



**Zuo1 –
ein neues G-Quadruplex-bindendes Protein in
*Saccharomyces cerevisiae***

Zuo1 –
a novel G-quadruplex binding protein in
Saccharomyces cerevisiae

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Silvia Götz

aus Marktheidenfeld

Würzburg 2017

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Alexander Buchberger

1. Betreuer: Dr. Katrin Paeschke

2. Betreuer: Prof. Dr. Hans-Joachim Lipps

3. Betreuer: Prof. Dr. Stefan Gaubatz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Summary	8
1. Einleitung	9
1.1 Historischer Rückblick und Aufbau von G-Quadruplex-Strukturen	9
1.2 Diversität und Stabilität von G4-Strukturen.....	10
1.2.1 DNA-G4.....	11
1.2.2 RNA-G4	12
1.3 Genomweite Verteilung von G4-Motiven in Eukaryoten.....	12
1.4 G4-Strukturen <i>in vivo</i> und ihre biologische Relevanz	14
1.4.1 Visualisierung von G4-Strukturen	15
1.4.1.1 Antikörper	15
1.4.1.2 Liganden	17
1.4.1.3 Genomweite G4-Verteilung <i>in vivo</i>	19
1.4.2 Funktion von G4 an Telomeren.....	19
1.4.3 Einfluss von G4 auf die Transkription.....	21
1.4.3.1 Positive und negative Regulation durch G4	21
1.4.3.2 DNA/RNA-Hybrid-G4 in R-Loops	22
1.4.4 Funktion von RNA-G4.....	23
1.4.5 Potential in der Therapie.....	23
1.5 G4-Strukturen und Genomstabilität	24
1.5.1 Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Genomstabilität.....	24
1.5.2 G4 als Risiko für die Genomstabilität	26
1.5.3 Helikasen entwinden G4-Strukturen.....	27
1.6 Zuo1 – ein dynamisches Protein im Cytoplasma und Nukleus	29
1.6.1 Funktion im Cytoplasma als Co-Chaperon	29
1.6.2 Bekannte Funktionen im Nukleus	30
1.6.3 Funktion von ZRF1 bei der Nukleotidexzisionsreparatur	31
1.6.3.1 Nukleotidexzisionsreparatur	31
1.6.3.2 NER und Chromatin	34
1.6.3.4 ZRF1 bei der NER	35
1.7 Slx9 – ein Hefe-spezifisches Protein.....	37

1.8 Der Modellorganismus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
2. Ziel dieser Arbeit	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Identifikation von Zuo1 als neues G4-bindendes Protein	42
3.2 <i>in vitro</i> Bindungsstudien mit Zuo1	44
3.2.1 Zuo1 bindet spezifisch an G4-Strukturen	45
3.2.2 Zuo1 fördert die parallele Konformation und stabilisiert G4-Strukturen	47
3.3 Untersuchung der Rolle von Zuo1 an G4 <i>in vivo</i> in <i>S. cerevisiae</i>	49
3.3.1 Zuo1 bindet genomweit signifikant an G4-Motive	49
3.3.2 Stabilere G4-Strukturen beeinflussen das Wachstum ohne Zuo1 und mit erhöhten Zuo1-Level	51
3.3.3 Zuo1-Level sind in der S-Phase am höchsten.....	55
3.3.4 Zuo1 interagiert mit G4 zur Erhaltung der Genomstabilität	55
3.3.5 Einfluss von Zuo1 auf die Transkription	59
3.4 Untersuchung der Rolle von Slx9 an G4-Strukturen	62
3.4.1 Identifikation von Slx9 als G4-bindendes Protein	62
3.4.2 Slx9 interagiert <i>in vitro</i> mit höherer Affinität mit G4-Strukturen als mit Kontroll-DNA-Strukturen.....	62
3.4.3 Genomweit ist Slx9 nicht an G4-Motiven angereichert	64
3.4.4 $\Delta slx9$ hat keinen dramatischen Wachstums-Phänotyp.....	65
3.4.5 Slx9 hat keinen Einfluss auf die Genomstabilität	67
4. Diskussion	68
4.1 Zuo1 stabilisiert G4-Strukturen <i>in vitro</i>	70
4.2 Zuo1 und G4-Strukturen <i>in vivo</i> in <i>S. cerevisiae</i>	72
4.3 Zuo1 und die Replikation	75
4.4 Modell zur Rolle von Zuo1 an G4-Strukturen bei der DNA Reparatur	77
5. Material und Methoden	82
5.1 Stämme	82
5.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme.....	82
5.1.2 <i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	84
5.2 Oligonukleotide	84

5.3 Plasmide	86
5.4 Gele, Puffer, Lösungen für Standardmethoden	86
5.5 Nährmedien.....	87
5.5.1 Hefemedien	87
5.5.2 <i>E. coli</i> -Medien.....	87
5.5.3 Herstellung von Dauerkulturen.....	87
5.6 Molekularbiologische Standardmethoden.....	88
5.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	88
5.6.2 Klassische Klonierung mittels DNA-Restriktion und DNA-Ligation	88
5.6.3 Sequenz- und Ligations-unabhängige Klonierung (<i>sequence and ligation independent cloning</i> , SLIC)	88
5.6.4 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	89
5.6.5 Gerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese	89
5.6.6 Kontrolle von klonierten oder mutierten Plasmiden	89
5.7 Biochemische Methoden	89
5.7.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	89
5.7.2 Western Blot	89
5.7.3 Expression und Aufreinigung von Zuo1.....	90
5.7.4 Gelfiltration mit Zuo1	91
5.7.5 Expression und Aufreinigung von Slx9	91
5.7.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	92
5.8 Experimente mit G4-Strukturen <i>in vitro</i>	92
5.8.1 Faltung von G4-Strukturen und Nachweis durch CD Spektroskopie	92
5.8.2 <i>Annealing</i> von Oligonukleotiden.....	93
5.8.3 Radioaktive 5'-Endmarkierung von DNA-Strukturen	93
5.8.4 EMSA (<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>).....	93
5.8.5 Doppel-Filterbindungsassay	93
5.8.6 Schmelzkurve	94
5.8.7 CD Titration	94
5.9 Arbeitstechniken mit Hefe	94
5.9.1 Isolierung chromosomaler DNA	94
5.9.2 Plasmidisolierung aus Hefe	95
5.9.3 Transformation von Hefe	95
5.9.4 Isolierung von RNA	95

5.9.5 Yeast One-Hybrid System (Y1H)	95
5.9.6 Wachstumskurve.....	97
5.9.7 Spotttest	98
5.9.8 Synchronisation	98
5.9.9 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	99
5.9.10 <i>Gross chromosomal rearrangement Assay</i> (GCR)	100
5.10 Genomweite Untersuchungen	101
5.10.1 ChIP-Seq	101
5.10.2 Microarray	102
6. Literaturverzeichnis	103
7. Anhang	126
7.1 Tabellen	126
7.2 Abbildungen	134
Publikationen	141
Curriculum Vitae	142
Danksagung.....	144
Eidesstattliche Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Zusammenfassung

G-Quadruplex (G4)-Strukturen sind sehr stabile und polymorphe DNA und RNA Sekundärstrukturen mit einem konservierten Guanin-reichen Sequenzmotiv (G4-Motiv). Sie bestehen aus übereinander gestapelten planaren G-Quartetts, in denen je vier Guanine durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden.

Da G4-Motive in Eukaryoten an bestimmten Stellen im Genom angereichert vorkommen, wird angenommen, dass die Funktion von G4-Strukturen darin besteht, biologische Prozesse positiv oder negativ zu regulieren. Aufgrund der hohen thermodynamischen Stabilität von G4-Strukturen ist davon auszugehen, dass Proteine in die Faltung, Stabilisierung und Entfaltung dieser Nukleinsäure-Strukturen regulatorisch involviert sind. Bis heute wurden viele Proteine in der Literatur beschrieben, die G4-Strukturen entwinden können. Jedoch konnten bisher nur wenige Proteine identifiziert werden, die *in vivo* die Faltung fördern oder G4-Strukturen stabilisieren.

Durch Yeast One-Hybrid (Y1H)-Screenings habe ich Zuo1 als neues G4-bindendes Protein identifiziert. *In vitro* Analysen bestätigten diese Interaktion und es stellte sich heraus, dass Zuo1 G4-Strukturen stabilisiert. Übereinstimmend mit den *in vitro* Daten konnte gezeigt werden, dass Zuo1 signifikant an G4-Motive im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* bindet. Genomweit überlappen G4-Motive, an die Zuo1 bindet, mit Stellen, an denen die DNA Replikation zum Stillstand kommt und vermehrt DNA Schäden vorkommen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Zuo1 eine Funktion während der DNA Reparatur oder in Zusammenhang mit dem Vorankommen der DNA Replikationsgabel hat, indem G4-Strukturen stabilisiert werden. Diese Hypothese wird außerdem durch genetische Experimente gestützt, wonach in Abwesenheit von Zuo1 die Genominstabilität zunimmt. Aufgrund dieser Daten war es möglich ein Model zu entwickeln, bei dem Zuo1 während der S-Phase G4-Strukturen bindet und stabilisiert wodurch die DNA Replikation blockiert wird. Diese Interaktion findet neben Stellen schadhafter DNA statt und unterstützt somit DNA Reparatur-Prozesse wie beispielsweise die Nukleotidexzisionsreparatur.

Als weiteres potentielles G4-bindendes Protein wurde Slx9 in Y1H-Screenings identifiziert. *In vitro* Experimente zeigten zwar, dass Slx9 mit höherer Affinität an G4-Strukturen bindet im Vergleich zu anderen getesteten DNA Konformationen, jedoch wurde in *S. cerevisiae* genomweit keine signifikante Bindung an G4-Motive festgestellt.

Summary

G-quadruplex (G4) structures are stable and polymorphic DNA and RNA secondary structures with a conserved Guanine-rich sequence motif (G4 motif). They consist of stacked planar G-quartets that are held together by hydrogen bondings between four guanines.

Because G4 motifs are enriched at specific sites in eukaryotic genomes, G4 structures are suggested to act as functional tools in the cell to regulate biological processes in a positive or negative manner. Considering the high thermodynamic stability of G4 structures it has been suggested that proteins regulate the formation, stabilization, and unfolding of this nucleic acid based structure. Up to now many proteins that unwind G4 structures have been described in the literature. But so far only a few proteins were identified that support the formation or stabilize G4 structures *in vivo*.

Using yeast one-hybrid screenings, I identified Zuo1 as a novel G4-binding protein. *In vitro* studies confirmed this interaction and revealed that Zuo1 stabilizes G4 structures. In agreement with *in vitro* data I could show that Zuo1 binds significantly to G4 motifs in the *S. cerevisiae* genome. Genome-wide G4 motifs which are bound by Zuo1 overlap sites where DNA replication stalls and DNA damage is elevated. These results suggest that Zuo1 functions during the control of DNA repair or DNA replication fork progression by stabilization of G4 structures. This hypothesis is further supported by genetic assays showing that in the absence of Zuo1 genome instability is increased. On the basis of these data we propose a model in which Zuo1 binds and stabilizes G4 structures during S phase and by this block DNA replication. This interaction takes place near DNA damage sites and supports DNA repair processes such as nucleotide excision repair.

Additionally, Slx9 was identified in Y1H screenings as a potential G4-binding protein. *In vitro* analyses showed that Slx9 interacts with higher affinity with G4 structures compared to other tested DNA conformations. However, no significant overlap with G4 motifs could be observed genome-wide in *S. cerevisiae*.

1. Einleitung

1.1 Historischer Rückblick und Aufbau von G-Quadruplex-Strukturen

Ein Meilenstein in der Forschung war 1953 die Aufklärung des strukturellen Aufbaus der DNA als Doppelhelix mit zwei antiparallelen Strängen und kanonischen Adenin/Thymin (A/T) und Guanin/Cytosin (G/C) Basenpaarungen (Watson and Crick, 1953). James Watson und Francis Crick beschrieben erstmals die Struktur dieser Nukleinsäure, wofür Röntgenstrukturanalysen von Rosalind Franklin und Maurice Wilkins ebenso ihren Beitrag leisteten (Franklin and Gosling, 1953; Wilkins et al., 1953). Diese Entdeckung ebnete den Weg für detaillierte Forschung und Aufklärung zahlreicher molekularer Mechanismen wie das Kopieren der genetischen Information durch DNA Replikation. Neben dieser kanonischen, rechtsgängigen B-DNA kann DNA noch zahlreiche alternative Konformationen einnehmen, abhängig von der DNA-Sequenz und Interaktionen mit Proteinen. Zu diesen alternativen Sekundärstrukturen zählen G-Quadruplexe (G₄), die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen.

1962, nur wenige Jahre nach der Beschreibung der Doppelhelix, untersuchten Gellert und Kollegen durch Röntgenbeugungsanalysen die Bildung einer speziellen DNA-Struktur (Gellert et al., 1962). Damit griffen sie eine Beobachtung von 1910 durch Ivar Bang auf, wonach eine konzentrierte Lösung von Guaninylsäure ein Gel bildete und somit G-reiche Sequenzen in DNA eine Struktur höherer Ordnung bilden könnten (Bang, 1910). Die genauere Untersuchung dieses Gels offenbarte die Selbstassemblierung einer quadratischen, planaren Struktur, in der vier Guanine durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden (Abb. 1.1A) (Gellert et al., 1962). Dieses sogenannte G-Quartett konnte im Laufe der Jahre durch die Untersuchungen weiterer Forscher bestätigt werden (Sen and Gilbert, 1988; Sundquist and Klug, 1989; Williamson et al., 1989). Bereits 1963 war vermutet worden, dass sich eine mehrsträngige DNA-Struktur bildet (Fresco and Massoulié, 1963; Langridge and Rich, 1963) und zu Beginn der 1980er Jahre zeigten Lipps und Kollegen mit DNA aus dem Makronukleus von Ciliaten, dass diese Strukturen an den Telomeren viersträngig waren (Lipps, 1980; Lipps et al., 1982). Dabei handelte es sich um G-Quadruplexe, die sich aus mehreren übereinander gestapelten, planaren G-Quartetts zusammensetzen (Abb. 1.1B) (Sen and Gilbert, 1988; Sundquist and Klug, 1989; Williamson et al., 1989). Die Bildung von G₄-Strukturen konnte *in vitro* mit DNA-Sequenzen gezeigt werden, wie sie unter anderem an Telomeren verschiedener Organismen vorkommen. Der 3'-Überhang (TTGGGG)_n von *Tetrahymena* (Sundquist and Klug, 1989; Williamson et al., 1989) formte ebenso wie (T₄G₄)_n von *Oxytricha* (Lipps et al., 1982) und

Telomersequenzen von Hefe (Giraldo and Rhodes, 1994) G4-Strukturen. Aber auch einzelsträngige repetitive G-reiche DNA-Sequenzen von den *Switch*-Regionen der schweren Ketten von Immunglobulinen bildeten G4-Strukturen mit parallel laufenden DNA-Strängen *in vitro* unter physiologischen Salzkonzentrationen (Sen and Gilbert, 1988). Wie sich schließlich zeigte, liegt der G4-Struktur das G4-Sequenzmotiv zugrunde, bestehend aus viermal mindestens drei Guaninen, die durch drei Loop-Regionen variabler Länge und variabler Nukleotidzusammensetzung voneinander getrennt sind (Abb. 1.1B) (Williamson et al., 1989). Speziell die Anwesenheit monovalenter Kationen wie K^+ oder Na^+ schien wichtig für die Bildung der G4-Struktur *in vitro* (Williamson et al., 1989). Kernspinresonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)-Spektroskopie) und Kristallisationen lieferten Anfang der 1990er Jahre erste Strukturen von G-Quartetts und G4 (Aboul-ela et al., 1992; Aboul-ela et al., 1994; Kang et al., 1992; Laughlan et al., 1994; Schultze et al., 1994; Smith and Feigon, 1993). Zur selben Zeit wurde publiziert, dass *in vitro* Telomerproteine die Bildung von G4-Strukturen fördern können (Fang and Cech, 1993a, b; Giraldo and Rhodes, 1994) und G4-Strukturen die Telomerase-Aktivität inhibieren (Zahler et al., 1991). 2001 konnten G4-Strukturen erstmals *in vivo* an Telomeren in *Styloynchia* gezeigt werden (Schaffitzel et al., 2001).

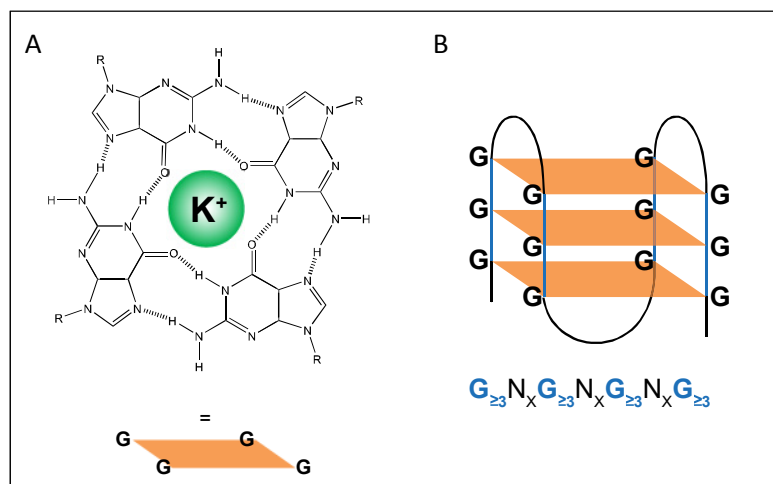


Abb. 1.1: Aufbau einer G-Quadruplex-Struktur. A) Vier Guanine interagieren durch Wasserstoffbrücken-Bindungen und bilden ein planares G-Quartett, das hier durch K^+ stabilisiert wird. B) Antiparallele, intramolekulare G4-Struktur mit drei übereinander gestapelten G-Quartets. Guanine der G-Tracts (blau) werden durch drei Loop-Regionen mit variablen Nukleotiden (schwarz) getrennt. Der G4-Struktur liegt das G4-Sequenzmotiv aus vier G-Tracts mit drei oder mehr Guaninen und Loop-Regionen (N) mit variablen Nukleotiden zugrunde.

