领域前沿•中国



祁海,清华大学教授、清华医学(TM)常务副主任、"长江学者"特聘教授、霍华德休斯医学研究所国际学者。2014年获得国家自然科学基金委员会杰出青年科学基金项目资助,2023年获首批新基石研究员项目资助。祁海教授长期研究高亲和力抗体免疫记忆,在促进记忆生成的滤泡辅助T细胞发育、促进抗体亲和力成熟的生发中心筛选机制、长寿记忆细胞与浆细胞形成机制、神经调控免疫记忆等方面取得了国际领先水平的原创成果。研究成果在Nature、Science、Cell、Nature Immunology、Immunity等国际学术期刊上发表,并入选"2020年中国生命科学十大进展"。荣获"教育部高等学校科学研究优秀成果奖——自然科学一等奖"、"吴阶平-保罗杨森医学药学奖"、"谈家桢生命科学奖"等。

表观遗传印迹记录的记忆B细胞免疫刺激历史决定 记忆B细胞的再分化命运

邵雯1,2,3,4 祁海1,2,3,4*

('清华-北大生命科学联合中心,北京 100084;² 动态免疫学实验室,清华大学免疫所,北京 100084; ³清华大学基础医学院,北京 100084;⁴昌平实验室,北京 102206)

摘要 记忆B细胞是长期体液免疫的重要组成部分。在再次被同样的病原体感染之后,记忆 B细胞可以迅速转变为产生抗体的浆细胞,或者重新进入生发中心(GCs)进行进一步的抗体体细胞 高频突变和亲和力成熟。记忆B细胞重新参与生发中心反应对于产生针对流感病毒和HIV等高度 变异病毒的广谱中和抗体至关重要。有报道显示记忆B细胞在抗原再刺激后的分化命运与不同的 抗体种型和表面分子相关。然而,转录和表观遗传机制是否影响了这些记忆B细胞的命运尚不清 楚。该研究发现,记忆B细胞经历的每次刺激都会以依赖于干扰素调节因子4(IRF4)的方式在表观 遗传学上进行记录,这决定了B细胞中两个拮抗转录因子BLIMP1和BACH2的相对水平,进而影响 了记忆B细胞在重新刺激时进入生发中心或成为浆细胞的可能性。

关键词 记忆B细胞;免疫记忆;生发中心;浆细胞;细胞分化;表观遗传调控

Past Antigen Exposures are Epigenetically Imprinted and Determine the Memory B Cell Fate Upon Rechallenge

SHAO Wen^{1,2,3,4}, QI Hai^{1,2,3,4}*

*Corresponding author. Tel: +86-10-62796577, E-mail: qihai@tsinghua.edu.cn

科技部国家重点研发计划(批准号: 2018YFE0200300)、国家自然科学基金(批准号: 31830023、81621002、31900629、32200725)、中国博士后科学基金(批 准号: 2022T150351)、北京市科学技术委员会(批准号: Z181100001318005)和新基石项目(批准号: NCI202244)资助的课题

^{*}通信作者。Tel: 010-62796577, E-mail: qihai@tsinghua.edu.cn

This work was supported by the National Key R&D Program of China (Grant No.2018YFE0200300), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31830023, 81621002, 31900629, 32200725), China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2022T150351), the Beijing Municipal Science & Technology Commission (Grant No.Z181100001318005), and the New Cornerstone (Grant No.NCI202244)

(¹Tsinghua-Peking Center for Life Sciences, Beijing 100084, China; ²Laboratory of Dynamic Immunobiology, Institute for Immunology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; ³Department of Basic Medical Sciences, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China; ⁴Changping Laboratory, Beijing 102206, China)

Abstract Memory B cells are crucial components of long-term humoral immunity. Upon antigen reexposure, memory B cells can rapidly become antibody-producing plasma cells or they can re-enter GCs (germinal centers) to undergo further antibody somatic hypermutation and affinity maturation. Memory B cell re-participation in the GC reaction is thought to be important for generating broadly neutralizing antibodies against highly mutating viruses such as influenza virus and HIV. The fate of memory B cells into plasma cells or GC B cells following antigen re-stimulation is associated with distinct antibody isotypes and memory B cell surface phenotypes. However, whether these memory B cell fates are intrinsically programmed by transcriptional and epigenetic mechanisms was not understood. This study finds that each stimulation experienced by memory B cells is epigenetically recorded in an IRF4-dependent manner, which determines the relative levels of two antagonistic transcription factors BLIMP1 and BACH2 in B cells, and in turn dictates the likelihood that a memory B cell enters a germinal center or becomes a plasma cell upon re-stimulation.

