

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПЕРВИЧНЫХ В-КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ В
ЗАРОДЫШЕВЫХ ЦЕНТРАХ**

Бязрова М. Г. ^{1,2},
Сухова М. М. ^{1,3},
Михайлов А. А. ^{1,3},
Прилипов А. Г. ¹,
Филатов А. В. ^{1,3}

¹ ФГБУН «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия.

² ФГАОУ ВО "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы", Москва, Россия.

³ ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова", Москва, Россия.

**GENETIC MODIFICATION OF PRIMARY HUMAN B CELLS TO
MODEL THE PROCESS OF B CELL DEVELOPMENT IN GERMINAL
CENTERS**

Byazrova M. G. ^{a, b},
Sukhova M. M. ^{a, c},
Mikhailov A. A. ^{a, c},
Prilipov A. G. ^a,
Filatov A. V. ^{a, c}

^a National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation.

^b Peoples' Friendship University of Russia of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 117198, Moscow, Russian Federation.

^c Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation.

Резюме

Основные этапы созревания антиген-специфических В-клеток протекают в герминативных центрах лимфоузлов. Здесь наивные В-клетки проходят процесс соматического гипермутагенеза, а также переключение классов синтезируемых антител. В процессе дифференцировки принимается решение по какому пути В-клетки будут развиваться далее. Они либо превратятся в короткоживущие плазмобласты, либо в В-клетки памяти или плазматические клетки. Взаимоотношение этих процессов очень важно для развития продуктивного гуморального иммунного ответа. Имеется насущная необходимость в более детальном изучении отмеченных процессов. Целью работы являлось создание системы, которая *ex vivo* способна моделировать процессы, протекающие в герминативных центрах. В качестве исходного материала мы использовали первичные В-клетки из периферической крови человека. После иммуномагнитной сепарации В-лимфоциты стимулировали *in vitro* с помощью фидерных клеток, несущих молекулы CD40L. Другим стимулирующим фактором являлся рекомбинантный растворимый IL-21. При IL-21/CD40L стимуляции В-лимфоциты изменяли свою морфологию, поверхностный фенотип, а также функциональную активность. После активной экспансии в течении 10 дней дальнейший рост клеток останавливался, и через некоторое время они погибали. Для получения стабильно пролиферирующих В-клеток мы использовали лентивирусную трансдукцию IL-21/CD40L стимулированных IgM⁺ В-лимфоцитов. Для этого были получены препараты лентивируса, которые несли кассету, состоящую из генов *BCL6* и *BCL2L1*, разделенных последовательностью кодирующей саморазрезаемый пептид P2A, а также репортерный ген *GFP*, отделенный от целевых генов элементом IRES. Используемая кассета обеспечивала в клетках-мишенях синтез транскрипционного фактора Bcl-6 и белка Bcl-XL. Репрессор Bcl-6 не позволял В-клеткам уходить в терминальную дифференцировку и превращаться в плазматические клетки, а белок Bcl-XL оказывал анти-апоптотическое действие. Трансдуцированные В-клетки пролиферировали более месяца и сохраняли фенотип плазмобластов. При этом через 42 дня после начала стимуляции трансдуцированные В-клетки оставались GFP-позитивными, коэкспрессировали антигены CD27 и CD38, несли поверхностный CD20 и IgM, внутриклеточный Bcl-6, Bcl-XL и IgM, сохраняли секрецию IgM, но оставались негативными по поверхностному и внутриклеточному IgG. Таким образом длительное культивирование В-клеток не приводило к переключению класса синтезируемого Ig. Отработанная система стимуляции позволит имитировать ключевые аспекты развития В-клеток в зародышевых центрах для изучения формирования В-клеточной памяти, что в конечном счете будет способствовать разработке эффективных вакцин.

Ключевые слова: наивные В-клетки, В-клетки памяти, плазматические клетки, IL-21, CD40L, Bcl-6, Bcl-XL.

