось в культуре RPMI-2 с включением 3Т3-hCD40L фидеров и IL21 (рис. 2М). Надо отметить, что в среде RPMI-2 более 50% ГЦ-подобных В-клеток имели фенотип CD27-CD38⁺, что достоверно

выше, чем в культурах с RPMI-1 (рис. 2Н, О). CD27⁺CD38⁻CD95^{high} Bcl6⁺ В-клетки встречались в культурах с RPMI-1 и RPMI-2 в равной степени (рис. 2П, Р), а доля CD27⁻CD38⁺ ГЦ-подобных клеток была достоверно повышена в культурах с RPMI-1 (рис. 2С, Т).

Таким образом, кокультивирование В-клеток с 3Т3-hCD40L фидерами и IL-21 позволяет достигнуть наибольшей экспансии и выживаемости В-клеток. При данных условиях на 7-й день культивирования в RPMI-1 около 15% среди живых клеток составляют АСК и 0,2% ГЦ-подобные В-клетки, а в RPMI-2 — 10 и 0,4% соответственно. Поэтому для дальнейшей работы была выбрана среда RPMI-2 как наиболее композиционно богатая для В-клеток.

В следующей серии экспериментов мы исследовали влияние различных композиций цитокинов (IL-4, BAFF) на клеточные культуры из CD20⁺CD27⁻-В-клеток, которые преимущественно представлены наивными В-клетками, и CD20⁺CD27⁺-В-клеток памяти. Отдельные субпопуляции В-клеток были получены из МНК периферической крови в результате флуоресцентного сортирования (с чистотой популяций > 95%). 1,5 × 10⁴ В-клеток культивировали в среде RPMI-2 в присутствии 3Т3-hCD40L-клеток с добавлением IL-21 (50 нг/мл) и цитокинов IL-4 (10 нг/мл) и/или BAFF (100 нг/мл) (табл. 2).

Цитометрический анализ клеточных культур на 7-й день (рис. 3А) показал, что различные композиции цитокинов не оказывают существенного влияния на экспансию и выживаемость В-клеток (рис. 3Б, В). Для всех комбинаций цитокинов наблюдалась тенденция к повышенной экспансии и сниженной доли мертвых В-клеток в культурах из CD27⁻ наивных В-клеток по сравнению с CD27⁺-В-клетками памяти.

Важно отметить, что в культурах из CD27⁺-В-клеток памяти происходит выраженное накопление CD27^{high}CD38^{high} АСК (20–35% от всех В-клеток) (рис. 3Г, Д). В культурах из преимущественно наивных CD27⁻-В-клеток доля АСК была менее 2% (рис. 3Г, Д), в то время как доля CD27⁻CD38⁻-В-клеток (рис. 3 Е, Ж) была достоверно выше по сравнению с культурами из CD27⁺-В-клеток. CD27⁺CD38⁻-В-клетки были обогащены в культурах клеток памяти, а CD27⁻CD38⁺-В-клетки присутствовали при всех условиях без выраженных различий (рис. 3З–Л). Вне зависимости от исходной популяции в культурах наблюдался тренд на снижение доли АСК, CD27⁺CD38⁻ и CD27⁻CD38⁺-клеток при добавлении IL-4 (рис. 3Г, Д, З–Л).

Вне зависимости от условий и стартовых клеток, большинство клеток имеет фенотип CD95^{high}. При этом доля и число CD95^{high} В-клеток несколько повышены в культурах из CD27⁻-наивных В-клеток (рис. 4А–В). Интересно также отметить тенденцию к снижению субпопуляции CD27⁻CD38⁺CD95^{high}-В-клеток для всех условий при добавлении IL-4 (рис. 4Г, Д).

Анализ количества и доли CD95^{high}Bcl6⁺-В-клеток (рис. 4Е) в культурах из исходных CD27⁻ — и CD27⁺-В-клеток не выявил статистически значимых различий (рис. 4Ж, З). Однако при добавлении IL-4 наблюдался тренд на повышение доли ГЦ-подобных В-клеток, который был более выражен для CD27⁻-В-клеток. Интересно также отметить тенденцию на повышение уровня Bcl6 в В-клеточных культурах из CD27⁻ по сравнению с CD27⁺-В-клетками, которая соблюдалась для всех условий, кроме добавления BAFF без IL-4 (рис. 4И, К).