Keywords memory B cell; immune memory; germinal center; plasma cell; cell differentiation; epigenetic regulation

1 记忆B细胞的命运决定

记忆B细胞(memory B cell, MBC)在再次被同 样的抗原刺激之后一部分细胞可以直接分化成浆细 胞,另一部分细胞则可以分化成生发中心(germinal center, GC) B细胞。有证据表明在被过继转移到受 体小鼠中重新激活的记忆B细胞中, IgM型记忆B细 胞倾向于分化形成GC B细胞,而IgG型记忆B细胞则 主要产生浆细胞(plasma cell, PC)^[1-3]。这些看似由抗 体种型决定的分化潜力不是由B细胞受体(B cell receptor, BCR)^[46]的不同信号转导能力造成的, 而是取 决于这些细胞参与免疫反应的历史^[7]。类似地,记忆 B细胞也可以根据表面分子CD80和PDL2的表达水 平而分为不同的亚群,其中CD80-PDL2-(DN)的记忆 B细胞主要形成生发中心,而CD80⁺PDL2⁺(DP)记忆B 细胞则倾向于分化成浆细胞^[8]。而这些表面分子如 何影响细胞命运的分子机制仍不清楚,是否存在内 在的转录和表观遗传机制参与调控尚待探究。

2 B细胞分化的转录调控网络

转录因子BLIMP1对于浆细胞分化是必要且充分的^[9-10],而BACH2则是生发中心形成和维持所必需的^[11-12]。BLIMP1、BACH2和其他几个关键的转录因子,包括PAX5、BCL6和IRF4,共同构成了B细胞命运决定的基因调控网络^[13-14]。其中,IRF4位于此调控网络的上游,它可以促进BLIMP1的表达,并

抑制BACH2的表达^[15]。同时BACH2和BLIMP1之间 存在拮抗作用^[16-17]。这种双向负反馈基因调控网络 往往会导致系统出现"开关"式的飞跃变化。当促进 浆细胞方向分化的转录因子(即IRF4和BLIMP1)的 活性的增加超过某个阈值时,对立侧的活性通道将 被关闭,细胞命运将直接切换到浆细胞状态。

当我们将初始B细胞视为分化的起点时,浆细 胞则代表完全分化的终点。任何最终会参与抗体反 应的B细胞都必须成为浆细胞。因此,沿着这个假 想从初始B细胞到浆细胞的分化轴,记忆B细胞可以 被视为这两个端点之间的中间状态,而不同的记忆 B细胞亚群则代表更精细的中间状态。同样地,生 发中心也代表初始B细胞和浆细胞之间的中间状态, 因为任何生发中心B细胞克隆都必须分化为浆细胞 状态,才能有效地参与抗体反应。为了探究这种可 能性,我们首先对NP-KLH免疫后14天的初始B细 胞、生发中心B细胞、记忆B细胞和浆细胞进行了 转录组分析^[18]。通过主成分分析(principal component analysis, PCA), 我们发现初始B细胞和浆细胞在 PC1轴上处于两个相反的极端, 而GC B细胞和记忆 B细胞则位于两者之间(图1A),这暗示了GC B细胞 和记忆B细胞在转录组层面是初始B细胞往浆细胞 分化的中间态。通过对PC1中有贡献的基因进行分 析,我们发现BLIMPI有正向贡献,而BACH2则有负 向贡献。因此,我们猜测在随着B细胞不断受到刺激



A: 在B6小鼠NP-KLH免疫后14天,对分离出的指定亚群进行转录组主成分分析。B: BARBE小鼠在NP-KLH免疫后第14天指定细胞的BACH2-RFP^{high}(%)和BLIMP1-EYFP⁺(%)的汇总数据。C、D: BARBE小鼠在NP-KLH免疫后第14天、第21天或第28天,生发中心(C)和记忆B细胞(D)中BACH2-RFP^{high}(%)和BLIMP1-EYFP⁺(%)的汇总数据。E、F: IgM⁺和IgG⁺记忆B细胞(E)或DN(CD80⁻PDL2⁻)、SP(PD-L2⁺CD80⁻)和DP(CD80⁺PDL2⁺)记忆B细胞(F)中BACH2-RFP^{high}(%)和BLIMP1-EYFP⁺(%)的汇总数据。

A: principal component analysis of transcriptomes of indicated subsets, isolated 14 days after NP-KLH immunization of B6 mice. B: summary data of BACH2-RFP^{high} (%) and BLIMP1-EYFP⁺ (%) in indicated cells from BARBE mice on day 14 post NP-KLH immunization. C,D: summary data of BACH2-RFP^{high} (%) and BLIMP1-EYFP⁺ (%) in GCs (C) and MBCs (D) from BARBE mice on day 14, 21, or 28 post NP-KLH immunization. E,F: summary data of BACH2-RFP^{high} (%) and BLIMP1-EYFP⁺ (%) in IgM⁺ and IgG⁺ MBCs (E) or DN (CD80⁻PDL2⁻), SP (PD-L2⁺CD80⁻) and DP (CD80⁺PDL2⁺) MBCs (F).