Abstract

The main stages of maturation of antigen-specific B cells occur in the germinal centers of the lymph nodes. During the process of differentiation, a decision is made on which path the B cells will take to develop further. They will either turn into short-lived plasmablasts or memory B cells or plasma cells. The relationship between these processes is very important for the development of a productive humoral immune response. The goal of the work was to create a system that is capable of simulating *ex vivo* processes occurring in germinal centers. We used primary B cells from human peripheral blood as starting material. B lymphocytes were stimulated *in vitro* using feeder cells carrying CD40L molecules and recombinant IL-21. Upon IL-21/CD40L stimulation, B lymphocytes changed their morphology, surface phenotype, and functional activity. After active expansion for 10 days, further cell growth stopped, and after some time they died. To generate stably proliferating B cells, we used lentiviral transduction of IL-21/CD40L stimulated IgM⁺ B cells. For this purpose, lentivirus preparations were obtained that carried a cassette consisting of the *BCL6* and *BCL2L1* genes, separated by a sequence encoding the self-cutting peptide P2A, as well as a *GFP* reporter gene separated from the target genes by an IRES element. The cassette used ensured the synthesis of the Bcl-6 transcription factor and the Bcl-XL protein in target cells. The Bcl-6 repressor prevented B cells from undergoing terminal differentiation and becoming plasma cells, and the Bcl-XL protein had an anti-apoptotic effect. Transduced B cells proliferated for more than a month and maintained a plasmablast phenotype. 42 days after the start of stimulation, transduced B cells remained GFP-positive, coexpressed CD27 and CD38 antigens, carried surface CD20 and IgM, intracellular Bcl-6, Bcl-XL and IgM, retained IgM secretion, but remained negative for surface and IgM. intracellular IgG. The proven stimulation system will allow us to simulate key aspects of B cell development in germinal centers to study the formation of B cell memory, which will ultimately facilitate the development of effective vaccines.

Keywords: naive B cells, memory B cells, plasma cells, IL-21, CD40L, Bcl-6, Bcl-XL.

1 Введение

При первичном В-клеточном ответе происходит активация наивных антиген-специфических В-клеток и их дифференцировка в одну из следующих популяций: плазмабласты, клетки памяти и плазматические клетки [6]. Этот важный этап в развитии В-лимфоцитов проходит в герминативных центрах лимфоузлов. Дифференцировка В-клеток сопровождается переключением синтеза Ig и созреванием аффинности антител [5]. Для изучения процессов дифференцировки в зародышевых центрах, применяют несколько модельных систем, в частности используются генетически модифицированные мыши. Очевидно, что этот подход имеет серьезные ограничения; связанные главным образом с тем, что мыши не всегда точно отражают иммунологические процессы, проходящие у человека. Привлекательным решением является создание системы, которая позволит *ex vivo* моделировать процессы, происходящие в зародышевых центрах. В светлой зоне зародышевых центров присутствуют клетки, которые одновременно экспрессируют BCR и секретируют антитела [7]. Для создания модельной системы эти клетки наиболее интересны, поскольку они представляют популяцию пре-плазмбластов, готовых к переходу как в В-клетки памяти, так и в плазматические клетки.

Важную роль в созревании В-лимфоцитов играют фолликулярные Т-хелперы (T_{fh}), которые несут на своей поверхности молекулу CD40L, взаимодействие которой с рецептором CD40 на В-лимфоците приводит к запуску NF-κB пути активации. В дополнении к этому T_{fh} стимулируют созревание В-клеток с помощью секретируемых цитокинов, среди которых наиболее мощным драйвером дифференцировки В-клеток является IL-21, который инициирует STAT3 путь активации [4]. Совместное действие IL-21 и CD40L является минимальной комбинацией сигналов, которая обеспечивает надежную активацию В-лимфоцитов. Однако эта система имеет существенный недостаток: активированные клетки быстро достигают терминальной дифференцировки, которая сопровождается остановкой клеточного цикла. Решить эту проблему возможно с помощью трансгенеза. В настоящей работе получены генетически модифицированные В-клетки крови человека, которые в течении двух месяцев поддерживались в состоянии пре-плазмбластов.