Таким образом, при культивации в среде RPMI-2 с 3Т3-hCD40L-фидерами и IL-21 наблюдалась значимо

большая экспансия клеточной культуры из наивных CD27⁻-В-клеток с минимальным накоплением АСК по сравнению с культурами из CD27⁺-В-клеток памяти, в которых АСК достигали 30%. Статистически значимых различий в накоплении ГЦ-подобных В-клеток выявлено не было. Добавление BAFF существенного эффекта на В-клеточные культуры не оказывало, в то время как IL-4 вызывал небольшое снижение доли АСК и увеличение ГЦ-подобных В-клеток, особенно в CD27⁻-В-клеточных культурах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Культивирование человеческих В-клеток *in vitro* имеет фундаментальное значение для решения широкого спектра биотехнологических задач. К ним относятся получение АСК для производства антител, использование В-клеток в качестве антиген-презентирующих клеток для активации Т-клеток, а также тестирование разрабатываемых трансгенных продуктов для иммунотерапии [16]. Несмотря на многочисленные исследования условий культивирования В-клеток [11–13], создание эффективных протоколов для отдельных прикладных задач остается актуальным.

В настоящем исследовании была поставлена цель подобрать комбинацию оптимальных факторов для: а) эффективной экспансии В-клеток в клеточной культуре; б) максимального накопления популяции АСК; в) Bcl6-экспрессирующих В-клеток, подобных В-клеткам ГЦ. Для этого был проведен комплексный анализ влияния исходного статуса В-клеток по маркеру CD27 (субпопуляции CD27⁻ и CD27⁺), комбинации белков и добавок, замещающих человеческую сыворотку, цитокина BAFF, критического для выживания В-клеток, а также стимулов, имитирующих Т-клеточную помощь (CD40L, IL-21, IL-4), на эффективность протоколов культивирования.

Экспансия и поддержание жизнеспособности активированных В-клеток

Цитометрический анализ культур В-клеток на 7-й день кокультивирования продемонстрировал, что наивысшие показатели экспансии и выживаемости были достигнуты в условиях использования трансгенной фидерной линии, экспрессирующей человеческий hCD40L, в комбинации с цитокином IL-21. Эти данные согласуются с результатами, описанными ранее [17, 18]. В то же время добавление в культуру цитокинов IL-4 и BAFF в концентрациях 10 и 100 нг/мл соответственно не оказало статистически значимого влияния на пролиферацию или жизнеспособность клеток.

Оптимизация состава питательной среды показала, что включение в базовую среду, содержащую 10% FBS, коктейля из рекомбинантного человеческого инсулина, трансферрина и альбумина способствовало максимальному снижению доли мертвых клеток.

Согласно сравнительному анализу, культуры, инициированные из CD27⁻-В-клеток, в среднем в 1,5 раза превосходили по численности культуры, полученные из CD27⁺-клеток, а также характеризовались более низким процентом гибели клеток, что подтверждается литературными данными [19].

Таким образом, для оптимальной экспансии и поддержания жизнеспособности активированных В-клеток *in vitro* целесообразно использовать в качестве исходной популяции CD27⁻-клетки. Наиболее эффективный протокол включает их кокультивирование с фидерными клетками,

экспрессирующими hCD40L, в среде, обогащенной IL-21, с добавлением комбинации сывороточных белков (включая инсулин, трансферрин, альбумин).

Накопление АСК в В-клеточных культурах

Следующей задачей было определение условий культивирования, при которых происходит накопление CD27^{high}CD38^{high} АСК в В-клеточных культурах. Было показано, что при одновременном присутствии hCD40L и IL-21 в культурах накапливались CD27^{high}CD38^{high}-клетки, достигая 10–15% от всего клеточного пула. Это согласуется с результатами ранее опубликованных работ [20, 21, 22]. Введение в среду для культивирования рекомбинантных сывороточных белков приводило к снижению доли АСК в культурах.