图1 不同B细胞和不同时间BLIMP1和BACH2表达的平衡变化(根据参考文献[18]修改) Fig.1 Changing balance of BLIMP1 and BACH2 expression in different B cells and at different times (modified from reference [18])

并向着浆细胞的分化的过程中,BLIMP1和BACH2 之间的拮抗平衡可能逐步发生了变化。

3 BLIMP1和BACH2在活化后的B细胞中的表达变化

为了在单细胞层面同时检测BLIMP1和BACH2 的表达量,我们首先将BACH2^{dRFP/+}敲入报告小鼠^[19]和 BLIMP1-EYFP转基因小鼠^[20]交配,获得的后代同时 携带两种报告基因,我们将其简称为BARBE(<u>BA</u>CH2-<u>RFP-BLIMP1-EYFP)(下划线代表缩写BARBE来源)。</u> 通过免疫BARBE小鼠,我们发现在随着B细胞从初 始B细胞到GC B细胞、记忆B细胞,最后到浆细胞的 分化过程中,BLIMP1的表达量逐级增加,而BACH2 的表达量则逐步减少(图1B)。通过定义BLIMP1相对 BACH2的表达量(BLIMP-1-to-BACH2, BLIBA)(下划 线代表缩写BLIBA来源),我们发现免疫反应后期的 GC B细胞和记忆B细胞都比反应初期的同类型细胞 具有更高的BLIBA值(图1C和图1D)。除此以外,文献 中报道的倾向于分化成浆细胞的记忆B细胞(IgG型 或者CD80⁺PDL2⁺)表达更低水平的BACH2和更高水 平的BLIMP1,而倾向于分化成GC B细胞(如IgM型或 CD80⁻PDL2⁻)则呈现相反的趋势(图1E和图1F)。

4 BLIMP1和BACH2的相对表达量决定 了记忆B细胞的再分化命运

为了测试BACH2或BLIMP1的诱导是否能改

变体内记忆B细胞亚群形成生发中心或浆细胞的倾向性,我们将单拷贝的TRE3G-BACH2-2A-tdTomato或TRE3G-BLIMP1-2A-tdTomato敲入Collal安全位点,从而创建了Collal^{Teto-BACH2-tdTomato/+}或Collal^{Teto-BLIMP1-tdTomato/+}小鼠。这些小鼠进一步与GFP转基因Rosa26^{LSL-}rt^{TA3};Cd79a^{Cre/+}B1-8^{hi}小鼠杂交。所得品系中的B细胞持续表达GFP标记,并可在强力霉素(Doxycycline)诱导下表达外源性BACH2或BLIMP1。我们将这种复合转基因品系称为BRISK^{BACH2}或BRISK^{BLIMP1}小鼠(图2A)。

表达GFP的BRISK^{BACH2}或BRISK^{BLIMP1}B1-8^{high}细胞首先被过继转移到B6小鼠中激活以产生记忆B细

胞。随后,我们将这些细胞按照IgG和非IgG或PDL2-CD80-(DN)和PDL2+CD80+(DP)进行分类,并将这些 亚群转移到不同的B6受体中,这些受体用OVA进行 预处理并喂食强力霉素(图2B)。tdTomato荧光可以 指征成功诱导BACH2或BLIMP1的细胞。

如预期那样,对照未诱导的IgG⁺记忆B细胞主 要产生浆细胞,而未诱导的非IgG(主要为IgM⁺)记忆 B细胞则主要生成次级生发中心。然而,IgG⁺记忆B 细胞在诱导了BACH2的表达后显著增加了GC的产 生比例,同时减少了浆细胞的生成,展现出了与非 IgG记忆B细胞类似的分化趋势;而在非IgG记忆B细



A: BRISK^{BACH2}和BRISK^{BLIMP1}小鼠系统的示意图。利用CRISPR/Cas9技术将表达盒敲入*Collal*安全位点,生成*Collal*^{Teto-BLCHP1}或*Collal*^{Teto-BLIMP1}等位 基因。B: 实验设计图。C: BRISK^{BACH2}小鼠未诱导IgG⁺组、诱导IgG⁺组、未诱导非IgG⁺组和诱导非IgG⁺组和诱导非IgG⁺组B1-8^{high}记忆B细胞来源的二次浆细胞或 生发中心(GCs)的汇总数据。D: BRISK^{BLIMP1}小鼠未诱导IgG⁺组、诱导IgG⁺组、未诱导加组和诱导加组和诱导加组和诱导非IgG⁺组和诱导非IgG⁺组B1-8^{high}记忆B细胞来源的二次浆细胞或生发中 心的汇总数据。E: BRISK^{BACH2}未诱导DP组、诱导DP组、未诱导DN组和诱导DN组 B1-8^{high}记忆B细胞来源的二次浆细胞或生发中 心的汇总数据。F: BRISK^{BLIMP1}未诱导DP组、诱导DP组、未诱导DN组和诱导DN组 B1-8^{high}记忆B细胞来源的二次浆细胞或生发中 心的汇总数据。F: BRISK^{BACH2}和 BRISK^{BLIMP1} mouse systems. *Collal*^{Teto-BACH2} or *Collal*^{Teto-BLIMP1} alleles were generated by knocking-in the expression cassette into the *Collal* safe locus with CRISPR/Cas9. B: the experimental design. C: summary data of secondary PCs or GCs derived from uninduced IgG⁺, induced IgG⁺, induced IgG⁺, and induced non-IgG⁺ B1-8^{high} MBCs of a BRISK^{BLIMP1} genotype. E: summary data of secondary PCs or GCs derived from uninduced DP (PDL2⁺CD80⁺), induced DP, uninduced DN (PDL2⁻CD80⁻), and induced DN B1-8^{high} MBCs of a BRISK^{BACH2} genotype. F: summary data of secondary PCs or GCs derived from uninduced DP (PDL2⁺CD80⁻), induced DP, uninduced DP, u