2 Материалы и методы

Плазмиды MSCV-Bcl6 (#31391) и pMIG-Bcl-xL (#3541), кодирующие белки Bcl-6 и Bcl-XL, были получены из Addgene (США). Используя эти плазмиды, была получена кассета, которая состояла из генов Bcl6 и Bcl-XL, разделенных последовательностью саморазрезаемого пептида P2A. В качестве репортерного гена использовали GFP, который был отделен от целевых генов последовательностью IRES. Кассету клонировали в лентивирусный вектор pUHR (#110661, Addgene, США).

Для получения лентивирусных частиц клетки HEK293 временно трансфицировали тремя плазмидами: трансферной pUHR-Bcl6-Bcl-XL-

45 IRES-GFP, упаковочной $\Delta 8.2R$ и плазмидой, кодирующей поверхностный
46 гликопротеин вируса везикулярного стоматита VSV-G (#14888, AddGene,
47 США). Через 4 дня после трансфекции лентивирусные частицы собирали из
48 культуральных супернатантов и концентрировали методом
49 ультрацентрифугирования.

50 Образцы цельной крови собирали в гепаринизированные
51 вакутейнерные пробирки (Sarstedt, Германия). Мононуклеарные клетки
52 крови выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколла-
53 верографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). В-лимфоциты обогащали методом
54 отрицательной иммуномагнитной сепарации с использованием набора
55 Dynabeads Untouched human B cell kit («Thermo Fisher Scientific», США).

56 В качестве источника CD40L использовали фидерные клетки A549,
57 которые были стабильно трансфицированы геном, кодирующим CD40L [1].
58 Фидерные клетки, обработанные 10 мкг/мл митомицином-С (Киова Хакко
59 Когио, Япония), а также выделенные В-лимфоциты высевали по 10 000
60 клеток на лунку в 96-луночный планшет. В-лимфоциты культивировали в
61 среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 24 мкг/мл
62 гентамицина, 1 mM пирувата натрия, 10 mM HEPES (все Панеко, Россия) и 25
63 нг/мл ИЛ-21 (СайСторЛаб, Россия) при 37° С в 5% CO₂.

64 Для окрашивания лимфоцитов использовали моноклональные
65 антитела: CD19-PE (клон LT19), CD27-PECy5.5 (клон LT27), CD38-PECy7
66 (клон LT38), против IgG (клон CH1) и IgM (клон CH2) человека, которые
67 ранее были получены в нашей лаборатории [1]. Использовали также
68 моноклональные антитела против Bcl-6 (клон 7D1, BioLegend, США) и Bcl-
69 XL (поликлон sc-634, Santa Cruz, США). Флуоресценцию клеток
70 регистрировали с помощью проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman
71 Coulter, США).

72 Результаты исследований и обсуждение результатов

73 В-лимфоциты, выделенные из крови, стимулировали с помощью
74 рекомбинантного ИЛ-21 в присутствии фидерных клеток, несущих
75 поверхностный CD40L. При ИЛ-21/CD40L стимуляции изменялась
76 морфология В-лимфоцитов и их функциональная активность. В-клетки,
77 которые исходно имели сферический вид, в процессе стимуляции принимали
78 нерегулярную форму с образованием псевдоподий, группировались вокруг
79 фидерных клеток. Между В-лимфоцитами наблюдалась гомотипическая
80 адгезия, одиночные клетки начали активно двигаться, клетки
81 пролиферировали и их количество возрастало.

82 При стимуляции наблюдались также изменения фенотипа клеток. На 4 день
83 стимуляции около 20% клеток начинали коэкспрессировать антигены CD27 и
84 CD38, к 10-му дню доля двойных позитивных CD27⁺CD38⁺ клеток
85 увеличивалась до 40%. Одновременно с этим снижалась поверхностная
86 экспрессия CD20 антигена. Наблюдалось также снижение доли клеток,
87 несущих поверхностный IgG или IgM, при этом увеличивался процент
88 лимфоцитов с внутриклеточным окрашиванием IgG. Уровень секреции IgG в

89 культуральный супернатант возрастал более, чем в 5 раз. В покоящихся В-
90 лимфоцитах детектировался невысокий уровень Bcl-6, который при IL-
91 21/CD40L стимуляции снижался ниже порога детекции. К 10-му дню
92 экспансия В-клеток останавливалась, и они вступали в апоптоз.