1.2 Diversität und Stabilität von G4-Strukturen

Die Entdeckung von G4-Strukturen konzentrierte sich hauptsächlich auf DNA. Jedoch handelt es sich bei G4 um sehr diverse Strukturen, die sich auch in RNA (siehe Abschnitt 1.2.2) und DNA/RNA-Hybriden (siehe Abschnitt 1.4.3.3) bilden können.

1.2.1 DNA-G4

Grundsätzlich begünstigt das Vorliegen einzelsträngiger Nukleinsäure die Bildung der G4-Struktur, da die Doppelhelix nicht erst noch entwunden werden muss. Nichtsdestotrotz falten sich G4 *in vitro* auch in doppelsträngiger DNA (dsDNA) unter physiologischen Salzkonzentrationen (Deng and Braunlin, 1995; Kumar et al., 2008; Shirude et al., 2007) und wurden in humaner genomischer dsDNA detektiert (Lam et al., 2013). Dabei wird das Equilibrium aus dsDNA und G4-Struktur durch die DNA-Konzentration selbst, die Länge der Loop-Sequenzen sowie durch den pH, Salze und deren Konzentration und die Temperatur bestimmt (Deng and Braunlin, 1995; Kumar et al., 2008; Phan and Mergny, 2002; Salazar et al., 1996). G4-Strukturen zeigen polymorphe Topologien in Abhängigkeit verschiedener Faktoren (zusammengefasst in (Patel et al., 2007)). Es wird zwischen intra- und intermolekularen G4 unterschieden, je nachdem ob nur ein DNA-Strang oder mehrere (zwei oder vier) in die Faltung involviert sind. Bezüglich der Orientierung des Strangs ist eine DNA G4-Struktur parallel, antiparallel oder gemischt parallel/antiparallel und je nach glykosidischer Konformation *syn* oder *anti*. Die Loops können lateral oder diagonal jeweils zwei antiparallele Stränge verbinden, Propeller-artig zwischen zwei parallelen Strängen verlaufen oder in V-Form zwei G-Quartetts miteinander verbinden (zusammengefasst in (Patel et al., 2007)).

Darüber hinaus sind die Anzahl an gestapelten G-Quartetts und die Länge der Loop-Sequenzen variabel, wobei sich dieser Aspekt zusammen mit dem Vorhandensein monovalenter Kationen auch auf die Kinetik und thermodynamische Stabilität einer G4-Struktur auswirkt (zusammengefasst in (Lane et al., 2008)).

Monovalente Kationen im Zentrum der gestapelten G-Quartetts stabilisieren G4 durch Interaktion mit den negativ geladenen Carbonyl-Sauerstoff-Atomen der Guanine (Abb. 1.1A) (Hardin et al., 1992). Generell wird dabei K^+ gegenüber Na^+ präferiert (Hud et al., 1996). Allerdings gibt es Ausnahmen (Mekmaysy et al., 2008; Sagi et al., 2010; Saintome et al., 2016; Skolakova et al., 2010). Darüber hinaus kann dieselbe Sequenz verschiedene G4-Konformationen in K^+ und Na^+ einnehmen (Bouaziz et al., 1998; Kettani et al., 1998; Risitano and Fox, 2005).

G4 gelten als kompakte und äußerst stabile Strukturen und können stabiler als B-DNA sein (Jin et al., 1992). Häufig besitzen sie hohe Schmelztemperaturen (T_m) (Guedin et al., 2010) und lassen sich nur durch Temperaturen über $90^\circ C$ denaturieren (Masuda-Sasa et al., 2008; Sacca et al., 2005; Wallgren et al., 2016). Allerdings sind intramolekulare G4 thermodynamisch gesehen nicht unbedingt stabiler als andere intramolekulare DNA-Strukturen (SantaLucia,

1998). Betrachtet man jedoch die Kinetik des Entfaltens, so verläuft diese bei G4 sehr langsam im Vergleich zu DNA oder RNA Haarnadel-Strukturen (Lane et al., 2008).

Auch die Sequenz des G4-Motivs hat Einfluss auf die G4-Struktur. Typische Untersuchungen der G4-Stabilität mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie und Messungen des UV-Schmelzverhaltens zeigten, dass G4-Strukturen zunehmend stabil sind, je mehr G-Quartetts sie enthalten (Rachwal et al., 2007a; Smirnov and Shafer, 2000). Neben den G-Tracts beeinflussen sowohl die Länge der Loops, die Position des längsten Loop als auch die Nukleotidzusammensetzung die Faltung und Stabilität einer G4-Struktur (Hatzakis et al., 2010; Hazel et al., 2004; Piazza et al., 2015; Rachwal et al., 2007b; Smirnov and Shafer, 2000). Längere Loop-Sequenzen resultieren meist in weniger stabilen G4-Strukturen, gleichwohl es Ausnahmen gibt (Guedin et al., 2010; Hatzakis et al., 2010; Hazel et al., 2004; Piazza et al., 2015; Smirnov and Shafer, 2000).

Zusammenfassend wird deutlich, dass DNA G4-Strukturen sehr variabel sind und anhand der Sequenz des G4-Motivs keine verlässliche Vorhersage der Konformation oder Stabilität der Struktur möglich ist, da das Zusammenspiel verschiedener Faktoren sehr komplex ist und die Faltung beeinflusst.

1.2.2 RNA-G4

G4-Strukturen in RNA (zusammengefasst in (Agarwala et al., 2015)) sind thermodynamisch stabiler, kompakter und weniger hydriert als DNA-G4 (Arora and Maiti, 2009; Joachimi et al., 2009) und können nur die parallele Konformation einnehmen (Tang and Shafer, 2006). Diese Unterschiede sind auf die Ribose in RNA zurückzuführen. Zudem erhöht Uracil statt T im Loop die Stabilität der G4-Struktur (Olsen and Marky, 2009; Sacca et al., 2005). Grundsätzlich begünstigt auch das Vorliegen der RNA als einzelsträngige Nukleinsäure die G4-Faltung, da dies energetisch günstiger ist.

1.3 Genomweite Verteilung von G4-Motiven in Eukaryoten

Mit der Sequenzierung verschiedener Eukaryoten-Genome wie der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al., 1996) und das humane Genom (International Human Genome Sequencing, 2004; Lander et al., 2001) in den 1990er Jahren ergaben sich neue Möglichkeiten für genomweite Computeranalysen. Da durch *in vitro* Studien bekannt war, welcher Aufbau des G4-Motivs in einer Faltung der G4-Struktur resultieren würde, konnte mit Hilfe spezieller

Algorithmen genomweit nach G4-Motiven gesucht werden (zusammengefasst in (Huppert, 2008b, 2010)). Computeranalysen mit dem Algorithmus $G_{\geq 3}N_{1-7}G_{\geq 3}N_{1-7}G_{\geq 3}N_{1-7}G_{\geq 3}$ identifizierten über 375.000 Sequenzmotive im humanen Genom, die das Potential haben, sich in G4-Strukturen zu falten (Huppert and Balasubramanian, 2005; Todd et al., 2005). Neuere Algorithmen finden sogar eine noch höhere Anzahl (Bedrat et al., 2016). Mittels G4-Seq wurden über 700.000 G4-Motive im humanen Genom identifiziert (Chambers et al., 2015).

In *S. cerevisiae* wurden mehr als 1.400 potentielle G4-bildende Sequenzen identifiziert, wobei sich abzüglich repetitiver Regionen wie ribosomaler DNA (rDNA) und Telomeren, die sich als G4-reich herausstellten, mehr als 500 G4-Motive über das restliche Hefegenom verteilen (Abb. 1.2) (Capra et al., 2010; Hershman et al., 2008).

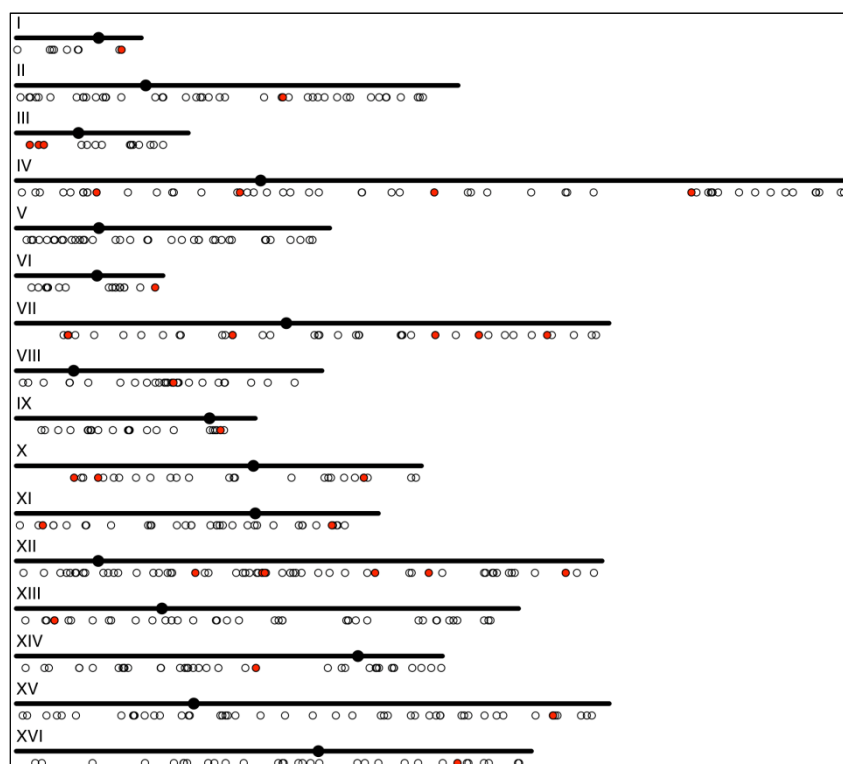


Abb. 1.2: Verteilung des DNA G4-Motivs im Genom von *S. cerevisiae*. Jeder Kreis repräsentiert die Lage eines DNA G4-Motivs auf einem Hefechromosom (I – XVI). G4-Motive, die unter den *sensu stricto* Spezies konserviert sind, sind rot markiert. (Capra et al., 2010)

Sowohl in Hefe als auch im humanen Genom sind das mehr potentielle G4, als es der GC-Gehalt dieser Genome vermuten lässt (Hershman et al., 2008; Huppert and Balasubramanian, 2005). Darüber hinaus wurden Genome weiterer Organismen wie Pflanzen, Huhn, Maus, Ratte und Schimpanse analysiert, in denen ebenfalls G4-Motive gefunden wurden (Du et al., 2007; Mullen et al., 2010; Verma et al., 2008; Yadav et al., 2008). G4-Motive gibt es auch in Prokaryoten (Beaume et al., 2013; Rawal et al., 2006) sowie in RNA- und DNA-Viren (Norseen et al., 2009; Sundquist and Heaphy, 1993; Tuesuwan et al., 2008).

In silico Analysen zeigten in bisher allen untersuchten Organismen, dass die genomweite Verteilung der potentiellen G4-bildenden Sequenzen nicht zufällig ist, sondern dass G4 mit spezifischen funktionellen Regionen korrelieren. Eine Anreicherung wurde an repetitiven DNA-Regionen wie an Telomeren und in rDNA gefunden, aber auch in Promotoren, an Bindestellen von Transkriptionsfaktoren und in Genen (*open reading frames*, ORF) sowie an meiotischen und mitotischen DNA-Doppelstrangbruchstellen und Replikationsursprüngen (Capra et al., 2010; Eddy and Maizels, 2006; Hershman et al., 2008; Huppert and Balasubramanian, 2005; Nakken et al., 2009; Todd et al., 2005). Darüber hinaus hat sich durch diese Analysen herausgestellt, dass die Lage der G4-Motive und deren Nukleotidzusammensetzung im humanen Genom sowie unter verwandten Hefe-Spezies evolutionär konserviert sind (Capra et al., 2010; Nakken et al., 2009). Diese Untersuchungen legen nahe, dass G4-Strukturen *in vivo* eine Funktion haben und bei verschiedenen biologischen Prozessen relevant sein können.

1.4 G4-Strukturen *in vivo* und ihre biologische Relevanz

In vitro Studien zur Faltung von G4 waren ein wichtiger Schritt, um diese Strukturen näher zu charakterisieren. Dennoch stellte sich die essentielle Frage, ob G4-Strukturen *in vivo* existieren. Erste Beweise lieferten *in silico* Untersuchungen über die genomweite Verteilung des G4-Motivs sowie die evolutionäre Konservierung in verschiedenen Eukaryoten. Da bis dato viele Forscher G4-Strukturen als negativen Aspekt für Zellen betrachteten, stärkten die Ergebnisse der *in silico* Studien aufgrund der evolutionären Konservierung die Möglichkeit, dass G4 positive Funktionen in Zellen einnehmen. Trotzdem blieb unklar, warum sich G4-Strukturen bilden, was zu kontroversen Diskussionen führte.

Die Anreicherung des G4-Motivs an bestimmten genomischen Regionen lieferte erste Argumente dafür, dass G4-Strukturen *in vivo* eine Rolle bei biologischen Prozessen wie der Transkription und Translation oder Replikation einnehmen (Abb. 1.3) (zusammengefasst in (Bochman et al., 2012; Lipps and Rhodes, 2009; Rhodes and Lipps, 2015)). Dieses Kapitel beschreibt wie es gelang, G4-Strukturen *in vivo* zu visualisieren und erläutert anhand einiger Beispiele im Detail, wie G4-Strukturen biologische Prozesse beeinflussen. Der Einfluss von G4-Strukturen auf die Genomstabilität wird in einem zusätzlichen Kapitel erklärt, da die Ergebnisse dieser Arbeit mit diesem Thema in Zusammenhang stehen. Darüberhinaus sind G4-Strukturen mit der Initiation der Replikation sowie mit der Meiose assoziiert, auf diese Prozesse wird in dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen.

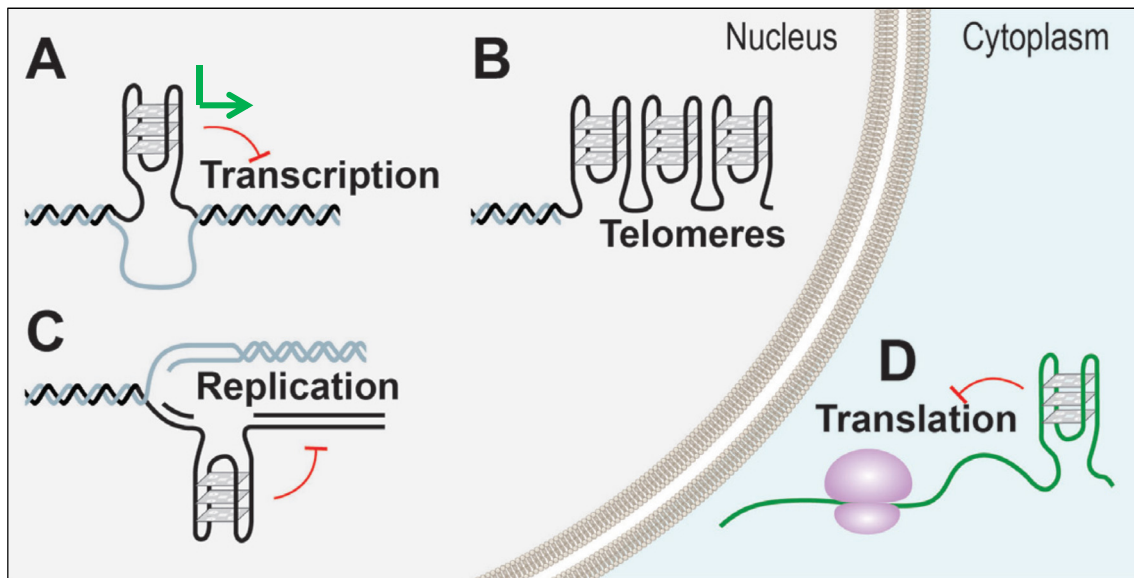


Abb. 1.3: Mögliche Funktionen von G4-Strukturen *in vivo*. Genomweite Computeranalysen haben gezeigt, dass die Verteilung des G4-Motivs nicht zufällig ist, sondern an bestimmten regulatorischen Regionen angereichert vorkommt. Somit könnten G4-Strukturen im Zellkern A) die Transkription positiv oder negativ beeinflussen und C) die Replikation blockieren. B) G4 bilden sich am einzelsträngigen 3'-Überhang der Telomeren. D) Im Cytoplasma können G4 in mRNA die Translation behindern. (Rhodes and Lipps, 2015)

1.4.1 Visualisierung von G4-Strukturen

Die Visualisierung von G4-Strukturen *in vivo* war ein weiterer wichtiger Schritt in der G4-Forschung. Für die Entwicklung G4-spezifischer Sonden wie Antikörper und Liganden musste ausgeschlossen werden, dass diese die G4-Faltung induzieren. Außerdem ist es essentiell, dass sie selektiv für G4-Strukturen sind und zwischen G4-Strukturen und dsDNA oder anderen Strukturen in der Zelle unterscheiden. Durch die Interaktion mit G4 muss ein starkes Signal generiert werden, das sich deutlich vom Hintergrund abhebt, um eine Detektion zu ermöglichen. Erschwert wird die weitere Entwicklung zudem dadurch, dass sich im Laufe der Zeit herausstellte, dass in vielen lebenden Zellen eher wenige gefaltete G4-Strukturen vorliegen (zusammengefasst in (Ma et al., 2015; Vummidi et al., 2013)). Die Vielfalt an G4-Konformationen erschwert zudem die Entwicklung von Sonden, die zwischen verschiedenen G4-Strukturen unterscheiden können (zusammengefasst in (Bhasikuttan and Mohanty, 2015)).