图2 通过诱导BACH2/BLIMP-1改变记忆B细胞亚群的分化方向(根据参考文献[18]修改)

Fig.2 Switching recall directions of MBC subsets by BACH2/BLIMP-1 induction (modified from reference [18])

胞中诱导BACH2则进一步增强了GC的生成能力并 减少了浆细胞的形成(图2C)。与此形成鲜明对比的 是,在非IgG记忆B细胞中诱导BLIMP1会使其命运 转变为主要形成浆细胞,而IgG⁺记忆B细胞过表达 BLIMP1后则几乎全部生成浆细胞(图2D)。除此之 外,BACH2的诱导还将使得PDL2⁺CD80⁺记忆B细胞 从主要偏向产生浆细胞转变为主要产生GC(图2E)。 相反,BLIMP1的诱导则将PDL2⁻CD80⁻记忆B细胞从 生成GC的命运转变为形成浆细胞的命运(图2F)。因 此,在重新激活过程中改变BACH2和BLIMP1之间 的平衡可以逆转记忆B细胞亚群本来的命运偏好。

5 BLIMP1和BACH2的平衡与IRF4介导的表观遗传印迹相关

在B细胞分化为浆细胞的过程中,BLIMP1与 BACH2之间的平衡逐渐偏向BLIMP1(图1)。虽然记 忆B细胞中BACH2的下调是显而易见的,但BLIMP1 的上调确是相对微弱的。BACH2的下调本身并不 能驱动浆细胞分化^[21]。鉴于双向负反馈基因调控网 络会导致系统出现"开关"式的飞跃变化,虽然没有 B细胞能够在保持B细胞特性的同时表达高水平的 BLIMP1,但我们猜测重新刺激后BLIMP1快速上调 的潜力可能通过表观遗传机制逐渐增加。

为了验证这一假说,我们对记忆B细胞中高表 达BACH2(BACH2^{high})和高表达BLIMP1(BLIMP1⁺) 的两群细胞进行了染色质开放程度高通量测序 (transposase-accessible chromatin with sequencing, ATAC-seq), 这两群细胞在整个记忆B细胞里 BLIMP1和BACH2的相对表达量具有最大的差异。 同时我们收集了初始B细胞、GC B细胞和浆细胞作 为对照(图3A)。根据PCA分析我们发现,在PC1轴上 BACH2^{high}的细胞在整体表观特征方面更接近GC B 细胞(图3B)。而BLIMP1+细胞则更类似浆细胞,并 且在诸多浆细胞特异开放的位点相比较 BACH2^{high} 细胞呈现更开放的趋势(图3B和图3C)。通过对差 异开放位点的结合序列进行分析,我们鉴定到了一 系列的转录因子序列,包括干扰素调节因子(IRF4和 IRF8)、参与染色质环化的CCCTC结合因子(CTCF 和CTCFLI)、Stat家族蛋白(STAT1和STAT2)以及 PU.1相关蛋白(Spib和Spi1)的结合序列(图3D)。其 中与IRF4被报道的促进浆细胞分化的事实一致, IRF4的结合序列表现出最强的富集能力。

已知BACH2作为一个转录抑制因子,其靶向 的基因与IRF4存在重叠,在这些重叠的位点(包括 BLIMP1位点)上,BACH2可以通过限制IRF4的结合 来抑制靶基因的表达^[22]。通过将IRF4靶向的浆细胞 特异性峰分离为仅包含IRF4序列的区域和同时包 含BACH2和IRF4序列的区域,我们发现与仅由IRF4 靶向的峰相比,在这些共同靶向的峰中,RFP^{high}和 EYFP⁺记忆B细胞之间的染色质开放程度变化更显 著(图3E)。这些数据与从RFP^{high}记忆B细胞到EYFP⁺ 记忆B细胞的过程中BACH2表达量显著下降的现象 一致,说明BACH2抑制了IRF4介导的表观遗传印迹。