93 Суммируя все наблюдаемые изменения, можно утверждать, что IL-
94 21/CD40L стимулированные В-клетки по своим свойствам приближались к
95 плазмбластам и плазматическим клеткам. Это согласуется с тем, что IL-21
96 инициирует STAT3 путь активации, который приводит к положительной
97 регуляции транскрипционного фактора Blimp-1. Воздействие CD40L
98 запускает альтернативный NF-κB сигнальный путь, который через ряд
99 медиаторов, включая транскрипционный репрессор Bcl-6, снимает блокаду с
100 Blimp-1. Таким образом IL-21 и CD40L, действуя синергически,
101 обеспечивают повышение активности Blimp-1, который в свою очередь
102 определяет переход В-клеток в терминальную стадию дифференцировки, на
103 которой происходит остановка клеточного деления и В-лимфоцит
104 окончательно превращается в плазматическую клетку [3].

105 Для моделирования В-клеточной дифференцировки более
106 привлекательным является удержание В-лимфоцита в состоянии
107 пролиферирующих пре-плазмбластов, в котором выбор дальнейшей
108 дифференцировки в пользу В-клеток памяти или плазматических клеток еще
109 не сделан. Стабильно пролиферирующие В-клетки можно получить
110 трансдукцией генов *BCL6* и *BCL2L1*, которые кодируют транскрипционный
111 фактор Bcl-6 и анти-апоптотический белок Bcl-XL соответственно [8]. В
112 экспериментах по трансдукции мы использовали более многочисленную
113 популяцию IgM⁺ клеток, которые предварительно выделяли с помощью
114 проточного сортировщика.

115 На разные сроки после начала IL-21/CD40L стимуляции к В-клеткам
116 мы добавляли лентивирусные частицы, несущие гены *BCL6* и *BCL2L1*, а
117 также репортерный ген *GFP*. В зависимости от дозы и времени добавления
118 лентивирусов было получено 9 различных вариантов трансдуцированных В-
119 лимфоцитов. Каждые три дня с помощью проточной цитометрии мы
120 подсчитывали количество лимфоцитов, после чего клетки пересаживали в
121 новые лунки со свежими фидерными клетками и с добавлением IL-21.

122 После трансдукции некоторая доля В-лимфоцитов сохраняла свою
123 жизнеспособность вплоть до 20-ого дня культивирования, после чего
124 наблюдалось устойчивое увеличение количества лимфоцитов (рис. 1).
125 Лимфоциты трансдуцированные на 4-й день стимуляции демонстрировали
126 более высокий уровень пролиферации, чем лимфоциты, трансдуцированные
127 на 7-й день стимуляции. Оптимальная доза лентивируса обеспечивала
128 пролиферацию в течении двух месяцев с начала стимуляции. Через 42 дня
129 после начала стимуляции более 72% клеток сохраняли GFP-флуоресценцию
130 (рис. 2А), коэкспрессировали антигены CD27 и CD38 (рис. 2Б), несли
131 поверхностный CD20 и IgM, но оставались негативными по поверхностному
132 IgG (рис. 2Д и Г). Трансдуцированные В-клетки сохраняли секрецию IgM,

экспрессировали внутриклеточный Bcl-6 и Bcl-XL (рис. 3А), а также внутриклеточный IgM, но не IgG (рис. 3Б). Таким образом культивирование В-клеток в течение 42 дней не приводило к переключению класса синтезируемого Ig.

Таким образом в настоящей работе показано, что первичные В-клетки крови, стимулированные в системе IL-21/CD40L и трансдуцированные генами *BCL6* и *BCL2L1*, дифференцируются в плазмабласты, которые могут пролиферировать в течении нескольких недель. Такие клетки имитируют ключевые аспекты развития В-клеток в зародышевых центрах.

