

Genome-wide multi-parametric analysis of H2AX or γ H2AX distributions during ionizing radiation-induced DNA damage response

Francesco Natale

Biophysics Group, GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH, Germany

After induction of DNA double strand breaks (DSBs), the DNA damage response (DDR) is activated. One of the earliest events in DDR is the phosphorylation of serine 139 on the histone variant H2AX (γ H2AX) catalyzed by phosphatidylinositol 3-kinases-related kinases. Despite being extensively studied, H2AX distribution across the genome and γ H2AX spreading around DSBs sites in the context of different chromatin compaction states or transcription are yet to be fully elucidated.

In the present work, first we combined G/C usage, gene content, gene expression or histone modification profiles (H3K36me3, H3K9me3) to define genomic compartments characterized by different chromatin compaction states or transcriptional activity. Next, we investigated H3, H2AX and γ H2AX distributions in such defined compartments before and after exposure to ionizing radiation (IR) to study DNA repair kinetics during DDR.

Our sequencing results indicate that H2AX distribution followed H3 occupancy and, thus, the nucleosome pattern. The highest H2AX and H3 enrichment was observed in transcriptionally active compartments (euchromatin) while the lowest was found in low G/C and gene-poor compartments (heterochromatin). Under physiological conditions, the body of highly and moderately transcribed genes was devoid of γ H2AX, despite presenting high H2AX levels. γ H2AX accumulation was observed in 5' or 3' flanking regions, instead. The same genes showed a prompt γ H2AX accumulation during the early stage of DDR which then decreased over time as DDR proceeded. Finally, during the late stage of DDR the residual γ H2AX signal was entirely retained in heterochromatic compartments. At this stage, euchromatic compartments were completely devoid of γ H2AX despite presenting high levels of non-phosphorylated H2AX.

We show that γ H2AX distribution ultimately depends on H2AX occupancy, the latter following H3 occupancy and, thus, nucleosome pattern. Both H2AX and H3 levels were higher in actively transcribed compartments. However, γ H2AX levels were remarkably low over the body of actively transcribed genes suggesting that transcription levels antagonize γ H2AX spreading.

Moreover, repair processes did not take place uniformly across the genome; rather, DNA repair was affected by genomic location and transcriptional activity. We propose that higher H2AX density in euchromatic compartments results in high relative γ H2AX concentration soon after the activation of DDR, thus favoring the recruitment of the DNA repair machinery to those compartments. When the damage is repaired and γ H2AX is removed, its residual fraction is retained in the heterochromatic compartments which are then targeted and repaired at later times.

放射線誘発 DNA 損傷応答におけるゲノムスケールでのヒストン H2AX とリン酸化型ヒストン H2AX 分布の解析

フランチェスコ ナタレ

ドイツ 重イオン研究所 生物物理部

DNA2 本鎖切断(DSB)の誘発後、DNA 損傷応答が活性化される。DNA 損傷応答における初期イベントの一つは、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼによって触媒されるヒストン H2AX の 139 番目セリンのリン酸化である。この現象は広範に研究されてきたにもかかわらず、クロマチンの凝縮や転写状態が異なる状況では、ゲノムにわたる H2AX の分布と DSB が生じた周囲のリン酸化型 H2AX(γ H2AX) の分布は完全には明らかでない。

我々は、クロマチンの凝縮や転写状態が異なることによって特徴付けられるゲノム区画を定義するため、グアニンとシトシン塩基の量(GC 含量)、遺伝子数、遺伝子発現強度あるいはヒストン修飾プロファイル(ヒストン H3 の 9 番目あるいは 36 番目リジンのトリメチル化など)を組合せた。次に、DNA 修復動態を研究するため、電離放射線の照射前後で、そのように定義された区画における H3、H2AX および γ H2AX の分布を調べた。我々の解析結果は、H2AX の分布は H3 の占有率すなわちヌクレオソームパターンに従うことを示している。最も豊富な H2AX と H3 は転写が活発なユークロマチン区画に認められ、最も少ない H2AX と H3 は低 GC 含量で遺伝子が少ないヘテロクロマチン区画に認められた。生理学的状況では、高度あるいは中程度に転写される遺伝子の中央では H2AX が豊富であるが γ H2AX は少ない。その代わりに、 γ H2AX の蓄積は 5'あるいは 3'末端部で認められた。同じ遺伝子で、DNA 損傷応答の初期に γ H2AX の迅速な蓄積が示され、DNA 損傷応答の進行に伴って減少した。ヘテロクロマチン区画では DNA 損傷応答の後半でも一部の γ H2AX が残った。この段階では、H2AX が豊富なユークロマチン区画で γ H2AX が完全になくなった。

我々は、 γ H2AX の分布が、H3 の占有率とヌクレオソームパターンに従う H2AX の占有率に依存することを示す。H2AX と H3 は遺伝子が活発に転写される区画で豊富だった。しかし、 γ H2AX は活発に転写される遺伝子で明らかに少なく、このことは転写が γ H2AX 伝播を抑制することを示唆した。さらに、修復プロセスはゲノム全体で一様には起こらず、むしろ、DNA 修復はゲノムの位置や転写活性に影響された。我々は、ユークロマチン区画における高密度の H2AX は DNA 損傷応答の活性化直後に比較的高密度の γ H2AX を導き、DNA 修復機構の動員に役立つと考えている。ユークロマチン区画で損傷が修復され、 γ H2AX が除去されたとき、ヘテロクロマチン区画では γ H2AX の一部が残っていて、修復が遅延的に行われるのだろう。