IRF4表达或者形成复合物的差异性会导致其 表现出对不同DNA序列的结合偏好性^[23-25]。虽然 IRF4作为同型二聚体与干扰素刺激反应元件(interferon-stimulated response element, ISRE)结合时亲和 力相对较低,但它作为异型二聚体,可以与Batf-JunB 或Batf-c-Jun复合物共同结合到AP-1-IRF复合元件 (AICE)上。有趣的是,通过将IRF4结合位点分为包 含 ISRE、部分 AICE 和完整 AICE 三大类后, 我们发 现ISRE序列在染色质开放区域的富集程度随着B细 胞分化,在不同类型B细胞中呈现出一个有序且逐 渐变化的模式:它们在GC特异性峰中的富集程度 最低,在RFP^{high}特异性峰中的富集程度逐渐升高,在 EYFP⁺特异性峰中进一步富集,然后在PC特异性峰 中富集程度达到最高(图3F)。这其中就包括了IRF4 靶向的Prdm1基因附近的4个ISRE位点以及编码对 浆细胞长寿至关重要的CD28受体的Cd28基因附近 的3个ISRE位点[26-27](图3G)。在这些位点上,从初始 B细胞到GC,再到RFP^{high}和EYFP⁺记忆B细胞,最后 到浆细胞的分化过程中,我们持续观察到染色质的 开放程度呈现一个逐步但显著上升的趋势。相比之 下,AICE位点并未显示出这种特质。

6 IRF4介导的表观遗传印迹记录免疫刺激历史

*Irf4*是BCR信号下游的一个快速响应基因^[28]。 使用抗Ig抗体、抗CD40抗体或CpG激活B细胞,会 导致*Irf4* mRNA表达以剂量依赖的方式迅速上调(图 4A)。我们对用不同浓度抗Ig抗体短暂刺激的B细胞 进行ATAC-seq分析,发现该过程未发生任何细胞分 裂。与IRF4表达逐级上调一致,IRF4靶向的浆细胞 特异性基因位点也表现出逐渐增强的染色质开放性



A:对EYFP^{*}和RFP^{high} B1-8^{high}记忆B细胞的分选策略。B:对不同细胞在生发中心和浆细胞特异性位点的ATAC-seq信号进行主成分分析。C:生发中心特异性开放位点(左)或浆细胞特异性开放位点(右)处RFP^{high}和EYFP^{*}记忆B细胞的ATAC-seq信号比较。D:对RFP^{high}和EYFP^{*}记忆B细胞差异开放位点的转录因子结合序列进行分析。E:在包含IRF4和BACH2结合序列、仅包含IRF4结合序列或不含此类序列的浆细胞特异开放区域上指定细胞的相对ATAC-seq信号(以初始B细胞为基准进行归一化)。F:浆细胞、EYFP^{*}记忆B细胞、RFP^{high}记忆B细胞和生发中心中不同IRF4结合序列的富集情况。G:初始B细胞、生发中心、记忆B细胞和浆细胞中*Prdm1*和Cd28位点的ATAC-seq信号图。

A: gating strategies for sorting EYFP⁺ and RFP^{high} B1-8^{high} MBCs. B: principal component analysis of ATAC-seq profiles of indicated subsets at GCand PC-specific peaks. C: metaplot analysis comparing ATAC-seq signals between RFP^{high} and EYFP⁺ MBCs at GC-specific peaks (left) or PC-specific peaks (right). D: motif analysis of differentially accessible regions between RFP^{high} and EYFP⁺ MBCs. E: relative ATAC-seq signals in indicated cells, normalized against those in Naïve B cells, at PC-specific peaks that contain both IRF4- and BACH2-binding motifs, or only IRF4-binding motifs or none of such motifs. F: enrichment of different IRF4-binding motifs in PCs, EYFP⁺ MBCs, RFP^{high} MBCs, and GCs. G: IGV tracks showing ATAC-seq signals at *Prdm1* and *Cd28* loci in Naïve B cells, GCs, MBCs, and PCs.

图3 B细胞分化过程中形成表观遗传印迹主要依赖IRF4(根据参考文献[18]修改) Fig.3 IRF4-dependent chromatin imprinting during B cell differentiation (modified from reference [18])

(图4B),包括*Prdm1*基因位点(图4C)。因此,我们猜测BCR、CD40和细胞因子刺激的历史会累积产生IRF4介导的染色质印迹,进而在下次刺激时逐渐增

强B细胞转变为浆细胞命运的能力。

基于这个IRF4介导的表观印迹模型,即使在GC B细胞中,那些经历过更长或更强刺激的细胞也应 该会加强IRF4印迹。为了验证这一预测,我们免疫 了*SIPR2*-CreERT2;*Rosa26*-Ai14小鼠,在第6天至第8 天通过灌胃他莫昔芬(Tamoxifen)对GC和GC衍生细 胞进行脉冲标记,并在免疫后第10天和第21天分析 tdTomato⁺GC亮区(light zone, LZ) B细胞的染色质特 征(图4D)。这两个时间点的tdTomato⁺细胞在表型上 都是相同的GC LZ细胞,并且来源于第6天至第8天 标记的GC细胞。第21天的细胞平均而言应该经历 了更长时间的抗原和T细胞辅助刺激过程。