Выраженное накопление CD27^{high}CD38^{high}-В-клеток отмечалось в культурах из CD27⁺-В-клеток памяти (20–35% от всех живых клеток), что согласуется с более ранними исследованиями [21, 23] и быстрым вовлечением В-клеток памяти в АСК-ответ при повторном контакте с антигеном и получением Т-клеточной помощи [24]. В отличие от клеток памяти, в культурах из преимущественно наивных CD27⁻-В-клеток доля и количество АСК были заметно снижены (1–2% от общего числа клеток).

Отмечалось также, что в присутствии цитокина BAFF количество CD27^{high}CD38^{high}, а также CD27⁺CD38⁻-В-клеток в культурах из CD27⁺-В-клеток памяти было максимальным, что согласуется с другими данными [25, 26]. При добавлении IL-4, наоборот, отмечался тренд на снижение доли и числа АСК и CD27⁺CD38⁻-клеток и повышение доли CD27⁻CD38⁻-В-клеток.

Из полученных нами результатов следует, что для обогащения АСК в В-клеточной культуре предпочтительнее использовать CD27⁺-В-клетки памяти в комбинации с hCD40L и IL-21 и с добавлением BAFF. Надо отметить, что данный анализ проводили без учета уровня секреции антител АСК, которая может существенно варьироваться в зависимости от уровня созревания АСК и множества дополнительных факторов, и требует отдельных исследований для оптимизации продукции антител в клеточных культурах.

Накопление В-клеток ГЦ в клеточных культурах

Как было упомянуто ранее, сигнал через ВКР, а также «помощь» Th-клеток в виде CD40L и секреции IL-21 индуцирует появление В-клеток ГЦ. Ключевым маркером В-клеток ГЦ является экспрессия транскрипционного фактора Bcl6 [5]. Фенотипический анализ лимфоцитов из вторичных лимфоидных органов человека позволил идентифицировать CD95^{high}Bcl6⁺CD38⁺CD27⁺-В-клетки как В-клетки ГЦ [27]. В своей работе нам удалось идентифицировать ГЦ-подобные В-клетки в культурах по комбинации поверхностного маркера CD95 и внутриклеточного транскрипционного фактора Bcl6.

Накопление CD95^{high} Bcl6⁺-В-клеток имело место в культурах с hCD40L и IL-21 в соответствии с исследованиями *in vivo* [28]. Исходные клеточные популяции CD27⁻ и CD27⁺-В-клеток не оказывали значимого влияния на долю и число

CD95^{high}Bcl6⁺ в конечных В-клеточных культурах. Однако в культурах из CD27⁻-В-клеток был обнаружен тренд на повышение уровня Bcl6. Добавление рекомбинантных сывороточных белков и IL4 способствовало увеличению доли ГЦ-подобных В-клеток и снижению АСК. Это согласуется с результатами исследований, показавшими, что совместное действие IL-21 и IL-4, секретируемых Th, повышает и стабилизирует экспрессию Bcl6 в активированных В-клетках [29], способствуя их дифференцировке в В-клетки ГЦ [5]. При этом Bcl6 является антагонистом транскрипционного фактора Blimp-1 и ингибирует дальнейшее дифференцирование В-клеток в АСК [24].

Таким образом, нам удалось показать, что культивирование В-клеток в присутствии hCD40L и IL-21 позволяет также наблюдать образование ГЦ-подобных В-клеток по повышению экспрессии Bcl6. При этом немного большее накопление ГЦ-подобных В-клеток наблюдается в культуре из CD27⁻-наивных В-клеток при включении в среду IL-4 и добавок, заменяющих человеческую сыворотку.