1.4.1.1 Antikörper

Die erste Visualisierung von G4-Strukturen in einem biologisch relevanten Kontext war mittels G4-selektiven *single chain* Antikörpern möglich, die gezeigt haben, dass sich G4-Strukturen *in vivo* an den Telomeren im Makronukleus von *Stylonychia lemnae* bilden (Schaffitzel et al., 2001). Ciliaten besitzen eine andere Art Chromatin als Säuger mit einer sehr hohen Anzahl an

Telomeren und werden daher als Modellorganismus in der Telomer-Forschung bevorzugt. Ciliaten haben zwei Nuklei. Der Makronukleus ist transkriptionell aktiv während im Mikronukleus kaum Transkription stattfindet. Während der Reproduktion bilden sich Nanochromosomen, von denen ein Makronukleus $\sim 10^8$ enthält. Hierdurch ergibt sich eine extrem hohe Anzahl an Telomeren. Zudem findet die Replikation makronuklearer DNA in einer bestimmten Region, dem Replikationsband, statt. Daraus ergeben sich Vorteile für die Untersuchung von Telomeren während der Replikation (zusammengefasst in (Lipps and Rhodes, 2009)). Aufgrund der Anreicherung des G4-Motivs an Telomeren, eigneten sich Ciliaten hervorragend zur Visualisierung von G4-Strukturen mittels Antikörpern. Zwei hochspezifische G4-Antikörper wurden durch *Ribosome Display* hergestellt. *In vitro* interagiert der eine Antikörper nur mit parallelen G4 (K_d 0,13 nM), während der zweite Antikörper nicht zwischen parallelen und antiparallelen DNA G4-Strukturen unterscheiden konnte (K_d 2-3 nM). Es wurde gezeigt, dass im Makronukleus von *Stylonychia* nur die antiparallele G4-Konformation vorkommt (Schaffitzel et al., 2001), was zu früheren Untersuchungen passt. Von früheren Studien war bekannt, dass Nanochromosomen aus dem Makronukleus in Anwesenheit monovalenter Kationen lange DNA-Aggregate bilden (Lipps, 1980) und zwei G-reiche Telomer-Überhänge *in vitro* intermolekulare antiparallele G4 bilden (Sundquist and Klug, 1989; Williamson et al., 1989). Zusammengefasst war die Arbeit von Schaffitzel et al., 2001 ein Meilenstein in der G4-Forschung und der erste direkte Nachweis, dass G4-Strukturen *in vivo* existieren.

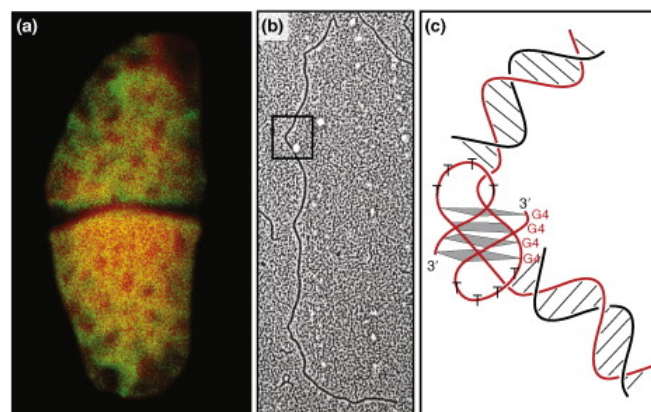


Abb. 1.4: G4-Strukturen im Makronukleus von *Stylonychia*. A) Durch konfokale Mikroskopie des Makronukleus mit Antikörpern gegen antiparallele G4-Strukturen an den Telomeren (gelb) wurde die Existenz von G4 *in vivo* nachgewiesen. Das Bild ist eine Überlagerung mit einer Aufnahme der rot gefärbten DNA. Im Replikationsband wurden keine G4-Strukturen detektiert. B) End-zu-End-Fusionen von Nanochromosomen. Die Box markiert diese Aggregation, die vermutlich durch G4-Strukturen der Telomere stattfindet. C) Modell der intermolekularen, antiparallelen G4-Faltung zwischen zwei G-reichen Überhängen der Telomere. Abbildung aus (Lipps and Rhodes, 2009).

Seit der Arbeit in Ciliaten wurden viele verschiedene Möglichkeiten untersucht, G4-Strukturen *in vivo* zu detektieren. So konnten beispielsweise drei verschiedene G4-spezifische Antikörper

generiert werden. Mit BG4 (Biffi et al., 2013) und 1H6 (Henderson et al., 2014) konnten G4-Strukturen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie erstmals in humanen Zellen visualisiert werden. Experimente mit synchronisierten Zellen zeigten die Abhängigkeit der G4 Faltung und Entfaltung im Laufe des Zellzyklus mit einem Maximum an G4 während der S-Phase (Biffi et al., 2013). In Metaphase-Chromosomen wurden G4 jedoch nicht nur an Telomeren detektiert, sondern der Großteil der G4-Antikörper-Foci war gerade nicht an Telomeren zu finden (Biffi et al., 2013). Der G4-Antikörper D1, der eine hohe Selektivität für parallele G4-Strukturen *in vitro* und *in vivo* aufweist, kam bei ChIP-Seq zum Einsatz (Liu et al., 2016). D1-Bindestellen wurden in UTRs, Promotoren und Transkriptionsstart-Stellen, Transkriptions-Terminations-Stellen sowie in Exons und Introns von Genen im Humangenom identifiziert. Konventionelle ChIP-Experimente und Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestätigten zudem die spezifische Bindung von D1 an G4-Strukturen humaner Telomere (Liu et al., 2016).

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse mit G4-Antikörpern *in vivo* können auch hier die notwendige Spezifität der Antikörper und die flexiblen Konformationen von G4-Strukturen zu Schwierigkeiten führen (Kazemier et al., 2017).

1.4.1.2 Liganden

Die Entwicklung von synthetischen, chemischen Liganden, die spezifisch und selektiv an G4-Strukturen binden, ist eine weitere Möglichkeit, die Existenz von G4 *in vivo* zu belegen. Zwar haben Liganden im Vergleich zu Antikörpern oft eine geringere Affinität für G4 (Qin and Hurley, 2008), doch ist in diesem Feld mit weiteren Verbesserungen zu rechnen. Liganden wurden entwickelt, um G4-Strukturen zu detektieren, aber auch gezielt zu stabilisieren und dienen somit als wichtiges Werkzeug bei der experimentellen Arbeit mit G4-Strukturen.

In vivo konnte in Kombination mit G4-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, dass die Anzahl der G4-Foci anstieg, nachdem die Zellen den G4-Liganden Pyridostatin (PDS), Phen-DC3 oder TMPyP4 ausgesetzt waren (Biffi et al., 2013; Henderson et al., 2014). Die Visualisierung von G4 ist auch direkt durch Liganden möglich, wie etwa nach Ligation mit einem Fluorophor (Rodriguez et al., 2012) oder durch fluoreszierende G4-Liganden (Huang et al., 2015; Shivalingam et al., 2015).

Einer der ersten publizierten Liganden, der an G4-Strukturen *in vitro* bindet, war N-Methyl-Mesoporphyrin IX (NMM) (Abb. 1.5) (Li et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die Fluoreszenz von NMM bei Anwesenheit eines G4 zunimmt, nicht aber mit dsDNA (Arthanari et al., 1998; Paramasivan and Bolton, 2008). NMM stabilisierte selektiv parallele G4-Strukturen in K^+ *in vitro* (Nicoludis et al., 2012a; Nicoludis et al., 2012b). Außerdem war die Fluoreszenz mit

einer parallelen G4-Struktur 60-fach und bei Anwesenheit eines antiparallelen G4 nur 10-fach erhöht (Sabharwal et al., 2014). Die Kristallstruktur eines NMM-Tel22-Komplex ermöglichte Einblicke, was die Selektivität von NMM ausmacht (Nicoludis et al., 2012b). Die humane Telomerasequenz Tel22 bildet ein Dimer aus zwei intramolekularen G4-Strukturen. NMM interagiert mit dem terminalen 3' G-Quartett und ist dabei optimal komplementär zur Oberfläche des G-Quartetts. Nur bei parallelen G4-Strukturen kann sich die N-Methyl-Gruppe von NMM zu den K^+ im Zentrum des G-Quartetts ausrichten (Nicoludis et al., 2012b). Allerdings wird für den *in vivo* Gebrauch häufig kritisiert, dass NMM zwar selektiv an G4-Strukturen, jedoch mit relativ geringer Affinität bindet (Ren and Chaires, 1999). TMPyP4 dagegen hat eine hohe Affinität, aber geringe Selektivität für G4-Strukturen (Parkinson et al., 2007; Wang et al., 2006b).

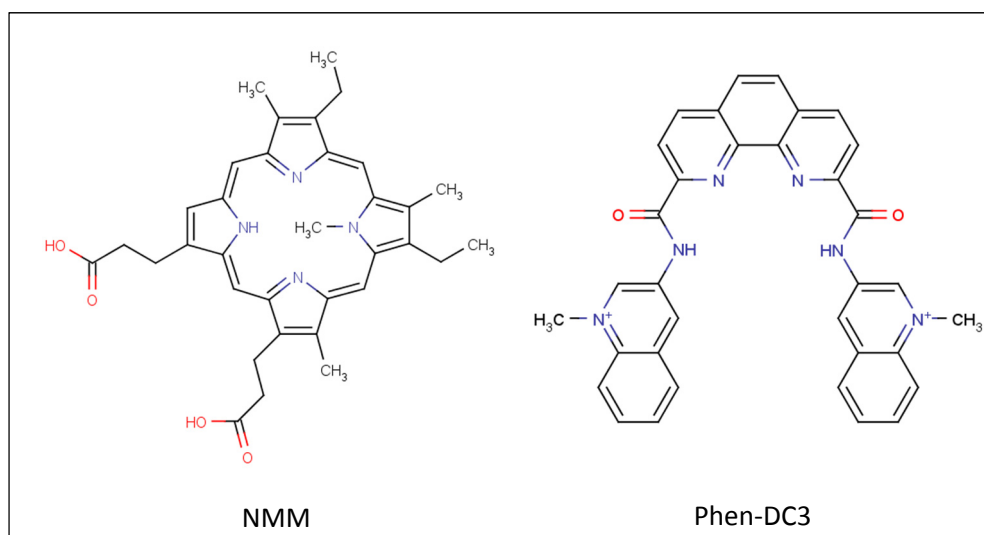


Abb. 1.5: Chemische Strukturen der Liganden NMM und Phen-DC3. Abbildung von G-Quadruplex Ligands Database (Li et al., 2013).

Als vielversprechender Ligand gilt daher das Bisquinolinium-Derivat Phen-DC3 (Abb. 1.5). Phen-DC3 bindet mit hoher Affinität und selektiv an G4-Strukturen im Vergleich zu dsDNA und erhöhte deren Schmelztemperatur um fast $30^{\circ}C$ (De Cian et al., 2007b; Monchaud et al., 2008; Piazza et al., 2010). Mit einer parallelen G4-Struktur interagierte Phen-DC3 durch Bindung an das oberste G-Quartett und Interaktion mit allen vier Guaninen (Abb. 1.6) (Chung et al., 2014). NMM und Phen-DC3 konnten erfolgreich *in vivo* in *S. cerevisiae* eingesetzt werden (Hershman et al., 2008; Huber et al., 2002; Piazza et al., 2010; Piazza et al., 2012) und wurden auch bei dieser Arbeit verwendet. Weitere wichtige Studien mit Liganden werden in den entsprechenden Abschnitten erwähnt.

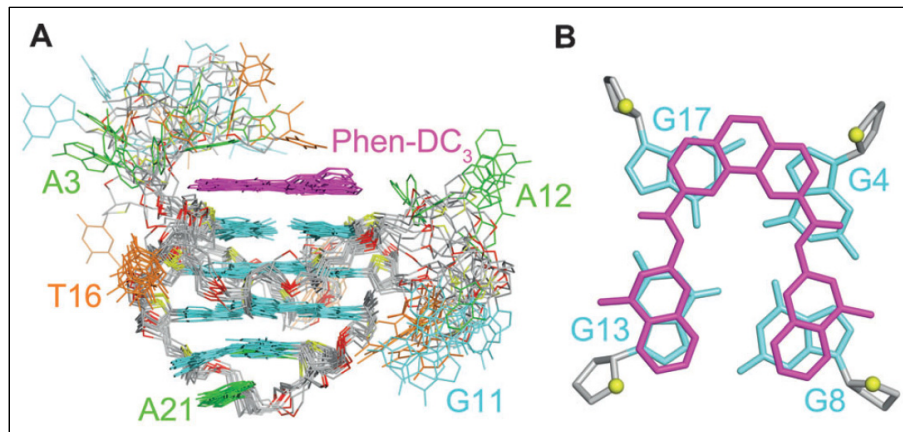


Abb. 1.6: Interaktion von Phen-DC3 mit einer parallelen DNA G4-Struktur. A) Struktur des Phen-DC3-G4-Komplex. Guanine: blau. Adenine: grün. Thymin: orange. Rückgrat und Zucker-Reste der DNA: grau. Phen-DC3: lila. B) Der Blick von oben auf den Komplex zeigt, wie Phen-DC3 mit dem obersten G-Quartetts interagiert. (Chung et al., 2014)

1.4.1.3 Genomweite G4-Verteilung *in vivo*

Durch die Entwicklung G4-spezifischer Antikörper und Liganden wird es zudem möglich, die Verteilung der G4 genomweit *in vivo* zu bestätigen. Erste ChIP-Seq Studien zeigten, dass DNA-Doppelstrangbruchstellen (DSB), die durch PDS induziert wurden, in humanen Zellen mit G4-Motiven überlappen (Rodriguez et al., 2012). Durch G4 ChIP-Seq mit dem BG4-Antikörper wurden in gesunden humanen Zellen ~1.000 G4 und in pre-karzinogenen Zellen ~10.000 G4 detektiert (Hansel-Hertsch et al., 2016). Dies entspricht nur 1% der durch G4-Seq und Algorithmen vorhergesagten G4-Motive. Es wird vermutet, dass die Faltung von G4 somit in Chromatin generell unterdrückt ist und durch Proteine reguliert wird, die eine Faltung von DNA-Strukturen ermöglichen. Dabei wurden G4 vorwiegend in regulatorischen, Nucleosomen-freien und stark transkribierten Chromatin-Regionen beobachtet (Hansel-Hertsch et al., 2016). Durch ChIP-Seq mit Antikörpern gegen Proteine, die *in vitro* G4-Strukturen gebunden oder entwunden haben, wurden Bindestellen identifiziert, die mit vorhergesagten G4-Motiven überlappen (Gray et al., 2014; Kanoh et al., 2015; Law et al., 2010; Paeschke et al., 2011).

1.4.2 Funktion von G4 an Telomeren

In eukaryotischen Genomen wurde die größte Anhäufung von G4-Motiven an Telomeren gefunden (zusammengefasst in (Huppert, 2008a)). Diese Nucleoprotein-Komplexe an den Enden linearer Chromosomen besitzen neben dsDNA einen einzelsträngigen G-reichen 3'-Überhang. Telomere schützen die Enden der Chromosomen vor Abbau, End-zu-End-Fusionen und tragen dazu bei, dass sie nicht fälschlicherweise als DSB erkannt werden (zusammengefasst in (Zakian, 2012)). Telomer-Sequenzen verschiedener Organismen falten sich *in vitro* zu G4-Strukturen (Henderson et al., 1987; Sen and Gilbert, 1988; Sundquist and

Klug, 1989; Williamson et al., 1989). Zudem unterstützen *in vitro* verschiedene Telomer-Proteine, wie TEBP α und TEBP β aus Ciliaten, die Bildung von G4-Strukturen (Fang and Cech, 1993a; Giraldo and Rhodes, 1994; Paeschke et al., 2005; Sundquist and Klug, 1989). Im Gegensatz dazu trägt das humane TEBP α -Homolog, POT1, zur Entfaltung von G4 *in vitro* bei (Wang et al., 2011; Zaug et al., 2005). *In vivo* wurden ausschließlich antiparallele G4-Strukturen an Telomeren in *Stylonychia* mit G4-Antikörpern nachgewiesen, jedoch nicht während der S-Phase (Paeschke et al., 2008; Paeschke et al., 2005; Schaffitzel et al., 2001). G4-Strukturen können ein Hindernis für die Replikation und Elongation der Telomere darstellen, da sie die Replikationsmaschinerie blockieren. Deshalb wird angenommen, dass G4 an Telomeren während der Replikation in *Stylonychia* entfaltet werden (Schaffitzel et al., 2001). In den anderen Phasen des Zellzyklus dagegen könnten sie zum Schutz der Telomere vor Nukleasen beitragen und zur Anheftung an das Kerngerüst dienen. Weitere Studien haben gezeigt, dass die Bildung von G4-Strukturen an Telomeren von TEBP α und TEBP β abhängt. TEBP α bindet sequenz-spezifisch an den 3'-Überhang (T₄G₄) und rekrutiert TEBP β , das die Faltung von G4 fördert (Fang and Cech, 1993a; Paeschke et al., 2005). Zum Zeitpunkt der Replikation müssten G4 entwunden werden, somit muss für eine Entfaltung der G4-Strukturen TEBP β von den Telomeren entfernt werden. Es wurde gezeigt, dass phosphoryliertes TEBP β die Telomerase am Ende der S-Phase zu G4-Strukturen an den Telomeren rekrutiert und dadurch TEBP β verdrängt wird (Paeschke et al., 2008). Die Telomerase wiederum rekrutiert eine Helikase der RecQ-Familie, die die G4-Strukturen entwindet (Postberg et al., 2012).