Разработанная система стимуляции может служить удобным инструментом для последующих исследований по дифференцировке наивных В-клеток в предшественники В-клеток памяти и плазматические клетки.

Благодарности

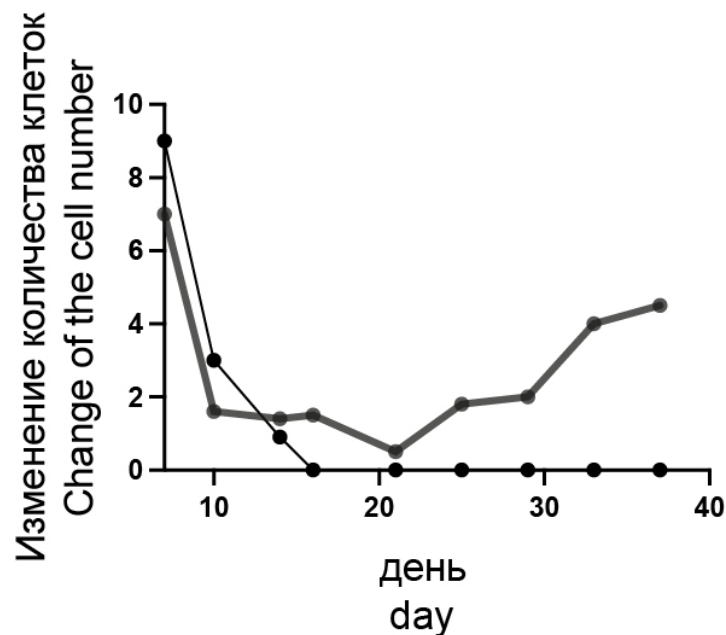
Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00289).

РИСУНКИ

Рисунок 1. Динамика роста В-клеток трансдуцированных генами *BCL6* и *BCL2L1*.

Figure 1. Dynamics of B cell growth after transduction with the *BCL6* and *BCL2L1* genes.

A (A)

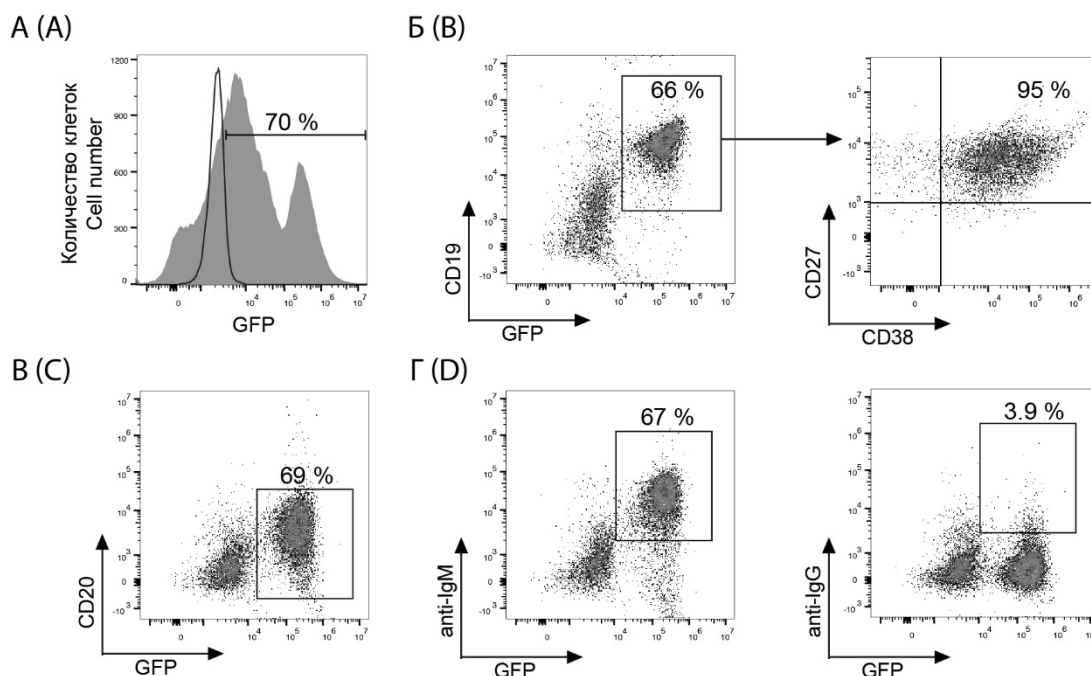


Примечание: Тонкой линией показан отрицательный контроль с В-клетками без трансдукции.