Однако надо отметить, что все используемые в данной работе компоненты не приводят к накоплению более 1% ГЦ-подобных В-клеток. В-клетки ГЦ отличаются высокой чувствительностью к апоптозу в отсутствии поддержки со стороны фолликулярных Th и особых клеток — фолликулярных дендритных клеток (ФДК) [30]. Показано, что использование клеточных линий на основе ФДК может быть более предпочтительным для культивирования В-клеток ГЦ [10]. Исходя из полученных нами данных и результатов ранее выполненных исследований, мы предполагаем, что направленное поддержание культур В-клеток ГЦ *in vitro* требует использования более сложных систем кокультивирования с включением ФДК-подобных В-клеточных линий.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование позволило подобрать оптимальные условия для эффективной экспансии В-клеток из периферической крови человека *in vitro*, а также для получения культуры, обогащенной АСК. Как было показано, включение в культуры hCD40L-экспрессирующих клеток фидеров и IL-21 необходимо как для пролиферации и выживаемости, так и для дифференцировки В-клеток *in vitro*. Для оптимальной экспансии В-клеточной культуры предпочтительно использовать CD27⁻-наивные В-клетки и среду с добавлением комбинации человеческих сывороточных белков (включая инсулин, трансферрин, альбумин). В то же время использование CD27⁺-В-клеток памяти и добавление BAFF в среду предпочтительны для обогащения АСК. В проведенном исследовании нам удалось произвести оценку накопления CD95^{high}Bcl6⁺ ГЦ-подобных В-клеток. Однако используемой в работе комбинации условий оказалось недостаточно для существенного обогащения культур данными клетками. Предположительно, получение культуры ГЦ-подобных В-клеток из В-клеток периферической крови может потребовать использования ФДК-подобных фидерных клеток и дополнительных растворимых факторов.