Auch die Telomerase selbst steht in Zusammenhang mit G4-Strukturen. Intramolekulare antiparallele G4 blockieren die Telomerase-Aktivität (Oganesian et al., 2007; Oganesian et al., 2006; Zahler et al., 1991). Die humane Telomerase ist in den meisten somatischen Zellen inaktiv, jedoch in vielen Krebs-Zellen hochreguliert (Shay and Wright, 2011). Daher stellen G4-Strukturen an den Telomeren geeignete Angriffspunkte für die Anti-Krebs-Therapie dar, etwa mit dem Liganden Telomestatin (De Cian et al., 2007a; Gomez et al., 2004a; Kim et al., 2003; Kim et al., 2002; Rezler et al., 2005; Shammass et al., 2004; Tahara et al., 2006; Tauchi et al., 2003; Tauchi et al., 2006). Jedoch verursacht Telomestatin auch DNA-Schäden an den Telomeren (Gomez et al., 2006; Gomez et al., 2004b; Tahara et al., 2006). Somit können verkürzte Telomere auch durch *Capping*-Defekte verursacht werden. Man geht davon aus, dass G4 zum Telomer-*Capping* beitragen (Smith et al., 2011).

G4 können sich darüber hinaus auch in dsDNA-Regionen der Telomere falten, wie etwa während der Transkription der Telomer-DNA in RNA, die TERRA genannt wird (Azzalin et al., 2007).

Zusammengefasst wurde in Ciliaten gezeigt, dass die Faltung und Entfaltung von G4 an Telomeren in Abhängigkeit des Zellzyklus reguliert ist, um den reibungslosen Ablauf der Replikation zu sichern. G4-Strukturen an Telomeren scheinen auch in anderen Eukaryoten eine Funktion zu erfüllen, jedoch sind weitere Untersuchungen nötig um genaue Mechanismen zu erkennen.

1.4.3 Einfluss von G4 auf die Transkription

1.4.3.1 Positive und negative Regulation durch G4

Computeranalysen zeigten eine Anreicherung des G4-Motivs in Promotoren in verschiedenen Eukaryoten (Capra et al., 2010; Hershman et al., 2008; Huppert and Balasubramanian, 2007; Mullen et al., 2010; Rawal et al., 2006; Yadav et al., 2008). Dies legt nahe, dass regulatorische Funktionen von G4-Strukturen einen Einfluss auf die Transkription haben können.

Darüber hinaus kommen G4-Motive gehäuft in Promotoren von humanen Proto-Onkogenen und regulatorischen Genen (die beispielsweise für Transkriptionsfaktoren codieren) vor, jedoch sind sie unterrepräsentiert in Promotoren von Tumorsuppressorgenen und *Housekeeping*-Genen (Eddy and Maizels, 2006; Huppert and Balasubramanian, 2007). Desweiteren sind im humanen Genom G4-Motive seltener auf dem codierenden Strang als auf dem nicht-codierenden Strang zu finden (Huppert et al., 2008). Dagegen wurde in Hefe keine Asymmetrie in der Lage der G4-Motive auf den beiden DNA-Strängen festgestellt (Capra et al., 2010). Jedoch korrelierten G4-Motive in Promotoren mit Nukleosomen-freien Regionen (Capra et al., 2010), was die Vermutung stützt, dass die Faltung von G4 in Nukleosomen-freien Regionen einfacher möglich ist (Hershman et al., 2008). Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass sich G4-Strukturen in Folge von negativem Supercoiling während der Transkription bilden (Sun and Hurley, 2009). Als Hypothese gilt, dass G4-Strukturen sowohl negativ als auch positiv auf die Transkription einwirken können, je nachdem auf welchem Strang sich das G4 befindet (Abb. 1.7) (zusammengefasst in (Bochman et al., 2012)). G4-Strukturen blockieren die Transkriptionsmaschinerie und das Fortschreiten der RNA Polymerase wenn sie auf dem transkribierten Strang gefaltet sind (Abb. 1.7A). Befinden sie sich jedoch auf dem komplementären Strang, fördern sie die Transkription, da die transkribierte DNA in einzelsträngiger Konformation gehalten wird (Abb. 1.7B). Außerdem können direkte und indirekte G4-bindende Proteine die Transkription beeinflussen (zusammengefasst in (Qin and Hurley, 2008)).

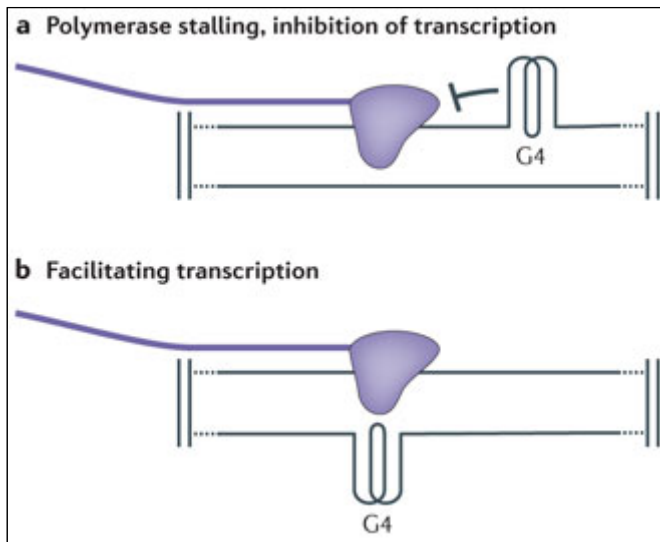


Abb. 1.7: Modell der Funktion von G4-Strukturen während der Transkription. Infolge von negativem Supercoiling falten sich G4-Strukturen. Abhängig davon, auf welchem Strang sie sich befinden beeinflussen sie die Transkription positiv oder negativ. A) G4-Strukturen auf dem transkribierten Strang sind ein Hindernis für die RNA Polymerase und inhibieren die Transkription. B) Auf dem nicht-transkribierten Strang erleichtern G4-Strukturen die Transkription, da die DNA des transkribierten Strangs dadurch einzelsträngig gehalten wird. (Bochman et al., 2012)

In einer anderen Publikation wurde anhand von Luciferase-Assays und qPCR die Hypothese aufgestellt, dass nur durch ein G4 auf dem transkribierten Strang die Transkription inhibiert wird, ein G4 auf dem komplementären Strang jedoch keine Auswirkung auf die Transkription hat (Agarwal et al., 2014).

Das am besten untersuchte Beispiel, dass G4-Strukturen die Transkription beeinflussen, stammt von dem Proto-Onkogen c-MYC (zusammengefasst in (Brooks and Hurley, 2010; Brooks et al., 2010)). *In vitro* kann sich im Nuklease-hypersensitiven Element III₁ (NHE III₁) *downstream* des c-MYC Promotors eine G4-Struktur falten (Simonsson et al., 1998), die die Transkription inhibiert (Siddiqui-Jain et al., 2002). Eine Stabilisierung des G4 durch TMPyP4 oder Nucleolin resultiert ebenso in Inhibierung der c-MYC Transkription (Bates et al., 1999; Brys and Maizels, 1994; Dempsey et al., 1999; Gonzalez et al., 2009; Gonzalez and Hurley, 2010; Grand et al., 2002; Siddiqui-Jain et al., 2002). Im Gegensatz dazu wird die Transkription durch Interaktion des ssDNA-bindenden Proteins NM23-H2 mit dem NHE III₁ aktiviert (Berberich and Postel, 1995; Ji et al., 1995; Postel et al., 1993; Thakur et al., 2009), das vermutlich die Entwindung der G4-Struktur fördert und mit dem G4-Motiv interagiert (Thakur et al., 2009). Durch die Stabilisierung der G4-Struktur kann diese Interaktion jedoch nicht stattfinden, weshalb die Transkription inhibiert ist.

1.4.3.2 DNA/RNA-Hybrid-G4 in R-Loops

Während der Transkription kann das neu synthetisierte Transkript, das noch an die RNA Polymerase gebunden ist, mit dem nicht-transkribierten DNA-Strang Basenpaarungen eingehen. Dadurch wird eine als R-Loop bezeichnete DNA/RNA-Hybrid-Struktur gebildet, die

die Transkription beeinflusst (Skourti-Stathaki and Proudfoot, 2014; Thomas et al., 1976). Wenn die Sequenzen der DNA und RNA zwei oder mehr G nebeneinander enthalten, so kann sich eine intermolekulare DNA/RNA-Hybrid-G4-Struktur bilden. Dies konnte in mehr als 97% aller humanen Gene detektiert werden (Zheng et al., 2013).

1.4.4 Funktion von RNA-G4

Die Anreicherung des G4-Motivs in 5'- und 3'-UTRs von *messenger* RNA (mRNA) sowie in ORFs bei Mensch, Hefe und in Bakterien suggeriert eine Funktion von G4-Strukturen bei der Translation (zusammengefasst in (Agarwala et al., 2015; Millevoi et al., 2012)). Mit Luciferase-Reporter-Assays wurde gezeigt, dass ein G4-Motiv aus der 5'-UTR des Proto-Onkogens NRAS *in vitro* eine G4-Struktur faltet und dadurch die Translation inhibiert (Kumari et al., 2007). Weitere Studien bestätigten diese Beobachtung (Huppert et al., 2008; Morris et al., 2010; Oyaghire et al., 2016). *In vivo* konnte beobachtet werden, dass eine Fehlregulierung von RNA-G4 in Zusammenhang mit veränderter Translation bei der Krebsentstehung steht (Thandapani et al., 2015; Wolfe et al., 2014). Allerdings wurde vor kurzem publiziert, dass in Eukaryoten die meisten RNA G4-Strukturen sehr schnell entfaltet werden (Guo and Bartel, 2016). Bisher sind drei RNA-Helikasen bekannt, die G4-Strukturen entwinden können (Mendoza et al., 2016). Der genaue Mechanismus der Entfaltung ist noch unbekannt, jedoch ist davon auszugehen, dass mehr als nur drei Helikasen involviert sind um genomweit RNA-G4 zu regulieren (Guo and Bartel, 2016).

1.4.5 Potential in der Therapie

Die Entwicklung von chemischen Liganden, die selektiv und spezifisch mit G4-Strukturen interagieren, stellt eine vielversprechende Möglichkeit für die Therapie G4-assoziiierter Krankheiten im Menschen dar. Neben Krebs stehen weitere neurodegenerative Erkrankungen und frühzeitiges Altern in Zusammenhang mit G4-Strukturen. Wie bereits erwähnt sind auch Mutationen in Helikasen, die G4-Strukturen entwinden können, der Grund für verschiedene Erkrankungen wie etwa das Werner (Mutation in WRN) und Blooms (Mutation in BLM) Syndrom (Fry and Loeb, 1999; Sun et al., 1998), Xeroderma Pigmentosum und das Cockayne Syndrom (Mutationen in XPB + XPD) (Gray et al., 2014).

Aufgrund der Anreicherung von G4-Motiven in Promotoren von Proto-Onkogenen stellen diese ein potentielles Angriffsziel dar, um die Expression des Proto-Onkogens zu beeinflussen (zusammengefasst in (Balasubramanian et al., 2011)).

Quarfloxin, das als Anti-Tumor-Mittel bereits in klinischen Studien getestet und ursprünglich wegen seiner Interaktion mit der G4-Struktur im c-MYC Promotor ausgewählt wurde, zeigt auch andere G4-abhängige Effekte. In Krebszellen akkumulierte es im Nukleolus und inhibierte die RNA Polymerase I durch Bindung an G4 der rDNA. Dabei ersetzte Quarfloxin die Bindung von Nucleolin an diese G4. Aufgrund der Verteilung von Nucleolin im Nukleoplasma kommt es letztendlich zu einer Stressantwort, die in Krebszellen zu Apoptose und Zelltod führen kann (zusammengefasst in (Brooks and Hurley, 2010)).

MM41 oder RHPS4 sind aktuellere Beispiele für Liganden mit denen reduziertes Tumorwachstum in bestimmten Modellorganismen beobachtet werden konnte (zusammengefasst in (Hansel-Hertsch et al., 2017)).

Auch RNA-G4 sind potentielle Angriffspunkte für die Krebstherapie, da eine missregulierte Translation ein Kennzeichen von Krebs ist (zusammengefasst in (Bhat et al., 2015; Cammas and Millevoi, 2016)).

1.5 G4-Strukturen und Genomstabilität

Neben regulatorischen Funktionen *in vivo* haben G4-Strukturen auch Einfluss auf die Genomstabilität.

1.5.1 Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Genomstabilität

In allen Organismen ist die Erhaltung der Genomstabilität essentiell für das Überleben von Zellen und normales Zellwachstum. Die meisten humanen Krebserkrankungen sind mit Genominstabilität assoziiert (zusammengefasst in (Lengauer et al., 1998; Vessey et al., 1999), aber auch frühzeitiges Altern und Erbkrankheiten stehen damit in Verbindung (Aguilera and Gomez-Gonzalez, 2008). Um dem Risiko der Genominstabilität entgegenzuwirken haben Zellen schon früh in der Evolution konservierte Mechanismen entwickelt. Die DNA *damage response* sichert die effiziente Reparatur verschiedener DNA Schäden (Ciccio and Elledge, 2010), während andere *Pathways* die korrekte DNA Replikation (Branzei and Foiani, 2010) und die Chromosomen-Segregation (Gordon et al., 2012) koordinieren. Die Koordination der DNA Replikation mit der Erkennung und Reparatur von DNA Schäden, der Transkription und dem Voranschreiten des Zellzyklus sichert die Genomstabilität (Abb 1.8). Kann während der Replikation nicht auf schadhafte DNA reagiert werden oder gibt es Probleme beim Voranschreiten der Replikationsgabel oder beim Neustart ins Stocken geratener

Replikationsgabeln, so führen diese Komplikationen zum Bruch der DNA, zu chromosomalen Neuordnungen (*rearrangements*) oder Mutationen.

Außerdem existieren verschiedene DNA Reparatur-Mechanismen für diverse DNA Schäden, die in Abhängigkeit von der Zellzyklus-Phase greifen. DSB werden durch *non-homologous end joining* (NHEJ) oder homologe Rekombination (HR) repariert (zusammengefasst in (Jeggo et al., 2016)). In Hefe wird HR präferiert.

Darüber hinaus sichern Kontrollpunkte im Zellzyklus die Genomstabilität, die bei DNA Schäden oder Problemen mit der Replikationsgabel aktiviert werden (Abb. 1.8). So kann bei geschädigten Zellen die Apoptose oder ein Arrest eingeleitet werden um deren Proliferation zu verhindern bevor sie in die nächste Phase des Zellzyklus gelangen (zusammengefasst in (Jeggo et al., 2016)). Häufig treten Probleme bei der Replikation an fragilen Stellen im Genom oder in stark transkribierten Genen auf, vermutlich aufgrund der Bildung von Sekundärstrukturen oder wegen Störungen bei der Koordination von RNA und DNA Polymerase. Das erfordert die Aktivierung des S-Phase-Kontrollpunkts (Aguilera and Gomez-Gonzalez, 2008). Replikationsgabeln stocken aber auch anderen speziellen DNA Regionen, wie in rDNA oder an Centromeren (zusammengefasst in (Mirkin and Mirkin, 2007)). Darüber hinaus kann es an Stellen mit einem DNA Schaden zum Stopp der Replikation kommen. Agenzien wie Hydroxyurea (HU), das die Ribonukleotid-Reduktase inhibiert und somit zum Mangel an dNTP führt (Koc et al., 2004), oder Methylmethansulfonat (MMS), das die Alkylierung von DNA verursacht (Groth et al., 2010), führen zur Aktivierung des S-Phase-Kontrollpunkts wodurch es zu Verzögerungen in der S-Phase des Zellzyklus kommt. Mit Hilfe spezieller *Translesion Synthesis* Polymerasen oder durch die Nutzung des neu synthetisierten Schwesterchromatids als Template können jedoch auch während der Replikation DNA Schäden umgangen werden, um die Genomstabilität zu erhalten.