第21天的tdTomato⁺ GC LZ细胞表达的IRF4水 平高于第10天的细胞(图4E)。与第10天的细胞相比, 第21天的GC LZ细胞中*Blimp1*与*Bach2*的平衡明显向 *Blimp1*倾斜了约100倍(图4F),这表明第21天的GC LZ 细胞比第10天的细胞更接近浆细胞状态。通过ATAC-



A:用指定浓度(µg/mL)的抗IgM、抗CD40抗体和CpG刺激未成熟B细胞2h后, *Irf4* mRNA的表达情况。B:未刺激和抗IgM刺激后的B细胞在 IRF4靶向的浆细胞特异位点的ATAC-seq信号比较。C:初始B细胞(刺激前vs刺激后)以及脉冲标记的GC B细胞在*Prdm1和Cd28*位点的ATAC-seq 信号图。D:实验设计图。E:第10天和第21天亮区GC里IRF4的蛋白表达流式统计图。F:qPCR检测*Blimp1和Bach2*的mRNA相对表达比例。G: 小提琴图显示了IRF4靶向的浆细胞特异性位点(*n*=4 477)、所有浆细胞特异性位点(*n*=12 574)、生发中心特异性位点(*n*=10 185)以及所有染色 质开放位点(*n*=73 831)在第10天(DAY10)和第21天(DAY21)的亮区GC B细胞之间ATAC-seq信号的log2变化。H:在浆细胞、第10天(DAY10)亮 区GC B细胞、第21天(DAY21)亮区GC B细胞和总亮区GC B细胞中,不同IRF4结合序列的富集情况。I:第10天和第21天亮区GC B细胞在包含 完整AICE序列位点、部分AICE序列位点和ISRE序列位点处的ATAC-seq信号比较。

A: *irf4* mRNA expression following 2 h stimulation of Naïve B cells with anti-IgM, anti-CD40 antibodies and CpG at indicated concentrations (μ g/mL). B: metaplot analysis comparing ATAC-seq signals between untreated and stimulated B cells at IRF4-targeted PC-specific loci. C: IGV tracks showing ATAC-seq signals at *Prdm1* and *Cd28* loci in indicated B cells. D: experimental design. E: IRF4 expression in DAY10 and DAY21 LZ GCs. F: ratios of *Blimp1* and *Bach2* mRNA expression by qPCR. G: violin plots showing log2 of fold changes of ATAC-seq signals between day 10 (DAY10) and day 21 (DAY21) LZ GC B cells at IRF4-targeted, PC-specific peaks (*n*=4 477), at all PC-specific peaks (*n*=12 574), at GC-specific peaks (*n*=10 185), and at all peaks (*n*=73 831). H: enrichment of different IRF4-binding motifs in PCs, DAY10 LZ GCs, DAY21 LZ GCs, and total GCs. I: metaplot analysis comparing ATAC-seq signals between DAY10 and DAY21 LZ GCs at top 500 intact AICE peaks, partial AICE peaks and ISRE peaks, respectively.

图4 在时间标记的GC B细胞中的染色质状态和IRF4印迹(根据参考文献[18]修改)

Fig.4 Chromatin states and IRF4 imprints in time-stamped GC B cells (modified from reference [18])



由刺激历史印迹、表观遗传记录的浆细胞分化潜力决定的B细胞分化模型。IRF4读取刺激历史,即抗原、T细胞辅助、先天刺激和细胞因子以 剂量依赖的方式促进IRF4表达。IRF4通过在包含ISRE的位点处打开染色质,以表观遗传的方式记录这一历史,这些位点主要存在浆细胞分化 相关基因上,包括*Prdm1*位点。由于IRF4的持续作用,BLIMP1相对于BACH2的表达强度或下一次刺激后迅速上调表达的可能性逐渐增强。蓝 色阴影的深浅代表细胞经历IRF4印迹的程度、在从初始B细胞到浆细胞分化轴上与浆细胞状态的剩余距离或在下一次刺激中成为浆细胞的潜 力。对初始B细胞的更强刺激可能导致直接生成浆细胞,而较弱刺激则允许生发中心形成。IRF4印迹较少的记忆B细胞倾向于重新参与生发中 心反应,而IRF4印迹较多的记忆B细胞则倾向于产生浆细胞。IRF4印迹较少的生发中心B细胞更有可能产生记忆B细胞,而IRF4印迹较多的生 发中心B细胞则更有可能产生浆细胞。因此,早期反应中生发中心的输出包含更多记忆B细胞,而晚期初次反应中生发中心的输出则倾向于包 含更多浆细胞。在由重新激活的记忆B细胞产生的次级生发中心中,浆细胞输出占主导地位。