Note: The thin line shows the negative control with B cells without transduction.

Рисунок 2. Фенотипирование трансдуцированных В-клеток на 42-ой день после начала стимуляции по поверхностным маркерам.

Figure 2. Phenotyping of transduced B cells on day 42 after the start of stimulation using surface markers.

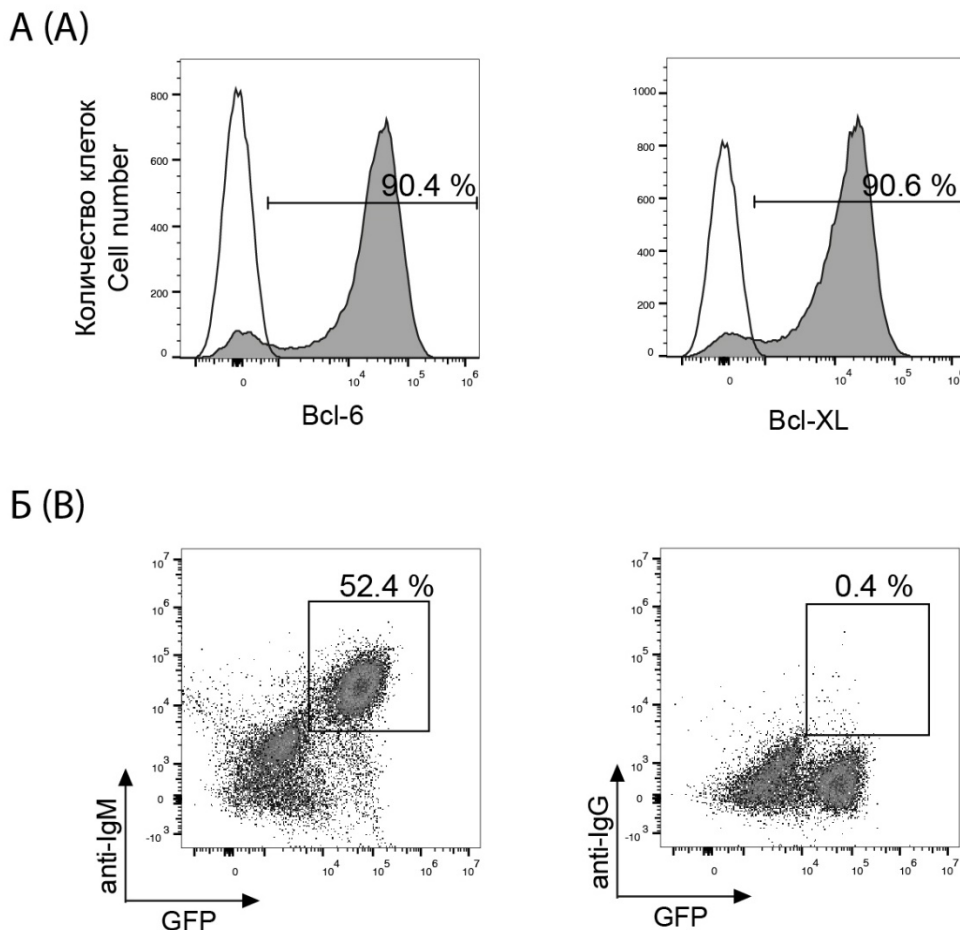


Примечание: А – распределение по флуоресценции GFP⁺ клеток. Линией показан отрицательный контроль. Б – коэкспрессия антигенов CD27 и CD38. В – экспрессия антигенов CD20 (слева), IgM (в центре), IgG (справа). Цифрами указаны % позитивных клеток.