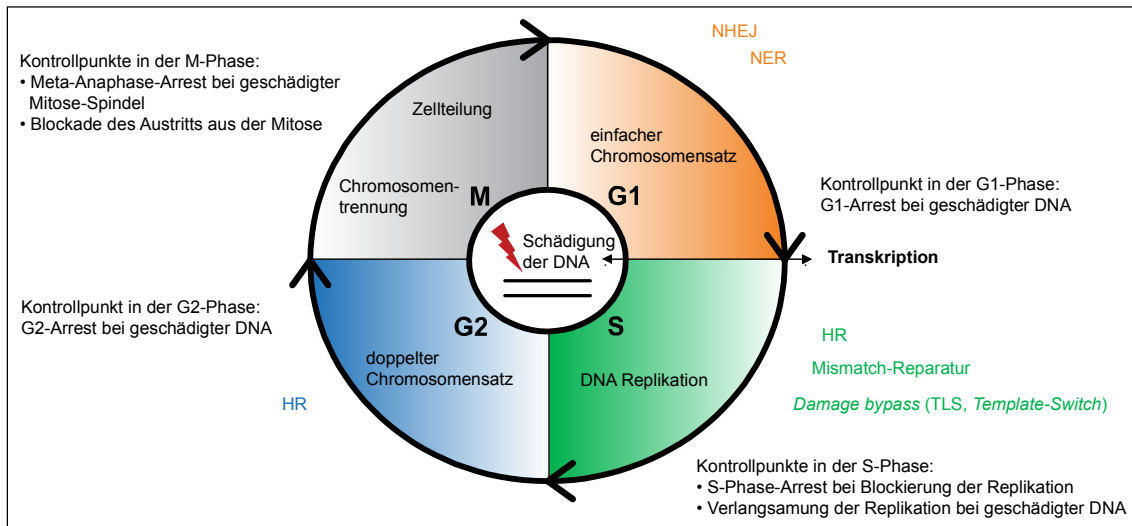


Abb. 1.8: Überblick über die Mechanismen zur Erhaltung der Genomstabilität. An Kontrollpunkten im Zellzyklus wird die DNA kontrolliert bevor sie in die nächste Phase des Zellzyklus gelangt. Je nach Zellzyklus-Phase und Art des DNA Schadens greifen verschiedene DNA-Reparaturwege. DNA-Reparaturwege die während allen Zellzyklus-Phasen aktiv sind oder für die die genaue Regulation noch unklar ist, sind nicht dargestellt. DSB in der G1-Phase werden bevorzugt durch NHEJ repariert, in der S- oder G2-Phase dagegen durch HR. ssDNA-Schäden werden in der G1-Phase und während der Transkription durch Nukleotidexzisionsreparatur (NER) repariert. Ansonsten könnte es zur Blockierung der DNA Polymerase bei der Replikation kommen. In diesem Fall kann die Replikation durch *damage bypass* fortgeführt werden, wobei spezielle *Translesion Synthesis* Polymerasen (TLS) beteiligt sind oder das neu synthetisierte Schwesterchromatid als Template genutzt wird. Fehlerhafte Basenpaarungen werden in der S-Phase durch die Mismatch-Reparatur beseitigt. DNA Schäden erfordern auch die Anpassung der Transkription.

1.5.2 G4 als Risiko für die Genomstabilität

Ein komplexes Zusammenspiel aus DNA Replikation, DNA Reparatur und Zellzyklus-Kontrolle sichert somit die Genomstabilität. In Zusammenhang damit werden auch G4-Strukturen aufgrund ihrer hohen thermodynamischen Stabilität als Risiko für den reibungslosen Ablauf der DNA Replikation angesehen (zusammengefasst in (Bochman et al., 2012)). Da die DNA während der Replikation einzelsträngig ist, können sich G4-Strukturen bilden. Ähnlich wie bei der Transkription, stellen G4-Strukturen bei der Replikation ein Hindernis für das Fortschreiten der Replikationsmaschinerie dar. Werden diese G4 nicht entwunden, so gerät die Replikationsgabel ins Stocken oder es kommt zu fehlerhafter DNA Replikation (Lopes et al., 2011; Paeschke et al., 2013; Paeschke et al., 2011; Ribeyre et al., 2009; Sabouri et al., 2014; Sarkies et al., 2010). Dies konnte durch die Stabilisierung von G4-Strukturen mit Liganden oder in Abwesenheit von G4-entwundenden Helikasen gezeigt werden. Hinweise nehmen zu, dass speziell DNA Helikasen (zusammengefasst in (Mendoza et al., 2016)) und Polymerasen eine Rolle bei der Replikation von G4-Strukturen spielen, um die Genomstabilität zu erhalten (Brosh, 2013; Wickramasinghe et al., 2015).

1.5.3 Helikasen entwinden G4-Strukturen

DNA Helikasen katalysieren unter Hydrolyse von ATP die Entwindung von dsDNA. Das ist für alle zellulären Prozesse wie Replikation, Reparatur oder Rekombination notwendig, damit die entsprechenden Maschinerien ihre Arbeit an der DNA verrichten können (Bernstein et al., 2010; Brosh, 2013; Dillingham, 2011). Wie beschrieben, können G4-Strukturen aufgrund ihrer hohen thermodynamischen Stabilität ein Risiko für die Erhaltung der Genomstabilität darstellen und müssen daher entwunden werden, um einen reibungslosen Ablauf, beispielsweise der Replikation oder Transkription, zu gewährleisten. Studien haben gezeigt, dass viele Helikasen verschiedener Eukaryoten, die mit der DNA Replikation in Verbindung stehen, G4-Strukturen *in vitro* entwinden können. Am besten charakterisiert sind bisher die Helikase-Familie Pif1, FANCI sowie die RecQ-Helikasen BLM und WRN (zusammengefasst in (Mendoza et al., 2016)). WRN, BLM und FANCI werden darüber hinaus mit humanen genetischen Krankheiten assoziiert (Fry and Loeb, 1999; Sun et al., 1998; Wu et al., 2008).

Erstmals konnte in *C. elegans* gezeigt werden, dass eine *loss of function*-Mutation im FANCI-Homolog DOG-1 genomweit zur Deletion von Regionen mit G4-Motiven führt (Cheung et al., 2002; Kruisselbrink et al., 2008). In humanen Zellen bestätigte sich dieses Ergebnis mit Mutationen in FANCI (London et al., 2008). Somit sind Helikasen essentiell um die Genomstabilität an G4-Strukturen während der Replikation aufrecht zu erhalten. Zwei Beispiele für Helikasen, die G4-Strukturen entwinden, werden nun im Detail vorgestellt, da sie wichtig für den experimentellen Teil dieser Arbeit sind.

Pif1 ist eine 5'-3' DNA Helikase-Familie und von Bakterien bis zum Menschen konserviert. In Hefe gibt es zwei Helikasen der Pif1-Familie, Pif1 und Rrm3. Pif1 kommt neben dem Nukleus auch in den Mitochondrien vor. Durch eine Punktmutation wird in *pif1-m2* Mutanten nur die mitochondriale Isoform exprimiert (Schulz and Zakian, 1994). Dass Pif1 G4-Strukturen *in vitro* entwinden kann wurde nicht nur mit Pif1 aus *S. cerevisiae* (ScPif1) beobachtet (Paeschke et al., 2013; Ribeyre et al., 2009), sondern auch mit dem humanen Homolog (Sanders, 2010). Im Vergleich mit Sgs1 und WRN sowie bakteriellem Pif1, konnte ScPif1 G4-Strukturen am effizientesten binden und entwinden (Paeschke et al., 2013). *In vivo* wurde in Hefe gezeigt, dass die Integration der Sequenz des humanen Minisatelliten CEB1, die sich *in vitro* in eine G4-Struktur faltet (Piazza et al., 2012) und von Pif1 entwunden werden kann (Ribeyre et al., 2009), in Zellen ohne Pif1 dazu führt, dass die Replikation in der Nähe des G4-Motivs stockt und es an diesen Stellen zum Bruch der DNA kommt (Lopes et al., 2011; Piazza et al., 2015; Ribeyre et al., 2009). Solche DNA-Brüche konnten verhindert werden, indem Pif1 exprimiert wurde, was belegt, dass Pif1 G4-Strukturen *in vivo* entwindet (Paeschke et al., 2013). Der

Ligand Phen-DC3 inhibierte die Entwindung des humanen CEB1-G4 durch Pif1 *in vitro* (Piazza et al., 2010). *In vivo* in Hefe induzierte Phen-DC3 die genetische Instabilität von CEB1, jedoch nicht wenn das G4-Motiv mutiert war. Außerdem resultierte die Zugabe von Phen-DC3 in einer weiteren Destabilisierung von CEB1 ohne Pif1 *in vivo* (Piazza et al., 2010).

Genomweit hat ScPif1 signifikant an G4-Motive gebunden und durch ChIP konnte gezeigt werden, dass die Bindung von ScPif1 zellzyklus-reguliert ist (Paeschke et al., 2011). Genetische Assays in Hefe offenbarten, dass in Abwesenheit von Pif DSB vermehrt vorkamen und dass G4-Motive durch Punktmutationen so verändert waren, dass sich an diesen Stellen keine G4-Struktur mehr falten kann (Paeschke et al., 2013; Paeschke et al., 2011). Daher geht man davon aus, dass ScPif1 während der Replikation zu G4-Strukturen rekrutiert wird, um die G4 am Ende der S-Phase zu entwinden. Die verbleibenden Bruchstellen in der DNA werden durch einen bisher unbekanntem Mechanismus repariert und somit die Genomstabilität gesichert. Es wird diskutiert, dass dieses Modell auch für humane Zellen zutrifft (Paeschke et al., 2011): Pif1 entwindet G4 *in vitro* (Sanders, 2010) und kommt am häufigsten am Ende der S-Phase in humanen Zellen vor (Mateyak and Zakian, 2006).

Das Homolog der humanen RecQ-Helikase WRN in *S. cerevisiae* ist Sgs1. Diese 3'-5' DNA Helikase entwindet G4-Strukturen *in vitro* effizienter als dsDNA oder andere DNA Strukturen wie beispielsweise Holliday Junctions (Huber et al., 2002; Sun et al., 1999). Die Aktivität von Sgs1 kann jedoch durch G4 Liganden wie NMM inhibiert werden, vermutlich durch Stabilisierung der G4-Strukturen (Han et al., 2000; Huber et al., 2002). Auf die Aktivität von Sgs1 an dsDNA hatten die Liganden dagegen keinen Effekt. *In vivo* gibt es weniger Studien, die eine Aktivität von Sgs1 an G4-Strukturen belegen. Die Deletion von *SGS1* (Δ *sgs1*) in Hefe hatte keinen Einfluss auf die Genomstabilität von G4 in Minisatelliten (Ribeyre et al., 2009). Der einzige Nachweis für eine Rolle *in vivo* stammt von Experimenten, die gezeigt haben, dass die mRNA-Level in Δ *sgs1* im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert waren, wenn diese Gene G4-Motive im ORF hatten (Hershman et al., 2008). Außerdem konnten Wachstumsdefekte aufgrund von Defekten beim Telomer-*Capping* dadurch ausgeglichen werden, dass *SGS1* deletiert wurde oder G4-Strukturen durch NMM stabilisiert wurden (Smith et al., 2011).

Dass die Stabilisierung von G4-Strukturen durch NMM die Entwindung verhindert, konnte auch für die RecQ-Helikase in *E. coli* sowie für BLM gezeigt werden (Huber et al., 2002; Wu and Maizels, 2001). Dabei stoppt die Helikase zwar am NMM-G4-Komplex und verbraucht ATP, allerdings ohne die G4-Struktur zu entfalten (Huber et al., 2002).

1.6 Zuo1 – ein dynamisches Protein im Cytoplasma und Nukleus

Zuo1 ist ein Eukaryoten-spezifisches J-Protein (zusammengefasst in (Chen et al., 2014)). Es ist multifunktionell und sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert (Albanese et al., 2010; Yan et al., 1998).

1.6.1 Funktion im Cytoplasma als Co-Chaperon

Zuo1 ist ein Hsp40 Homolog. Die am besten charakterisierte Funktion ist daher als Hsp70 Co-Chaperon, wobei Zuo1 mit der 40S und der 60S Untereinheit des Ribosoms assoziiert ist (Abb. 1.9) (Fiaux et al., 2010; Gautschi et al., 2002; Hundley et al., 2002; Lee et al., 2016; Yan et al., 1998). Die Interaktion mit dem Ribosom erfordert die Bindung an rRNA (Lee et al., 2016; Yan et al., 1998). Charakteristisch ist eine N-terminale ZUO1 Domäne, die ursprünglich in Hefe identifiziert wurde (zusammengefasst in (Chen et al., 2014)). Diese ZUO1 Domäne enthält eine stark konservierte J-Domäne, die für die Interaktion mit Hsp70 notwendig ist (Szabo et al., 1996).

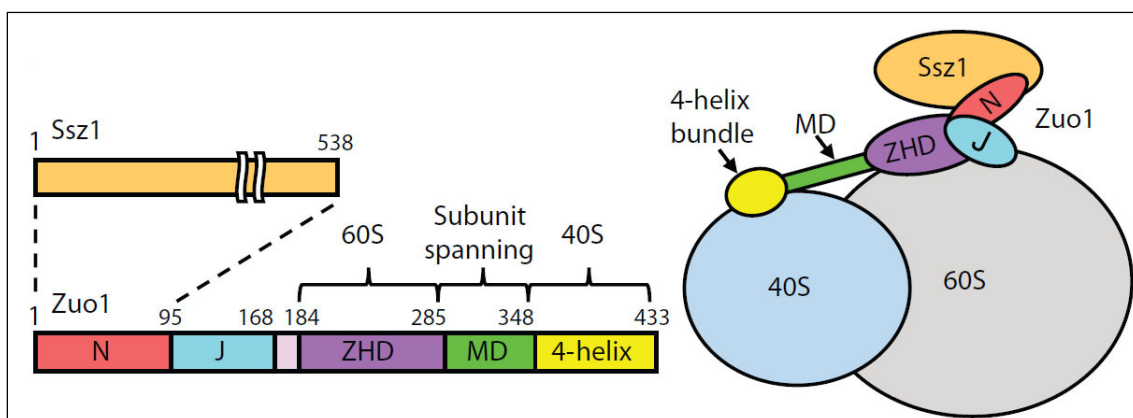


Abb. 1.9: Domänen von Zuo1. Aufbau des Zuo1 Proteins (links) und seine Interaktion mit dem Ribosom (rechts). Der N-Terminus (N) von Zuo1 interagiert mit dem Hsp70-Homolog Ssz1. Daneben befindet sich die J Domäne (J) und die Zuotin Homologie Domäne (ZHD). Eine lange α -Helix bildet die mittlere Domäne (MD) und verbindet die ZHD mit dem C-terminalen Vier-Helix-Bündel (gelb). Zuo1 interagiert durch die ZHD und das Vier-Helix-Bündel mit der 60S und 40S Untereinheit des Ribosoms. (Lee et al., 2016)

In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass Zuo1 die ATPase Aktivität des Hsp70-Homologs Ssb1/2 nur stimuliert, wenn es den stabilen ribosomen-assoziierten Komplex (*ribosome-associated complex*, RAC) bildet (Huang et al., 2005). RAC ist ein Heterodimer aus Zuo1 und einem weiteren Hsp70-Homolog, Ssz1. RAC formt zusammen mit Ssb eine funktionelle Chaperon-Triade, die die Interaktion von Ssb mit entstehenden Polypeptiden beeinflusst (Gautschi et al.,

2001; Gautschi et al., 2002), wobei weder Zuo1 noch Ssz1 direkt mit entstehenden Polypeptiden interagieren (Albanese et al., 2006; Yam et al., 2005).

1.6.2 Bekannte Funktionen im Nukleus

Neben dieser cytoplasmatischen Funktion als Co-Chaperon, agiert Zuo1 auch im Zellkern. So ist Zuo1 zusammen mit Ssb in nukleare Schritte der Ribosomenbiogenese involviert (Albanese et al., 2010). Zudem wurde gezeigt, dass Zuo1 hauptsächlich im Nukleolus lokalisiert war, wenn die C-terminale Domäne (CTD) deletiert wurde. Dies deutet darauf hin, dass sich das nukleare Export-Signal (NES) in der CTD befindet (Albanese et al., 2010). Wie Zuo1, wandert auch Ssb zwischen Cytoplasma und Nukleus (Shulga et al., 1999).

Darüber hinaus wurde in verschiedenen Organismen gezeigt, dass Zuo1 in die Regulation der Transkription involviert ist. In *S. cerevisiae* interagiert Zuo1 mit seiner CTD mit dem Transkriptionsfaktor Prd1, wodurch dieser aktiviert wird und den *Pleiotropic Drug Resistance Pathway* induziert (Ducett et al., 2013; Prunuske et al., 2012). Dabei spielt die CTD eine entscheidende Rolle. Sie kann sich automatisch in eine inhibitorische Vier-Helix-Konformation falten (Abb. 1.10), in der die Bindung und Aktivierung von Pdr1 nicht möglich ist. Im Gegensatz dazu, bewirkt eine Entfaltung der CTD die Dissoziation von Zuo1 vom Ribosom und ermöglicht die Bindung an Pdr1, da kritische Bindestellen in dieser Konformation zugänglich sind (Ducett et al., 2013). Somit werden cytoplasmatische und nukleare Funktionen von Zuo1 durch Konformationsänderungen der CTD miteinander verbunden.