A proposed model of the B cell response dictated by the stimulation history-imprinted, epigenetically recorded PC differentiation potential. The history of stimulation is read by IRF4 in that stimulation by antigen, T cell help, innate stimuli and cytokines promotes IRF4 expression in a dose-dependent manner. IRF4 writes this history epigenetically by opening chromatins at ISRE-containing loci that specify the PC differentiation program, including the *Prdm1* locus. As a result of continuous action of IRF4, the relative expression strength of BLIMP1 over BACH2 is increased. Shades of the blue color represent the degree to which cells have undergone IRF4 imprinting, the remaining distance to the PC state on the Naïve-to-PC differentiation axis, or the potential to become plasma cells upon next episode of stimulation. Stronger stimulation of Naïve B cells may result in direct generation of plasma cells, while weaker stimulation permits GC formation. Memory B cells that have undergone less IRF4 imprinting tend to re-participate in the GC reaction while those that have undergone stronger IRF4 imprinting tend to produce plasma cells. GC B cells that have undergone less IRF4 imprinting are more likely to produce memory B cells while those that have undergone more are to produce plasma cells. As a consequence, output from GCs in the early response contain more plasma cells. From secondary GCs produced by reactivated memory B cells, plasma cell output dominates.

图5 IRF4印迹模型及其对B细胞响应的影响(根据参考文献[18]修改) Fig.5 The IRF4 imprinting model and implications for the B cell response (modified from reference [18])

seq分析发现,第21天的tdTomato⁺细胞的全局染色质 可及性高于第10天的对应细胞,这可能反映了长期参 与免疫反应的影响,而在浆细胞特异性开放位点的 差异更为显著,尤其是IRF4靶向的区域(图4G)。

在所有IRF4结合序列中,ISRE序列在第21天 特异性区域中的富集程度高于第10天的tdTomato⁺ 对应细胞(图4H)。与第10天的细胞相比,第21天的 tdTomato⁺细胞中ISRE包含区域的染色质可及性显 示出最大的增幅(图4I)。最后,与第10天的tdTomato⁺ 细胞相比,第21天的细胞中*Prdm1和Cd28*基因座附 近的ISRE包含区域的可及性更高(图4C)。

综上所述,我们的数据支持一个模型,即B细胞的 刺激历史部分地被记录为具有IRF4印迹的染色质特 征,这些特征进而决定了未来BLIMP1和其他浆细胞 特异性基因上调的速度和程度,并因此可以决定在重 新激活过程中记忆B细胞向浆细胞分化的概率(图5)。

7 总结与展望

我们发现的IRF4依赖性刺激历史印迹逐渐增强的现象支持了这样一种观点,即从初始状态到终末浆细胞状态的B细胞分化的连续过程中,包括活化后的B细胞、生发中心B细胞、记忆B细胞及其亚群在内的后活化细胞都是中间产物。如果刺激作用足够强,IRF4的诱导和随后的BLIMP1的诱导达到浆细胞分化的临界阈值,那么活化的B细胞将发育成浆细胞,而不会经历生发中心或记忆B细胞状态。这一通过IRF4印迹逐渐增强的B细胞效应分化模型统一解释了为什么生发中心中的浆细胞输出量从早期到晚期逐渐增加^[21,29]。它还解释了为什么与初始B细胞相比,记忆B细胞通常不会对二次免疫诱导的生发中心产生主要贡献^[30]。它还揭示了活化B细胞在滤泡外选择分化成浆细胞或者生发中心的分子机制。

我们尚不清楚 IRF4是否以及如何与染色质重 塑因子协同作用在 B细胞中引发这些染色质的变 化。IRF4是如何在低水平的情况下改变生发中心 B 细胞染色质的状态的也仍需进一步研究。仍然存在 其他可能促进或限制 IRF4印迹的机制。这些机制可 能是未来改进疫苗设计的方向。例如,对于旨在诱 导针对人类免疫缺陷病毒 (HIV)的高度突变、广泛 中和抗体的连续疫苗接种策略,可能需要考虑通过 抑制 IRF4介导的表观遗传印迹,以便在每个连续疫 苗接种中产生的记忆 B细胞能够重复参与生发中心 反应。

参考文献 (References)

- BENSON M J, ELGUETA R, SCHPERO W, et al. Distinction of the memory B cell response to cognate antigen versus bystander inflammatory signals [J]. J Exp Med, 2009, 206(9): 2013-25.
- [2] DOGAN I, BERTOCCI B, VILMONT V, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions [J]. Nat Immunol, 2009, 10(12): 1292-9.
- [3] PAPE K A, TAYLOR J J, MAUL R W, et al. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response [J]. Science, 2011, 331(6021): 1203-7.
- [4] WAKABAYASHI C, ADACHI T, WIENANDS J, et al. A distinct signaling pathway used by the IgG-containing B cell antigen receptor [J]. Science, 2002, 298(5602): 2392-5.
- [5] ENGELS N, KONIG L M, HEEMANN C, et al. Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells [J]. Nat Immunol, 2009, 10(9): 1018-25.
- [6] LIU W, MECKEL T, TOLAR P, et al. Intrinsic properties of im-

munoglobulin IgG1 isotype-switched B cell receptors promote microclustering and the initiation of signaling [J]. Immunity, 2010, 32(6): 778-89.