Note: A –distribution of GFP⁺ cell fluorescence. The line shows the negative control. B – coexpression of CD27 and CD38 antigens. C – expression of antigens CD20 (left), IgM (center), and IgG (right). The numbers indicate the % of positive cells.

Рисунок 3. Фенотипирование трансдуцированных В-клеток на 42-ой день после начала стимуляции по внутриклеточным маркерам.

Figure 3. Phenotyping of transduced B cells on day 42 after the start of stimulation using intracellular markers.



Примечание: А – пермеабелизованные клетки окрашивали антителами против Bcl-6 (слева) или Bcl-XL (справа) и вторичными антителами против IgG мыши, мечеными фикоэритрином. Для отрицательного контроля приведены гистограммы флуоресценции клеток, окрашенных только вторичными антителами. Б – экспрессия внутриклеточного IgM (слева) и IgG (справа) на GFP⁺ клетках. Цифрами указаны % позитивных клеток.

Note: A, Permeabilized cells were stained with antibodies against Bcl-6 (left) or Bcl-XL (right) and secondary antibodies against mouse IgG labeled with phycoerythrin. For the negative control, fluorescence histograms of cells stained with secondary antibodies only are shown. B – expression of intracellular IgM (left) and IgG (right) on GFP⁺ cells. The numbers indicate the % of positive cells.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Филатов Александр Васильевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией;

адрес: ФГБУН «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА, Каширское шоссе 24, Москва;

телефон: 8(495)177-77-65;

e-mail: avfilat@yandex.ru

Filatov Alexander Vasilievich – professor, PhD, head of laboratory;

address: nstitute of Immunology, Kashirskoye Shosse 24, 115522, Moscow;

telephone: 8(495)177-77-65;

e-mail: avfilat@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Бязрова М. Г. – без степени, научный сотрудник;

Byazrova M. G. – without degree, research fellow;

Сухова М. М. – без степени, младший научный сотрудник;

Sukhova M. M. – without degree, junior researcher;

Михайлов А. А. – без степени, лаборант;

Mikhailov A. A. – without degree, laboratory assistant;

Прилипов А. Г. – доктор биологических наук, старший научный сотрудник;

Prilipov A. G. – Doctor of Biological Sciences, senior researcher.

Блок 3. Метаданные статьи

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПЕРВИЧНЫХ В-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ В ЗАРОДЫШЕВЫХ ЦЕНТРАХ

GENETIC MODIFICATION OF PRIMARY HUMAN B CELLS TO MODEL
THE PROCESS OF B CELL DEVELOPMENT IN GERMINAL CENTERS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ В-КЛЕТОК

GENETIC MODIFICATION OF B CELLS

Ключевые слова: наивные В-клетки, В-клетки памяти, плазматические клетки, IL-21, CD40L, Bcl-6, Bcl-XL.

Keywords: naive B cells, memory B cells, plasma cells, IL-21, CD40L, Bcl-6, Bcl-XL.

Объединенный иммунологический форум 2024.

Количество страниц текста –

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 3.

22.03.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядков ый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Бязрова М.Г., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Васильева Ю.В., Прилипов А.Г., Филатов А.В. Стимуляция В-лимфоцитов человека <i>in vitro</i> с помощью ИЛ- 21/CD40L и их характеристика. <i>Иммунология, 2020, т. 41, no. 1, с. 18–27.</i>	Byazrova M.G., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., Vasileva Yu.V., Prilipov A.G., Filatov A.V. IL-21/CD40L stimulation of human B-lymphocytes in vitro and their characteristics. <i>Immunologiya, 2020; Vol. 41, no. 6, pp. 18–27.</i>	10.33029/0206-4952-2020-41- 6-00-00
2	Boswell K.L., Watkins T.A., Cale E.M., Samsel J., Andrews S.F., Ambrozak D.R., Driscoll J.I., Messina M.A., Narpala S., Hopp C.S., Cagigi A., Casazza J.P., Yamamoto T., Zhou T., Schief W.R., Crompton P.D., Ledgerwood J.E., Connors M., Gama L., Kwong P.D., McDermott A., Mascola J.R., Koup R.A. Application of B cell immortalization for the	Boswell K.L., Watkins T.A., Cale E.M., Samsel J., Andrews S.F., Ambrozak D.R., Driscoll J.I., Messina M.A., Narpala S., Hopp C.S., Cagigi A., Casazza J.P., Yamamoto T., Zhou T., Schief W.R., Crompton P.D., Ledgerwood J.E., Connors M., Gama L., Kwong P.D., McDermott A., Mascola J.R., Koup R.A. Application of B cell immortalization for the isolation of antibodies and B cell	10.3389/fimmu.2022.1087018