Das humane Ortholog ZRF1 (oder DnaJC2) ist ebenfalls in die Regulation der Transkription involviert (Richly and Di Croce, 2011; Richly et al., 2010). Darüber hinaus fungiert ZRF1 als Chromatin-Modulator und beeinflusst dadurch die Entwicklung und DNA Reparatur (Gracheva et al., 2016; Richly et al., 2010). Auf diesen Aspekt wird im folgenden Abschnitt noch genauer eingegangen.

In der Vergangenheit wurde außerdem gezeigt, dass Zuo1 *in vitro* an verschiedene Nukleinsäure-Strukturen bindet wie tRNA und Z-DNA (Wilhelm et al., 1994; Zhang et al., 1992). Bei Z-DNA handelt es sich um die linksgängige Konformation der DNA-Doppelhelix (Gessner et al., 1989). Sequenzen, die *in vitro* Z-DNA bilden, sind alternierend zwischen Purin- und Pyrimidinbasen. In Eukaryoten korrelieren diese Regionen mit Transkriptionsstartstellen (Schroth et al., 1992). Unter physiologischen Salzkonzentrationen stabilisierte negatives Supercoiling die Z-Konformation und Torsionsstress, wie er während der Transkription auftritt, konnte durch die Bildung der Z-Form gemindert werden (Ha et al., 2005; Rahmouni and Wells,

1989). Eine regulatorische Funktion von Z-DNA bei der Transkription und eine Relevanz dieser DNA Konformation *in vivo* wird jedoch kontrovers diskutiert.

Vor einigen Jahren konnte zudem die Interaktion von Zuo1 mit kleinen inhibitorischen RNAs beobachtet werden (Raychaudhuri et al., 2006). Das homologe Protein in Mäusen, MIDA1, bindet an DNA, die kleine *Stem Loop* Strukturen bilden (Inoue et al., 2000). Bisher wurde allerdings keinerlei biologische Relevanz der Bindung von Zuo1 an die genannten Nukleinsäure-Strukturen erkannt.

1.6.3 Funktion von ZRF1 bei der Nukleotidexzisionsreparatur

Eine neue Studie hat gezeigt, dass das humane Ortholog ZRF1 in die NER involviert ist (Gracheva et al., 2016).

1.6.3.1 Nukleotidexzisionsreparatur

Einer der Haupt-Reparaturwege für DNA in Pro- und Eukaryoten ist die NER. Verschiedene DNA Schäden, wie 6-4 Photoprodukte oder Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs), die durch UV Strahlung entstehen, können durch NER repariert werden. Aber auch *inter-* und *intrastrand Crosslinks*, hervorgerufen durch Agenzien wie Cisplatin, und weitere DNA Schäden sind Substrate für die NER (zusammengefasst in (de Laat et al., 1999; Marteijn et al., 2014)). Defekte bei der NER führen im Menschen zu genetischen Erkrankungen wie Xeroderma Pigmentosum mit der charakteristischen Hypersensitivität gegenüber Sonnenlicht und einer Prädisposition für Hautkrebs (Friedberg, 2001). Grundsätzlich werden die Transkriptionsgekoppelte (*transcription-coupled*, TC) NER und die *Global Genome* (GG) NER unterschieden (Abb. 1.10) (zusammengefasst in (Fousteri and Mullenders, 2008; Marteijn et al., 2014; Scharer, 2013)). TC-NER dient der schnellen Reparatur von DNA Schäden im transkribierten Strang aktiv transkribierter Gene, wo die gestoppte RNA Polymerase II die DNA *damage response* (DDR) auslöst und mit den TC-NER spezifischen Faktoren CSA und CSB die TC-NER initiiert. Im Gegensatz dazu agiert GG-NER genomweit unabhängig von der Transkription. Die Initiation der GG-NER erfolgt durch den XPC/RAD23B Komplex und je nach DNA Schaden mit Hilfe von UV-DDB1/2 (*UV-damaged DNA-binding proteins 1,2*). CPDs destabilisieren die DNA-Doppelhelix nicht stark genug, als dass XPC/RAD23B mit erkennbarer Spezifität daran bindet (Reardon and Sancar, 2003; Sugasawa et al., 2001; Wittschieben et al., 2005). Daher wird UV-DDB benötigt, um die Bindung von XPC zu erleichtern (Sugasawa et al., 2005). Nach der Detektion des DNA Schadens wird der Transkriptionsfaktor TFIIH rekrutiert, um die DNA um die Schadstelle herum zu entwinden. Dies übernehmen die Helikase-Untereinheiten XPB und

XPD (Evans et al., 1997; Tapias et al., 2004). Dabei spielt von XPB nur die ATPase, nicht aber die Helikase-Aktivität eine Rolle bei der NER, wohingegen bei XPD die Helikase- und die ATPase-Aktivität notwendig sind, damit XPD auf der DNA entlang wandern und die DNA entwinden kann (Coin et al., 2007; Winkler et al., 2000). Um den Prä-Exzisions-Komplex zu vervollständigen werden XPA, RPA und XPG rekrutiert. XPA interagiert mit sämtlichen NER-Proteinen und überprüft deren korrekte Position bevor der DNA Schaden ausgeschnitten wird. RPA bindet ssDNA komplementär zum DNA Schaden und interagiert mit XPA. Die Endonuklease XPG bindet an TFIIH, die katalytische Aktivität wird jedoch erst im nächsten Schritt der NER benötigt. Der Prä-Exzisions-Komplex ist relativ stabil (Wakasugi and Sancar, 1998) und erst wenn ERCC1/XPF durch Interaktion mit XPA rekrutiert wird kann die DNA um die Schadstelle herum geschnitten werden (Li et al., 1994; Li et al., 1995). Dabei schneidet zuerst ERCC1/XPF 5' und danach XPG 3'. TFIIH verlässt gebunden an das ausgeschnittene circa 30 nt große Oligonukleotid die DNA (Kemp et al., 2012). Die entstandene Lücke wird durch DNA Synthese und Ligation geschlossen. Dabei werden die DNA Polymerasen δ , ϵ oder κ durch PCNA und RFC rekrutiert und die DNA Ligasen 1 oder 3 vervollständigen die DNA Reparatur.

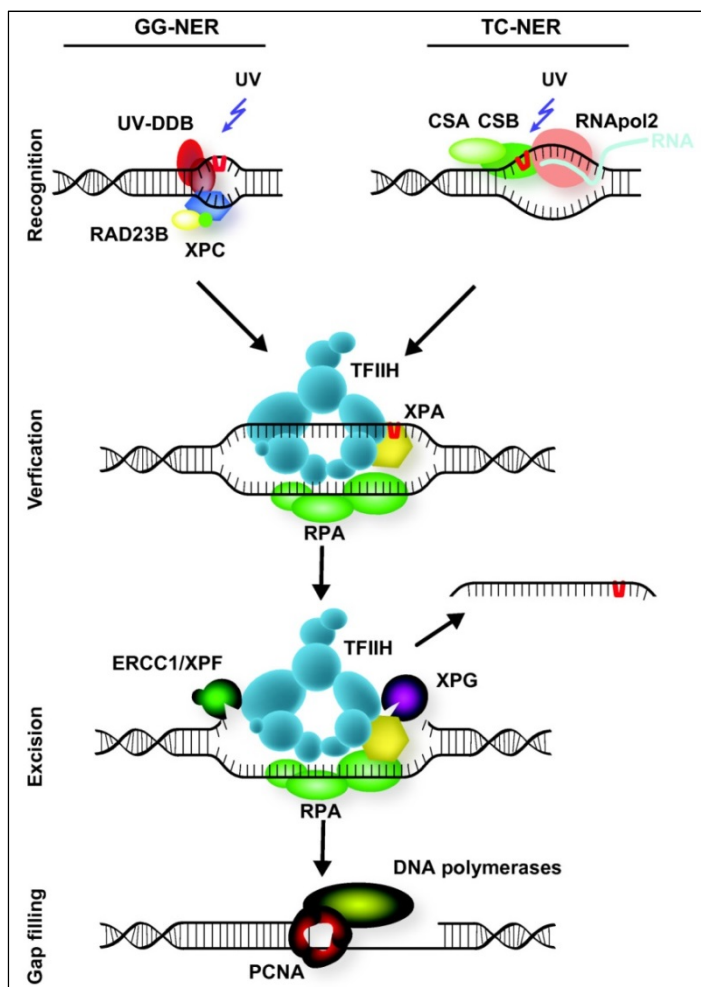


Abb. 1.10: Überblick über den Ablauf von TC-NER und GG-NER in Säugern. NER repariert zahlreiche DNA Schäden, darunter durch UV Strahlung ausgelöste Schäden. Die NER wird durch zwei unterschiedliche Mechanismen der Schadenserkenkung ausgelöst. TC-NER wird initiiert durch das Stoppen der RNA Polymerase 2 an der Stelle des DNA Schadens im transkribierten Strang aktiver Gene und erfordert zudem die Rekrutierung der Proteine CSA und CSB. Genomweit werden DNA Schäden durch GG-NER repariert, die durch den UV-DDB Ubiquitin-Ligase-Komplex und das Heterodimer XPC/RAD23B initiiert wird. Nach der Detektion wird TFIIH rekrutiert um die DNA um die Schadstelle herum zu entwinden. Die Proteine XPA und RPA unterstützen TFIIH bei der Verifizierung des DNA Schadens und stabilisieren die Endonukleasen ERCC1/XPF und XPG, die die geschädigte DNA ausschneiden. TFIIH verlässt zusammen mit dem ausgeschnittenen Fragment die DNA. Die entstandene Lücke wird durch DNA Synthese und Ligation geschlossen. Dabei sind PCNA und RFC, die DNA Polymerasen δ , ϵ und κ sowie DNA Ligasen beteiligt. Zur besseren Übersicht sind nicht alle bekannten involvierten Proteine gezeigt. (Lans et al., 2012)

Zur Aufklärung des Ablaufs der NER in Eukaryoten haben auch genetische und biochemische Studien mit *S. cerevisiae* beigetragen (Prakash and Prakash, 2000). Zur besseren Übersicht sind in Tab. 1.1 die homologen Proteine in Hefe aufgelistet, die an der NER beteiligt sind.

Tab. 1.1: Wichtige NER Proteine in Hefe und Mensch. Die Komponenten des Ubiquitin-Ligase-Komplexes in Hefe sind grau markiert. Ob sie in Hefe eine homologe Rolle zu UV-DDB-CUL4 bei der NER spielen ist unklar. Modifiziert aus (Prakash and Prakash, 2000).

Protein in <i>S. cerevisiae</i>	Humanes Homolog	Aufgabe bei NER
Rad7	unbekannt	Rad7/Rad16-Komplex: DNA-abhängige ATPase, bindet UV-geschädigte DNA
Rad16	unbekannt	
Rad28	CSA	Initiiert TC-NER
Rad26	CSB	
Mms1	DDB1	Ubiquitin-Ligase-Komplex: initiiert GG-NER an CPDs
Mms22	DDB2	
Rtt101	CUL4B	
Rbx1	RBX1	
Rad4	XPC	Rad4/Rad23-Komplex: bindet UV-geschädigte DNA
Rad23	RAD23B	
Rad14	XPA	Interagiert mit sämtlichen NER-Proteinen
RPA Komplex	RPA	Bindet ssDNA komplementär zum DNA Schaden
Rad3	XPB	5'-3' DNA Helikase
Rad25	XPB	3'-5' DNA Helikase
Rad1	XPF	Rad1/Rad10 Endonuklease: schneidet 5' des DNA Schadens
Rad10	ERCC1	
Rad2	XPG	Endonuklease: schneidet 3' des DNA Schadens

Interessanterweise wurde durch CHIP-Seq mit humanen Zellen gezeigt, dass die Helikase-Untereinheiten von TFIIH, XPB und XPD, signifikant mit G4-Motiven überlappen (Gray et al., 2014). 40% der Bindestellen waren G4-Motive. TFIIH ist nicht nur in die NER involviert, sondern ist als Transkriptionsfaktor auch für die Initiation der Transkription notwendig (zusammengefasst in (Compe and Egly, 2016)). XPB und XPD gehören zu einer stark konservierten Helikase-Familie und sind in humanen sowie in den meisten eukaryotischen Zellen essentiell (Fan et al., 2008; White, 2009). Von XPD gibt es in humanen Zellen drei Paraloge, FANCI, CHL1 und RTEL1 (White, 2009). Alle drei entwinden G4-Strukturen (London et al., 2008; Vannier et al., 2013; Wu et al., 2008). Weitere Experimente haben gezeigt, dass XPD und XPB G4-Strukturen *in vitro* binden, aber nur XPD diese auch entwinden kann (Gray et al., 2014). Die Bindung von XPB an DNA-G4 war selektiv im Vergleich mit dsDNA und ssDNA. Darüber hinaus waren XPB und XPD neben Transkriptionsstartstellen vieler stark exprimierter

Gene angereichert. Weitere Analysen ergaben, dass die Überlappung dieser Bindestellen mit G4-Motiven gleichzeitig mit spezifischen Signalwegen und regulatorischen *Pathways* korrelierte, die mit verschiedenen Krankheiten und Krebs assoziiert werden. Somit könnte XPB durch Bindung an spezifische G4-Konformationen XPD rekrutieren, damit diese entwunden werden (Gray et al., 2014). Dieses Model wurde mit Blick auf die Transkription erstellt. Inwieweit es eine Rolle bei der NER spielen könnte, ist unklar.

1.6.3.2 NER und Chromatin

Damit DNA Schäden durch NER repariert werden können, sind Chromatin-modifizierende Enzyme notwendig. Sie machen die DNA für die NER-Proteine zugänglich. Dabei handelt es sich um Enzyme, die zum einen die Histone modifizieren und so die Affinität der Histone zur DNA schwächen, und zum anderen um ATP-abhängige Enzyme, die Chromosomen umgestalten damit Histone entlang der DNA bewegt werden können (zusammengefasst in (Scharer, 2013)).

Wie bereits beim Ablauf der NER erwähnt, wird für die Initiation der GG-NER durch den XPC/RAD23B Komplex je nach DNA Schaden auch UV-DDB benötigt. UV-DDB bildet zusammen mit CUL4A und RBX1 einen Ubiquitin-Ligase-Komplex (Groisman et al., 2003). Dieser Komplex ist direkt nach UV Bestrahlung am Chromatin lokalisiert und monoubiquitiniert die Histone H2A, H3 und H4, was zur Destabilisierung der Nukleosomen führt (Bergink et al., 2006; Guerrero-Santoro et al., 2008; Kapetanaki et al., 2006; Wang et al., 2006a). Die Ubiquitinierung von H2A hängt darüber hinaus von der E3 Ligase RING1B ab (Bergink et al., 2006), einer Untereinheit des PRC1 Komplex, der eine Rolle als Inhibitor der Transkription hat. Außerdem werden XPC und DDB2 polyubiquitiniert (Kapetanaki et al., 2006; Sugawara et al., 2005; Wang et al., 2006a). Grundsätzlich dient Ubiquitinierung der Markierung von interzellulären Proteinen, die durch das Proteasom abgebaut werden sollen. DDB2 und die modifizierten Histone werden infolgedessen abgebaut. XPC jedoch wird durch die Ubiquitinierung stabilisiert und hat *in vitro* eine größere Affinität zu DNA (Nishi et al., 2009; Sugawara et al., 2005).

Für die Reparatur von DNA Schäden durch NER sind neben UV-DDB noch weitere ATP-abhängige *Chromatin-Remodeling*-Komplexe notwendig, um das dicht gepackte Chromatin zugänglich zu machen, auf die hier nicht weiter eingegangen wird (zusammengefasst in (Lans et al., 2012)).

Das Homolog des humanen UV-DDB1-CUL4 Ubiquitin-Ligase-Komplex in Hefe ist Mms1/Rtt101 (Zaidi et al., 2008). Durch Interaktion von Mms1 mit Rtt101 wird die Bindung von Mms22 ermöglicht. Jedoch wird dieser Komplex in Hefe bisher nicht mit NER in Verbindung gebracht. Stattdessen wurde gezeigt, dass alle drei Komponenten bei Replikationsstress für das Fortschreiten der Replikationsgabel notwendig sind (Zaidi et al.,

2008). Mms1 und Mms22 werden außerdem für HR an stockenden Replikationsgabeln benötigt. Jedoch waren keine der drei Komponenten in die Reparatur von induzierten DSB durch HR oder NHEJ involviert (Zaidi et al., 2008). Außerdem wird auf Grund von genetischen Experimenten angenommen, dass Mms1 keine Rolle bei BER, NER oder *post replication repair* spielt.

1.6.3.4 ZRF1 bei der NER

Gracheva und Kollegen stellen in ihrer Publikation (Gracheva et al., 2016) eine neue Ubiquitin E3 Ligase vor, die spezifisch für die Reparatur von DNA Schäden durch GG-NER ist und an der Stelle des DNA Schadens umgeformt wird. An dieser Remodellierung ist ZRF1 essentiell beteiligt.