- [7] KOMETANI K, NAKAGAWA R, SHINNAKASU R, et al. Repression of the transcription factor Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation [J]. Immunity, 2013, 39(1): 136-47.
- [8] ZUCCARINO-CATANIA G V, SADANAND S, WEISEL F J, et al. CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype [J]. Nat Immunol, 2014, 15(7): 631-7.
- [9] SHAPIRO-SHELEF M, LIN K I, MCHEYZER-WILLIAMS L J, et al. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells [J]. Immunity, 2003, 19(4): 607-20.
- [10] TURNER C A, Jr, MACK D H, DAVIS M M. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells [J]. Cell, 1994, 77(2): 297-306.
- [11] MUTO A, TASHIRO S, NAKAJIMA O, et al. The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2 [J]. Nature, 2004, 429(6991): 566-71.
- [12] HUANG C, GENG H, BOSS I, et al. Cooperative transcriptional repression by BCL6 and BACH2 in germinal center B-cell differentiation [J]. Blood, 2014, 123(7): 1012-20.
- [13] NUTT S L, TAUBENHEIM N, HASBOLD J, et al. The genetic network controlling plasma cell differentiation [J]. Semin Immunol, 2011, 23(5): 341-9.
- [14] SCIAMMAS R, LI Y, WARMFLASH A, et al. An incoherent regulatory network architecture that orchestrates B cell diversification in response to antigen signaling [J]. Mol Syst Biol, 2011, 7: 495.
- [15] HU Q, XU T, ZHANG M, et al. Diverging regulation of Bach2 protein and RNA expression determine cell fate in early B cell response [J]. Cell Rep, 2022, 40(1): 111035.
- [16] MUTO A, OCHIAI K, KIMURA Y, et al. Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch [J]. EMBO J, 2010, 29(23): 4048-61.
- [17] OCHIAI K, KATOH Y, IKURA T, et al. Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells [J]. J Biol Chem, 2006, 281(50): 38226-34.
- [18] SHAO W, WANG Y, FANG Q, et al. Epigenetic recording of stimulation history reveals BLIMP1-BACH2 balance in determining memory B cell fate upon recall challenge [J]. Nat Immunol, 2024, doi: 10.1038/s41590-024-01900-2.
- [19] ITOH-NAKADAI A, HIKOTA R, MUTO A, et al. The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing the myeloid program [J]. Nat Immunol, 2014, 15(12): 1171-80.
- [20] RUTISHAUSER R L, MARTINS G A, KALACHIKOV S, et al. Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8⁺ T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties [J]. Immunity, 2009, 31(2): 296-308.
- [21] SHINNAKASU R, INOUE T, KOMETANI K, et al. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment [J]. Nat Immunol, 2016, 17(7): 861-9.
- [22] SIDWELL T, LIAO Y, GARNHAM A L, et al. Attenuation of

TCR-induced transcription by Bach2 controls regulatory T cell differentiation and homeostasis [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 252.

- [23] OCHIAI K, MAIENSCHEIN-CLINE M, SIMONETTI G, et al. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4 [J]. Immunity, 2013, 38(5): 918-29.
- [24] KLEIN U, CASOLA S, CATTORETTI G, et al. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination [J]. Nat Immunol, 2006, 7(7): 773-82.
- [25] SCIAMMAS R, SHAFFER A L, SCHATZ J H, et al. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation [J]. Immunity, 2006, 25(2): 225-36.
- [26] UTLEY A, CHAVEL C, LIGHTMAN S, et al. CD28 regulates metabolic fitness for long-lived plasma cell survival [J]. Cell Rep, 2020, 31(12): 107815.

- [27] ROZANSKI C H, UTLEY A, CARLSON L M, et al. CD28 promotes plasma cell survival, sustained antibody responses, and BLIMP-1 upregulation through its distal PYAP proline motif [J]. J Immunol, 2015, 194(10): 4717-28.
- [28] MATSUYAMA T, GROSSMAN A, MITTRUCKER H W, et al. Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE) [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(12): 2127-36.
- [29] WEISEL F J, ZUCCARINO-CATANIA G V, CHIKINA M, et al. A temporal switch in the germinal center determines differential output of memory B and plasma cells [J]. Immunity, 2016, 44(1): 116-30.
- [30] MESIN L, SCHIEPERS A, ERSCHING J, et al. Restricted clonality and limited germinal center reentry characterize memory B cell reactivation by boosting [J]. Cell, 2020, 180(1): 92-106,e11.