Литература

1. Elsner RA, Shlomchik MJ. Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity*. 2020; 53 (6): 1136–50.
2. Ghosh D, Jiang W, Mukhopadhyay D, Mellins ED. New insights into B cells as antigen presenting cells. *Current Opinion in Immunology*. 2021; 70: 129–37.
3. Rastogi I, Jeon D, Moseman JE, Muralidhar A, Potluri HK, McNeel DG. Role of B cells as antigen presenting cells. *Front Immunol*. 2022; 13: 954936.
4. Shulman Z, Gitlin AD, Weinstein JS, Lainez B, Esplugues E, Flavell RA, et al. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science*. 2014; 345 (6200): 1058–62.
5. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, Waard R de, et al. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*. 1997; 16 (2): 161–70.
6. Duy C, Yu JJ, Nahar R, Swaminathan S, Kweon SM, Polo JM, et al. BCL6 is critical for the development of a diverse primary B cell repertoire. *J Exp Med*. 2010; 207 (6): 1209–21.
7. Wong R, Bhattacharya D. Basics of memory Bcell responses: lessons from and for the real world. *Immunology*. 2019; 156 (2): 120.
8. Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends Immunol*. 2021; 42 (12): 1143–58.
9. Arpin C, Déchanet J, Kooten CV, Merville P, Grouard G, Brière F, et al. Generation of Memory B Cells and Plasma Cells in Vitro. *Science*. 1995; 268: 720–2.
10. Caesar R, Di Re M, Krupka JA, Gao J, Lara-Chica M, Dias JML, et al. Genetic modification of primary human B cells to model high-grade lymphoma. *Nat Commun*. 2019; 10 (1): 4543.
11. Rovsing AB, Green K, Jensen L, Nielsen IH, Mikkelsen JG, Degn SE. Multiparametric Optimization of Human Primary B-Cell Cultures Using Design of Experiments. *Scand J Immunol*. 2025; 102 (2): e70043.
12. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest*. 2003; 112 (2): 286–97.
13. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest*. 2004; 113 (7): 1069.
14. Butov KR, Osipova EY, Mikhalkin NB, Trubina NM, P anteelev MA, Machlus KR. In vitro megakaryocyte culture from human bone marrow aspirates as a research and diagnostic tool. *Platelets*. 2021; 32 (7): 928–35.
15. Schattner EJ, Elkon KB, Yoo DH, Tumang J, Krammer PH, Crow MK, Friedman SM. CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J Exp Med*. 1995; 182 (5): 1557–65. DOI: 10.1084/jem.182.5.1557.
16. Verstegen NJ, Pollastro S, Unger PPA, Marsman C, Elias G, Jorritsma T, et al. Single-cell analysis reveals dynamics of human B cell differentiation and identifies novel B and antibody-secreting cell intermediates. *eLife*. 2023; 12: e83578.
17. Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of Human B Cell Behavior and Amplification of Proliferative Responses following Stimulation with IL-21. *J Immunol*. 2006; 177 (8): 5236–47.
18. Бязрова М. Г., Астахова Е. А., Спиридонова А. Б., Васильева Ю. В., Прилипов А. Г., Филатов А. В. Стимуляция В-лимфоцитов человека *in vitro* с помощью ИЛ-21/CD40L и их характеристика. *Иммунология*. 2020; 41 (6): 501–10.
19. Fecteau JF, Néron S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol*. 2003; 171 (9): 4621–9.
20. Ding BB, Bi E, Chen H, Yu JJ, Ye BH. IL-21 and CD40L Synergistically Promote Plasma Cell Differentiation through Upregulation of Blimp-1 in Human B Cells. *J Immunol*. 2013; 190 (4): 1827–36.
21. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol*. 2005; 175 (12): 7867–79.
22. Unger PA, Verstegen NJM, Marsman C, Jorritsma T, Rispens T, Ten Brinke A, van Ham SM. Minimalistic In Vitro Culture to Drive Human Naive B Cell Differentiation into Antibody-Secreting Cells. *Cells*. 2021; 10 (5): 1183.
23. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2013; 210 (12): 2739–53.
24. Ise W, Kurosaki T. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. *Immunol Rev*. 2019; 288 (1): 64–74.
25. Robinson MJ, Pitt C, Brodie EJ, Valk AM, O'Donnell K, Nitschke L, et al. BAFF, IL-4 and IL-21 separately program germinal center-like phenotype acquisition, BCL6 expression, proliferation and survival of CD40L-activated B cells in vitro. *Immunol Cell Biol*. 2019; 97 (9): 826–39.
26. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest*. 2003; 112 (2): 286–97.
27. Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol*. 2001; 167 (7): 3610–8.
28. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med*. 2010; 207 (2): 353–63.
29. Chevrier S, Kratina T, Emslie D, Tarlinton DM, Corcoran LM. IL4 and IL21 cooperate to induce the high Bcl6 protein level required for germinal center formation. *Immunol Cell Biol*. 2017; 95 (10): 925–32.
30. Krimpenfort LT, Degn SE, Heesters BA. The follicular dendritic cell: At the germinal center of autoimmunity? *Cell Reports*. 2024; 43 (3): 113869.

References

1. Elsner RA, Shlomchik MJ. Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity*. 2020; 53 (6): 1136–50.
2. Ghosh D, Jiang W, Mukhopadhyay D, Mellins ED. New insights into B cells as antigen presenting cells. *Current Opinion in Immunology*. 2021; 70: 129–37.
3. Rastogi I, Jeon D, Moseman JE, Muralidhar A, Potluri HK, McNeel DG. Role of B cells as antigen presenting cells. *Front Immunol*. 2022; 13: 954936.
4. Shulman Z, Gitlin AD, Weinstein JS, Lainez B, Esplugues E, Flavell RA, et al. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science*. 2014; 345 (6200): 1058–62.
5. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, Waard R de, et al. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*. 1997; 16 (2): 161–70.
6. Duy C, Yu JJ, Nahar R, Swaminathan S, Kweon SM, Polo JM, et al. BCL6 is critical for the development of a diverse primary B cell repertoire. *J Exp Med*. 2010; 207 (6): 1209–21.
7. Wong R, Bhattacharya D. Basics of memory Bcell responses: lessons from and for the real world. *Immunology*. 2019; 156 (2): 120.
8. Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends Immunol*. 2021; 42 (12): 1143–58.
9. Arpin C, Déchanet J, Kooten CV, Merville P, Grouard G, Brière F, et al. Generation of Memory B Cells and Plasma Cells in Vitro. *Science*. 1995; 268: 720–2.
10. Caesar R, Di Re M, Krupka JA, Gao J, Lara-Chica M, Dias JML, et