Aus einer früheren Studie war bekannt, dass ZRF1 mit seiner Ubiquitin-Bindedomäne mit monoubiquitiniertem Histon H2A interagiert (Richly et al., 2010). Wie biochemische Experimente gezeigt haben, katalysiert RING1B die Monoubiquitinierung von H2A nach UV Bestrahlung (Gracheva et al., 2016). Dies passt zu einer Beobachtung, wonach es in Abhängigkeit von RING1B zu vermehrter H2A-Ubiquitinierung an DNA Schäden kommt (Bergink et al., 2006). Anders als bei seiner Funktion bei der Reparatur von DSB katalysierte RING1B die Ubiquitinierung von H2A unabhängig von seinem Bindepartner im PRC1 Komplex (Gracheva et al., 2016). In *C. elegans* wurde ohne RING1B ein Wachstumsdefekt nach UV Bestrahlung festgestellt, wodurch RING1B mit NER in Verbindung gebracht werden konnte. Zusätzlich zu RING1B akkumulierte auch DDB2 signifikant an DNA Schäden in humanen Zellen. Durch Immunpräzipitation wurde gezeigt, dass RING1B mit DDB2 interagiert, jedoch nicht mit weiteren getesteten NER-Proteinen. Außerdem war die Mehrheit von RING1B mit dem Bindepartner im PRC1 Komplex assoziiert und nur ein geringerer Anteil mit DDB2. Mittels Massenspektrometrie wurde deutlich, dass RING1B mit DDB1/2 und CUL4B einen stabilen Komplex bildet. In diesem neu identifizierten UV-RING1B E3 Ligase Komplex bindet RING1B an CUL4B und DDB2, aber nicht an DDB1. Bei *in vitro* Ubiquitinierungsexperimenten monoubiquitinierte der aufgereinigte UV-RING1B Komplex H2A spezifisch (Gracheva et al., 2016).

Monoubiquitiniertes H2A war während der Zelldifferenzierung an ZRF1 gebunden (Richly et al., 2010). In weiteren Experimenten wurde beobachtet, dass ZRF1 nach UV Bestrahlung in Abhängigkeit von RING1B zum Chromatin rekrutiert wird und darüber hinaus die Ubiquitin-Bindedomäne von ZRF1 für die Bindung an die DNA notwendig ist (Gracheva et al., 2016). ZRF1 lokalisierte *in vitro* an Stellen geschädigter DNA, die durch XPC und XPA markiert waren. *In vivo* konnte ZRF1 in humanen Zellen nach UV Bestrahlung an CPDs detektiert werden. Außerdem

interagierte ZRF1 *in vitro* mit XPC, aber nicht mit anderen getesteten NER-Proteinen. Dies stützt eine Rolle bei der Erkennung von DNA Schäden, die durch NER repariert werden. Experimente mit *C. elegans* zeigten, dass Mutanten ohne RING1B oder XPC gleichermaßen durch UV Strahlung beeinträchtigt waren, wohingegen die Mutante ohne ZRF1 einen stärkeren Phänotyp hatte als die Mutante ohne XPC. Eine Mutante mit einem Defekt in TC-NER zeigte dieselbe UV Sensitivität wie der Wildtyp. Demnach sind RING1B und ZRF1 potentiell bei der GG-NER, nicht aber bei der TC-NER beteiligt. Bei der Untersuchung von Chromatin aus humanen Zellen ohne ZRF1 wurde nach UV Bestrahlung vermehrt RING1B und höhere Level H2A-Ubiquitin beobachtet (Gracheva et al., 2016). Dies stimmt mit Ergebnissen überein, wonach ZRF1 eine Rolle bei der Entfernung von RING1B vom Chromatin hat (Richly et al., 2010). DDB2 Level waren dagegen konstant, CUL4A war reduziert (Gracheva et al., 2016). Damit wurde eine potentielle Funktion von ZRF1 in der Remodellierung des UV-RING1B Komplexes an DNA Schäden deutlich. Durch Immunpräzipitation konnte außerdem gezeigt werden, dass ZRF1 die Assoziation von CUL4A-RBX1 mit DDB1/2 vermittelt. Mit *in vitro* assembliertem UV-RING1B Komplex wurde untersucht wie CUL4B-RING1B durch CUL4A-RBX1 ersetzt wird. Die Zugabe von aufgereinigtem CUL4A-RBX1 zu immobilisierten UV-RING1B Komplexen zeigte keinen oder nur minimalen Einbau von CUL4A und RBX1 in den E3 Ligase Komplex. Im Gegensatz dazu wurde bei Anwesenheit von ZRF1 ein signifikanter Austausch von CUL4B-RING1B durch CUL4A-RBX1 beobachtet. Somit wurde bestätigt, dass ZRF1 den UV-RING1B E3 Ligase Komplex an geschädigter DNA umformt und die Bildung des UV-DDB-CUL4A E3 Ligase Komplexes vermittelt. Darüber hinaus zeigte sich in weiteren Experimenten, dass ZRF1 durch diese Umformung des UV-RING1B Komplexes die Ubiquitinierung von XPC reguliert. Anhand dieser Ergebnisse konnte ein Modell aufgestellt werden (Abb. 1.11), bei dem ZRF1 als *Switch* Protein fungiert und neben oder direkt an der DNA Schadstelle E3 Ligase Komplexe umformt und so an der GG-NER beteiligt ist (Gracheva et al., 2016).

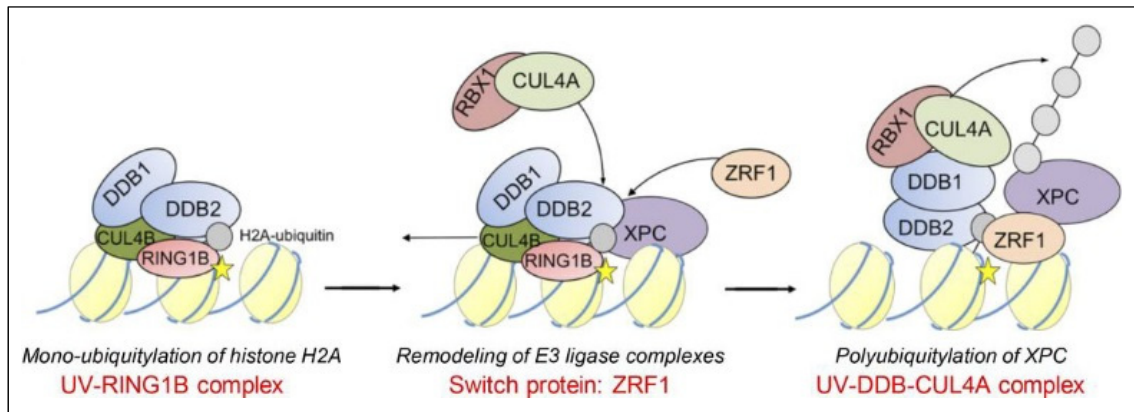


Abb. 1.11: Modell zur Rolle von ZRF1 als Switch Protein bei der GG-NER. DNA Schäden (gelber Stern) werden durch den UV-RING1B Komplex (DDB1/DDB2/CUL4B/RING1B) erkannt, der infolgedessen das Histon H2A monoubiquitiniert (grauer Kreis). ZRF1 wird durch XPC rekrutiert und bindet an das ubiquitinierte H2A. ZRF1 verursacht die Assemblierung des UV-DDB-CUL4A Komplexes, der die Ubiquitinierung von XPC katalysiert. (Gracheva et al., 2016)

1.7 Slx9 – ein Hefe-spezifisches Protein

Slx9 ist ein nicht-essentielles, hefe-spezifisches Protein. In anderen Eukaryoten und Prokaryoten konnten bisher keine homologen Proteine gefunden werden. In *S. cerevisiae* ist Slx9 in die Ribosomenbiogenese involviert (Bax et al., 2006). Die Ribosomenbiogenese ist ein sehr komplexer Vorgang und erfordert die Prozessierung der rRNA und die Assoziation der ribosomalen Proteine (zusammengefasst in (Woolford and Baserga, 2013)). Im Nukleolus transkribieren die RNA Polymerasen I und III das rDNA Operon (Abb. 1.12), so dass zwei rRNA-Vorläufertranskripte entstehen. Die RNA Polymerase I ist für die Transkription der Gene für die 35S prä-rRNA zuständig, bei der es sich um den Vorläufer der 5.8S, 18S und 25S rRNA handelt. Unabhängig davon und in entgegengesetzter Richtung wird durch die RNA Polymerase III die 5S prä-rRNA gebildet. Die 35S prä-rRNA ist am 5'- und am 3'-Ende durch zwei externe transkribierte Spacer (5' ETS und 3' ETS) flankiert, die Sequenzen der drei verschiedenen rRNAs sind durch zwei interne transkribierte Spacer (ITS1 und ITS2) voneinander getrennt. Außerdem befinden sich auf dem rDNA Operon noch zwei nicht-transkribierte Spacer (NTS1 und NTS2), zwischen denen sich das Gen für die 5S rRNA befindet. Für die Prozessierung der rRNA-Vorläufertranskripte sind zahlreiche Spaltungen durch Endo- und Exonukleasen an spezifischen Spaltstellen notwendig. Darüber hinaus finden im Zellkern posttranskriptionelle Modifikationen zahlreicher spezifischer Nukleotide der rRNAs statt (zusammengefasst in (Fromont-Racine et al., 2003; Woolford and Baserga, 2013)).

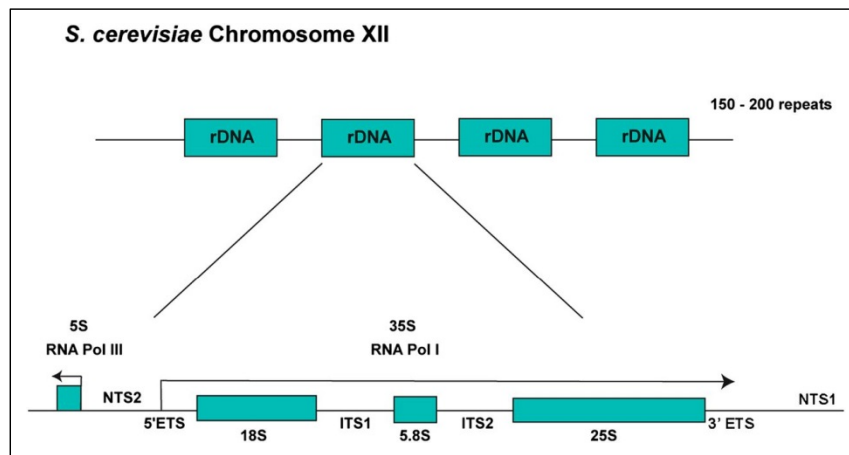


Abb. 1.12: Aufbau des rDNA Operons in *S. cerevisiae*. Auf Chromosom XII befinden sich 150-200 Wiederholungen des rRNA Operons. In jeder Kopie werden die ribosomalen rRNAs codiert. Die rRNA Sequenzen der 18S, 5.8S und 25S rRNA sind durch interne transkribierte Spacer (ITS) getrennt und von externen transkribierten Spacern (ETS) flankiert. Das 5S rRNA-Gen ist von nicht-transkribierten Spacern (NTS) eingerahmt. (Woolford and Baserga, 2013)

Bereits während der Transkription kommt es zur Assoziation der prä-rRNAs mit ribosomalen Proteinen und nicht-ribosomalen, *trans*-agierenden Faktoren, so dass das 90S prä-Ribosom gebildet wird. Durch weitere Prozessierung des 90S prä-Ribosoms einschließlich der Entfernung der Spacer entstehen Vorläufer der ribosomalen Untereinheiten, die getrennt voneinander ins Cytoplasma exportiert werden und dort zur 40S und 60S Untereinheit reifen (zusammengefasst in (Fromont-Racine et al., 2003; Woolford and Baserga, 2013)).

Eine potentielle Rolle von Slx9 bei der Ribosomenbiogenese wurde vermutet, da Slx9-GFP im Nukleolus lokalisiert ist (Ghaemmaghami et al., 2003) und Slx9 als Bindepartner von den *trans*-agierenden Proteinen Enp1 und Tsr1 identifiziert wurde (Gavin et al., 2002). Diese zwei Proteine sind an der Prozessierung von prä-rRNA beteiligt und mit Proteinen des 90S und 43S prä-Ribosoms assoziiert (Chen et al., 2003; Gelperin et al., 2001). Durch Co-Immunpräzipitation wurde deutlich, dass Slx9 mit verschiedenen prä-rRNAs (20S, 23S, 35S) sowie der U3 snoRNA interagiert und somit eine Komponente des 90S prä-Ribosoms ist (Bax et al., 2006). Die Deletion von *SLX9* in *S. cerevisiae* führte zu einem leichten Wachstumsdefekt, einer Reduktion der 18S rRNA Level und einer Akkumulation von 21S und 27SA2 prä-rRNA. Außerdem war $\Delta slx9$ synthetisch letal mit mutiertem *RRP5*, das die Spaltung in ITS1 verhindert. Dies zeigt, dass Slx9 eine Rolle bei der Prozessierung einnimmt, die für das Trennen der 66S und 43S prä-Ribosomen (Vorläufer der 60S und 40S Untereinheiten) verantwortlich ist (Bax et al., 2006). Da homologe Proteine zu Slx9 nur in anderen Hefe-Spezies gefunden wurden, handelt es sich bei Slx9 um ein Protein das im Gegensatz zu anderen *trans*-agierenden Proteinen in der Evolution erheblich weniger konserviert ist (Bax et al., 2006).

Laut einer neueren Studie spielt Slx9 eine wichtige Rolle beim Export des Vorläufers der 40S Untereinheit vom Zellkern ins Cytoplasma (Fischer et al., 2015). Das Adaptor-Protein Rio2

enthält ein NES und ist an das 40S prä-Ribosom gebunden. Durch das NES interagiert das 40S prä-Ribosom mit dem Transport-Rezeptor Crm1. Crm1 bindet mit geringer Affinität an das NES von Makromolekülen, die aus dem Zellkern exportiert werden sollen. Außerdem bindet Crm1 an RanGTP. Ran ist eine GTPase, die die Bewegung von Importinen und Exportinen zwischen Nukleus und Cytoplasma koordiniert. Lange war unklar, wie Crm1 trotz geringer Affinität die Makromoleküle effizient exportieren kann, wenn gleich die schwache Interaktion im Cytoplasma von Vorteil ist um die Bindung zu lösen. Nun wurde gezeigt, dass Slx9 schnell zwischen dem Nukleus und Cytoplasma pendelt und ebenfalls an RanGTP bindet. Wurde ein Komplex aus Slx9, RanGTP und dem 40S prä-Ribosom assembliert, führte dies zur Rekrutierung von Crm1. Somit dient Slx9 dazu, das Makromolekül, in diesem Fall den Vorläufer der 40S Untereinheit, mit Crm1 und RanGTP in Kontakt zu bringen und somit einen stabilen Komplex zu formen, der den Export ins Cytoplasma ermöglicht. In $\Delta slx9$ wurde das 40S prä-Ribosom nicht aus dem Nukleus exportiert (Fischer et al., 2015).

Neben der Funktion bei der Ribosomenbiogenese ist eine genetische Interaktion von Slx9 mit der G4-entwindenden Helikase Sgs1 bekannt. Bei einem Screen mit $\Delta sgs1$ stellte sich heraus, dass der Stamm mit $\Delta slx9$ synthetisch letal ist (Ooi et al., 2003). Zudem wurde in einem Screening $\Delta slx9$ als Stamm identifiziert, der im Vergleich zum Wildtyp resistenter gegenüber dem G4-stabilisierenden Liganden NMM ist (Hershman et al., 2008).

1.8 Der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*

Bei dieser Arbeit wurde die Bäckerhefe *S. cerevisiae* als Modellorganismus verwendet. Dieser einzellige Eukaryot ist mit 5 – 10 μm deutlich größer als Bakterien und ein bedeutender Modellorganismus in der Genetik. Die Zellen wachsen und vermehren sich schnell, die Verdopplungszeit beträgt für den Wildtyp nur 90 min. Die Handhabung von *S. cerevisiae* im Labor ist einfach und ungefährlich. Viele metabolische und regulatorische Mechanismen sind von Hefe bis zum Menschen konserviert, weshalb der Organismus so interessant für die Forschung ist (zusammengefasst in (Sherman, 2002)).

Hefen durchlaufen einen Entwicklungszyklus mit einer haploiden und einer diploiden Phase, wodurch genetische Studien und die Untersuchung der Meioseprodukte gut möglich sind (Tetradenanalyse). Haploide Zellen haben entweder Paarungstyp MATa oder MAT α . Durch das Vermischen von Zellmaterial eines MATa- und eines MAT α -Stamm können haploide Stämme gepaart werden. Die entstehenden diploiden Zellen sind MATa/ α . *S. cerevisiae* ist fakultativ

aerob und kann somit durch Atmung und Gärung wachsen (zusammengefasst in (Lodish et al., 2013)).

Das Genom war 1996 als erstes Genom eines Eukaryoten vollständig sequenziert (Goffeau et al., 1996). Es besteht aus circa 12 Mb, aufgeteilt auf 16 Chromosomen mit 6604 ORFs und ist somit recht kompakt (<http://www.yeastgenome.org/genomesnapshot>). Hefe ist genetisch leicht zugänglich. Mittels homologer Rekombination wird transformierte DNA präzise und spezifisch ins Genom integriert und somit können Gene einfach deletiert oder modifiziert werden (Rothstein, 1983; Scherer and Davis, 1979). Dies ermöglicht auch die Aufreinigung von Proteinen aus Hefe.

Neben vielen Vorteilen ist der einfache, einzellige Aufbau von *S. cerevisiae* jedoch für manche Bereiche der Forschung wie Entwicklungsbiologie ein Nachteil und kann deshalb nicht als Modellorganismus benutzt werden (zusammengefasst in (Lodish et al., 2013)).