	isolation of antibodies and B cell clones from vaccine and infection settings. <i>Front. Immunol.</i> , 2022, Vol. 13:1087018.	clones from vaccine and infection settings. <i>Front. Immunol.</i> , 2022, Vol. 13:1087018.	
3	Diehl S.A., Schmidlin H., Nagasawa M., van Haren S.D., Kwakkenbos M.J., Yasuda E., Beaumont T., Scheeren F.A., Spits H. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. <i>J. Immunol.</i> , 2008, Vol. 180, no. 7, pp. 4805-4815.	Diehl S.A., Schmidlin H., Nagasawa M., van Haren S.D., Kwakkenbos M.J., Yasuda E., Beaumont T., Scheeren F.A., Spits H. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. <i>J. Immunol.</i> , 2008, Vol. 180, no. 7, pp. 4805-4815.	10.4049/jimmunol.180.7.4805
4	Ding B.B., Bi E., Chen H., Yu J.J., Ye B.H. IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. <i>J. Immunol.</i> , 2013, Vol. 190, no. 4, pp. 1827-1836.	Ding B.B., Bi E., Chen H., Yu J.J., Ye B.H. IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. <i>J. Immunol.</i> , 2013, Vol. 190, no. 4, pp. 1827-1836.	10.4049/jimmunol.1201678

5	Inoue T., Kurosaki T. Memory B cells. <i>Nat. Rev. Immunol.</i> , 2024, Vol. 24, no. 1, pp. 5-17.	Inoue T., Kurosaki T. Memory B cells. <i>Nat. Rev. Immunol.</i> , 2024, Vol. 24, no. 1, pp. 5-17.	10.1038/s41577-023-00897-3
6	Inoue T., Shinnakasu R., Kurosaki T. Generation of high quality memory B cells. <i>Front Immunol.</i> , 2022, 12, 825813.	Inoue T., Shinnakasu R., Kurosaki T. Generation of high quality memory B cells. <i>Front Immunol.</i> , 2022, 12, 825813.	10.3389/fimmu.2021.825813
7	Kwakkenbos M.J., Diehl S.A., Yasuda E., Bakker A.Q., van Geelen C.M., Lukens M.V., van Bleek G.M., Widjojoatmodjo M.N., Bogers W.M., Mei H., Radbruch A., Scheeren F.A., Spits H., Beaumont T. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. <i>Nat. Med.</i> , 2010, Vol. 16, no. 1, pp. 123-128. 10.	Kwakkenbos M.J., Diehl S.A., Yasuda E., Bakker A.Q., van Geelen C.M., Lukens M.V., van Bleek G.M., Widjojoatmodjo M.N., Bogers W.M., Mei H., Radbruch A., Scheeren F.A., Spits H., Beaumont T. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. <i>Nat. Med.</i> , 2010, Vol. 16, no. 1, pp. 123-128. 10.	10. 1038/nm.2071
8	Kwakkenbos M.J., van Helden P.M., Beaumont T., Spits H. Stable long-term cultures of self-renewing B cells	Kwakkenbos M.J., van Helden P.M., Beaumont T., Spits H. Stable long-term cultures of self-renewing B cells and their	10.1111/imr.12395

	and their applications. <i>Immunol. Rev.</i> , 2016, Vol. 270, no. 1, pp. 65-77.	applications. <i>Immunol. Rev.</i> , 2016, Vol. 270, no. 1, pp. 65-77.	
--	--	--	--