- al. Genetic modification of primary human B cells to model high-grade lymphoma. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 4543.
11. Rovsing AB, Green K, Jensen L, Nielsen IH, Mikkelsen JG, Degn SE. Multiparametric Optimization of Human Primary B-Cell Cultures Using Design of Experiments. *Scand J Immunol.* 2025; 102 (2): e70043.
 12. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest.* 2003; 112 (2): 286–97.
 13. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest.* 2004; 113 (7): 1069.
 14. Butov KR, Osipova EY, Mikhalkin NB, Trubina NM, Panteleev MA, Machlus KR. In vitro megakaryocyte culture from human bone marrow aspirates as a research and diagnostic tool. *Platelets.* 2021; 32 (7): 928–35.
 15. Schattner EJ, Elkon KB, Yoo DH, Tumang J, Krammer PH, Crow MK, Friedman SM. CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J Exp Med.* 1995; 182 (5): 1557–65. DOI: 10.1084/jem.182.5.1557.
 16. Verstegen NJ, Pollastro S, Unger PPA, Marsman C, Elias G, Jorritsma T, et al. Single-cell analysis reveals dynamics of human B cell differentiation and identifies novel B and antibody-secreting cell intermediates. *eLife.* 2023; 12: e83578.
 17. Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of Human B Cell Behavior and Amplification of Proliferative Responses following Stimulation with IL-21. *J Immunol.* 2006; 177 (8): 5236–47.
 18. Byazrova MG, Astahova EA, Spiridonova AB, Vasileva YuV, Prilipov AG, Filatov AV. Stimulyaciya V-limfocitov cheloveka in vitro s pomoshch'yu IL-21/CD40L i ih harakteristika. *Immunologiya.* 2020; 41 (6): 501–10. Russian.
 19. Fecteau JF, Néron S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol.* 2003; 171 (9): 4621–9.
 20. Ding BB, Bi E, Chen H, Yu JJ, Ye BH. IL-21 and CD40L Synergistically Promote Plasma Cell Differentiation through Upregulation of Blimp-1 in Human B Cells. *J Immunol.* 2013; 190 (4): 1827–36.
 21. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol.* 2005; 175 (12): 7867–79.
 22. Unger PA, Verstegen NJM, Marsman C, Jorritsma T, Rispens T, Ten Brinke A, van Ham SM. Minimalistic In Vitro Culture to Drive Human Naive B Cell Differentiation into Antibody-Secreting Cells. *Cells.* 2021; 10 (5): 1183.
 23. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *Journal of Experimental Medicine.* 2013; 210 (12): 2739–53.
 24. Ise W, Kurosaki T. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. *Immunol Rev.* 2019; 288 (1): 64–74.
 25. Robinson MJ, Pitt C, Brodie EJ, Valk AM, O'Donnell K, Nitschke L, et al. BAFF, IL-4 and IL-21 separably program germinal center-like phenotype acquisition, BCL6 expression, proliferation and survival of CD40L-activated B cells in vitro. *Immunol Cell Biol.* 2019; 97 (9): 826–39.
 26. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest.* 2003; 112 (2): 286–97.
 27. Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol.* 2001; 167 (7): 3610–8.
 28. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med.* 2010; 207 (2): 353–63.
 29. Chevrier S, Kratina T, Emslie D, Tarlinton DM, Corcoran LM. IL4 and IL21 cooperate to induce the high Bcl6 protein level required for germinal center formation. *Immunol Cell Biol.* 2017; 95 (10): 925–32.
 30. Krimpenfort LT, Degen SE, Heesters BA. The follicular dendritic cell: At the germinal center of autoimmunity? *Cell Reports.* 2024; 43 (3): 113869.