2. Ziel dieser Arbeit

Computeranalysen haben gezeigt, dass im Hefegenom mehr als 500 G4-Motive (abzüglich der G4 an Telomeren und in rDNA) zu finden sind, die sich potentiell in G4-Strukturen falten können. Im humanen Genom wurden mit G4-Seq mehr als 700.000 G4-Motive detektiert. Aufgrund der Lage der G4-Motive im Genom und der starken Konservierung in verschiedenen Eukaryoten ist davon auszugehen, dass G4 *in vivo* regulatorische Funktionen bei biologischen Prozessen einnehmen und die Genomstabilität beeinflussen. Zwar sind bereits einige Proteine bekannt, die an G4-Strukturen *in vitro* und *in vivo* binden, doch sind dies bisher zu wenige um der großen Anzahl der polymorphen G4-Strukturen gerecht zu werden. Aufgrund der hohen thermodynamischen Stabilität von G4-Strukturen werden Proteine allerdings zur Faltung, Stabilisierung und Entwindung benötigt. Darüber hinaus wurden bisher mehr Helikasen entdeckt, die G4-Strukturen entwinden, als G4-induzierende oder -stabilisierende Proteine. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Identifikation neuer G4-bindender Proteine in *S. cerevisiae*. Durch *in vitro* Bindungsstudien sollte die Interaktion neu identifizierter Proteine mit G4-Strukturen bestätigt und näher charakterisiert werden.

Um herauszufinden, bei welchem biologischen Prozess *in vivo* diese Protein-G4-Interaktionen eine Rolle spielen, wurden in *S. cerevisiae* weitere Experimente durchgeführt, darunter auch genomweite Studien.

Anhand dieser Daten konnte ein Modell erstellt werden, das eine neue positive Funktion von stabilen G4-Strukturen bei der Unterbrechung der Replikation während der DNA Reparatur vorschlägt.

3. Ergebnisse

3.1 Identifikation von Zuo1 als neues G4-bindendes Protein

In den vergangenen Jahren wurde in verschiedenen genetischen und globalen Studien gezeigt, dass sich G4-Strukturen *in vivo* falten (Biffi et al., 2013; Henderson et al., 2014; Liu et al., 2016; Paeschke et al., 2013; Paeschke et al., 2011; Ribeyre et al., 2009; Schaffitzel et al., 2001). Die evolutionär konservierte Nukleotidsequenz des G4-Motivs sowie dessen genomweite Verteilung in verschiedenen Eukaryoten legt nahe, dass G4-Motive und deren Faltung in G4-Strukturen an bestimmten Positionen eine Funktion bei biologischen Prozessen in der Zelle haben (Capra et al., 2010; Nakken et al., 2009). Bedingt durch die hohe thermodynamische Stabilität von G4-Strukturen ist eine schnelle, spontane Faltung, um regulatorisch auf biologische Abläufe einzuwirken, strittig. Vielmehr wurden bereits spezifische Proteine identifiziert, die *in vivo* an der Faltung oder Entwindung von G4-Strukturen beteiligt sind (zusammengefasst in (Brazda et al., 2014; Fry, 2007; Mishra et al., 2016)). Wegen der hohen Variabilität des G4-Motivs und somit der G4-Struktur, ist eine starke Spezifität dieser Proteine unabdingbar. Ebenso muss die Spezifität der Proteine für G4-Strukturen gegenüber anderen DNA-Konformationen gegeben sein. Somit ist eine weit höhere Anzahl an Proteinen notwendig, die eine Rolle an spezifischen G4-Strukturen in der Zelle einnehmen, als die bisher identifizierten G4-induzierenden, G4-stabilisierenden oder G4-entwindenden Proteine.

Daher war das erste Ziel dieser Arbeit, mittels Y1H-Screenings neue Proteine zu identifizieren, die spezifisch mit G4-Strukturen interagieren. Als *bait*-Sequenz wurde ein konserviertes G4-Motiv von Chromosom IX (G4_{ix}) mit kurzen (~30 bp) flankierenden Bereichen *upstream* des Reportergens *AUR-1C* (Aureobasidin A Resistenzgen) in das Genom des *S. cerevisiae*-Stammes Y1HGold integriert (Sequenz siehe Anhang Tab. 7.1; Schema siehe Anhang Abb. 7.1). Dieser Screening-Stamm wird fortan als *bait*-G4 bezeichnet. Um G4-bindende Proteine zu detektieren, wurde eine *S. cerevisiae* cDNA Bibliothek in *bait*-G4 transformiert. In dieser cDNA Bibliothek werden alle Hefeproteine in Fusion mit einer GAL4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne (GAL4 AD) exprimiert, die im Falle einer DNA-Protein-Interaktion die Expression des Reportergens aktiviert. Kam es zu einer G4-Protein-Interaktion, konnten Kolonien auf Selektionsmedium mit Aureobasidin A (AbA) wachsen. Diese Kolonien wurden zweimal frisch auf Selektionsplatten ausgestrichen, um die Expression des Reportergens zu bestätigen. Von diesen Kolonien wurden die Bibliotheks-Plasmide isoliert und sequenziert, um das mit dem G4 interagierende Protein zu identifizieren.

Es wurden drei unabhängige Screenings durchgeführt. Bei Screening I wurde eine selbsthergestellte *S. cerevisiae* cDNA Bibliothek transformiert. Obwohl die Herstellung dieser Bibliothek nach dem Protokoll des Herstellers nicht optimal funktioniert hat, konnten in diesem Screening 43 Kolonien gezählt werden (siehe Anhang Tab. 7.2). Die weitere Auswertung lieferte 28 Sequenzen, die mit Hilfe von BLAST 23x Zuo1 als neues G4-bindendes Protein zugeordnet werden konnten.

Bei den Screenings II und III wurde eine erworbene *S. cerevisiae* cDNA Bibliothek verwendet. Da replikativer Stress die Faltung von G4-Strukturen fördert, wurden zusätzlich 5 bzw. 10 mM HU eingesetzt (Papadopoulou et al., 2015). In den Screenings II und III konnten insgesamt 156 verschiedene Proteine identifiziert werden, die an G_{4ix} gebunden haben (siehe Anhang Tab. 7.3). Um interessante Kandidaten herauszufiltern, wurden durch *Gene Ontology* (GO) *Term*-Analysen Nukleinsäure-bindende Proteine erkannt sowie durch Literaturrecherche interessante Proteine ausgewählt (siehe Anhang Tab. 7.4).

In dieser Arbeit wurde Zuo1 als neues G4-bindendes Protein untersucht, da es sich in ersten Experimenten als vielversprechendster Kandidat herausgestellt hatte und aufgrund der publizierten wissenschaftlichen Arbeiten eine noch-unbekannte Rolle an G4-Strukturen äußerst interessant erschien.

Um auszuschließen, dass es sich bei Zuo1 um einen falsch-positiven Kandidaten aus den Y1H-Screenings handelte, wurden Retransformationen durchgeführt. Drei *ZUO1*-codierende Plasmide, die in Screening I mit G_{4ix} interagiert haben, wurden in drei verschiedene Stämme retransformiert: in den Screening-Stamm *bait*-G4 mit G_{4ix} als *bait*-Sequenz, in einen Stamm mit G_{4ix} auf dem komplementären Strang (*bait*-C4) und in einen Stamm mit mutierten G_{4ix}-Motiv G_{4mut}, das sich nicht mehr in eine G4-Struktur falten kann (*bait*-mutG4) (Sequenzen siehe Anhang Tab. 7.1).

CD bestätigte die Faltung des G_{4ix}-Oligonukleotids in eine parallele G4-Struktur und das Vorliegen von einzelsträngiger DNA (ssDNA), wenn das G4-Motiv mutiert war (G_{4mut}) (Abb. 3.1). Charakteristisch für parallele G4-Strukturen sind ein Minimum und ein Maximum bei 243 nm und 264 nm im CD Spektrum, bei ssDNA und B-DNA sind diese in Richtung 300 nm verschoben (Karsisiotis et al., 2011).

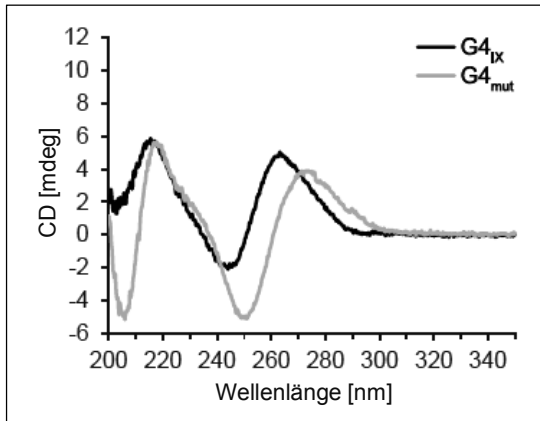


Abb. 3.1: CD Spektren von G4_{IX} und G4_{mut}. Nach Faltung in 10 mM Tris + 100 mM NaCl zeigte G4_{IX} ein Minimum bei 243 nm und ein Maximum bei 264 nm, charakteristisch für parallele G4-Strukturen. Das Spektrum für G4_{mut} war in Richtung 300 nm verschoben, somit keine G4-Struktur.

Nach den Retransformationen der *ZUO1*-codierenden Plasmide in diese drei Stämme wurde auf Medium mit AbA selektioniert (Konzentrationen siehe Anhang Tab. 7.1). Eine positive Interaktion von Zuo1 mit der *bait*-Sequenz resultierte in Wachstum von Kolonien. Es wuchsen Transformanten der Stämme *bait*-G4 und *bait*-C4, jedoch keine Kolonien von *bait*-mutG4 (Abb. 3.2). Somit handelt es sich bei Zuo1 als neues, potentiell G4-bindendes Protein, das durch Y1H identifiziert wurde.

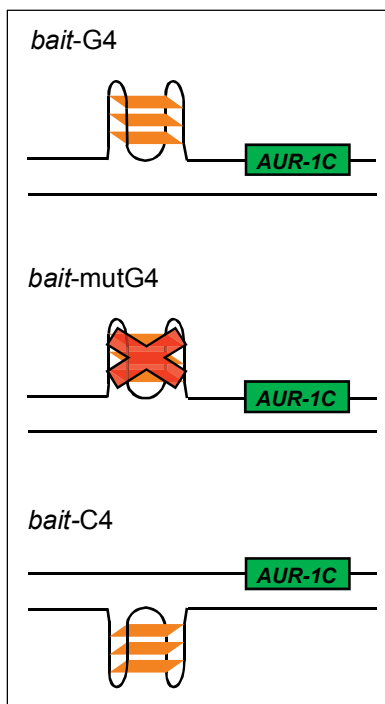


Abb. 3.2: Retransformationen *ZUO1*-codierender Plasmide aus der cDNA Bibliothek. Zur Kontrolle wurden drei *ZUO1*-codierende Plasmide in *bait*-G4, *bait*-C4 und *bait*-mutG4 retransformiert. Wachstum auf Medium mit AbA bestätigte eine Interaktion von Zuo1 in den Stämmen *bait*-G4 und *bait*-C4. Von *bait*-mutG4 wuchsen keine Transformanten. Obwohl sich bei *bait*-C4 die G4-Struktur auf dem komplementären Strang faltet, könnte die Bindung von Zuo1 an das G4 zur Expression des Reportergens geführt haben.

3.2 *in vitro* Bindungsstudien mit Zuo1

Da DNA-Protein-Interaktionen im Y1H auch indirekt sein und zur Expression des Reportergens führen können, sollte die Bindung an G4-Strukturen durch *in vitro* Bindungsstudien mit

aufgereinigtem Zuo1 validiert werden. Zuo1 mit einem 6xHis-Tag am N-Terminus (50 kDa) wurde aus *E. coli* aufgereinigt und durch Western Blot mit anti-His Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.3).

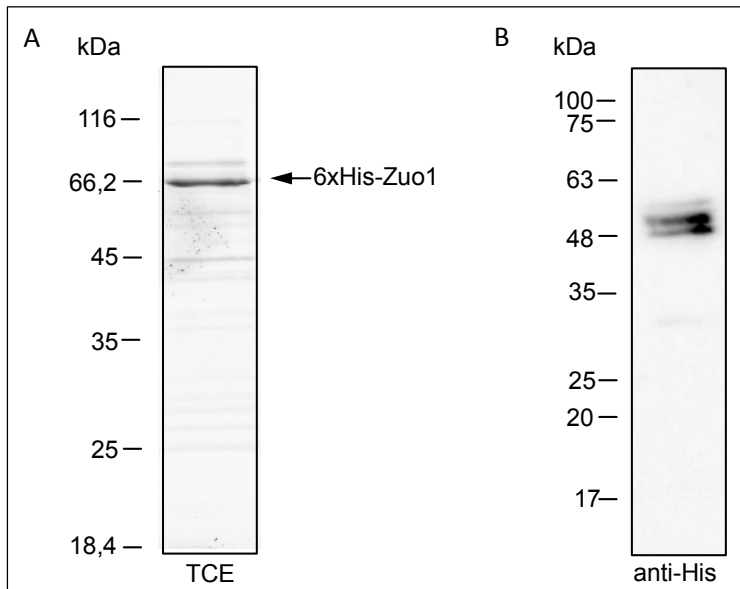


Abb. 3.3: Aufgereinigtes 6xHis-Zuo1. A) SDS-PAGE mit TCE-Färbung: Das 50 kDa große Protein läuft auf Höhe der 66,2 kDa-Bande des Protein-Markers. Es wurden 2 μ g 6xHis-Zuo1 aufgetragen. B) Western Blot mit anti-His Antikörper: 6xHis-Zuo1 wird mit mehreren Banden auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts von 50 kDa detektiert.

Mit dem aufgereinigten Protein wurde zusätzlich eine Gelfiltration durchgeführt, um zu untersuchen, ob Zuo1 als Oligomer vorliegen könnte. Zuo1 wurde bei 13,66 ml von der Superdex 200-Säule eluiert (Anhang Abb. 7.2). Die Standardproteine BSA (66 kDa) und Aldolase (158 kDa) wurden bei 15,34 ml und 13,71 ml eluiert. Somit könnte Zuo1 als Trimer vorliegen, was einem Molekulargewicht von 150 kDa entspräche.

3.2.1 Zuo1 bindet spezifisch an G4-Strukturen

Das aufgereinigte Zuo1 wurde in *in vitro* Bindungsstudien eingesetzt. Mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) sollte die direkte Interaktion von Zuo1 mit G4-Strukturen untersucht werden. Hierfür wurde das G4-Motiv von Chromosom IX ($G4_{IX}$) verwendet und das Oligonukleotid in Puffer mit 100 mM NaCl in eine G4-Struktur gefaltet (CD-Spektrum siehe Abb. 3.1). Das radioaktiv markierte $G4_{IX}$ wurde mit steigenden Konzentrationen von Zuo1 inkubiert und über eine native Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Wie durch Autoradiographie ersichtlich, interagiert Zuo1 mit der G4-Struktur (Abb. 3.4). Zur Kontrolle der Bindungsspezifität wurde das gefaltete $G4_{IX}$ für 10 min bei 95°C inkubiert und somit die G4-Struktur zerstört (Abb. 3.4, Spur K). Im Gegensatz zum gefalteten G_{IX} konnte mit dem linearisierten Oligonukleotid keine signifikante Interaktion mit Zuo1 beobachtet werden.

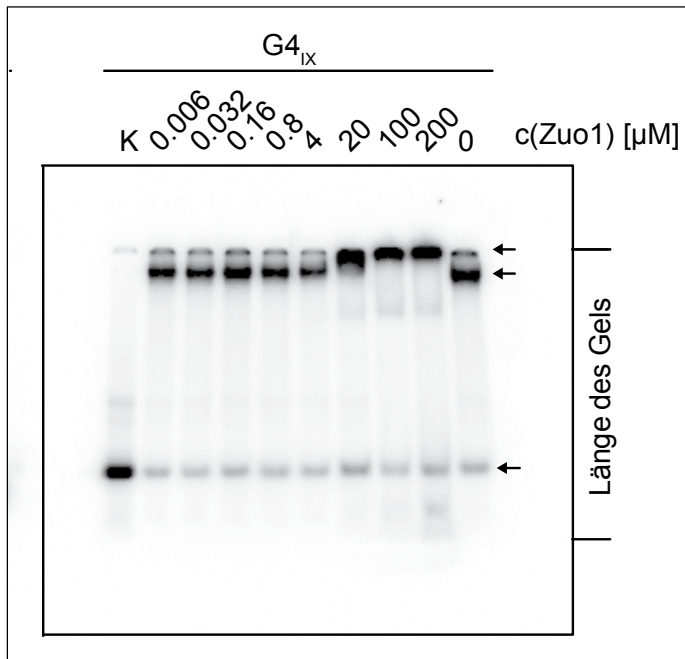


Abb. 3.4: Zuo1 bindet an G4_{IX}. Verschiedene Konzentrationen Zuo1 wurden mit 10 nM G4_{IX} inkubiert und auf einem nativen 7% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. 20-200 µM Zuo1 haben an die G4-Struktur gebunden und blieben in der Tasche des Gels stecken. Als Kontrolle wurde G4_{IX} nach der Faltung gekocht, um die G4-Struktur zu zerstören (K).

Da der G4_{IX}-Zuo1-Komplex mit zunehmender Zuo1-Konzentration statt im Polyacrylamid-Gel in den Gel-Taschen detektiert wurde, sollte die Bindung von Zuo1 an G4 in Doppel-Filterbindungsassays genauer untersucht werden. Bei dieser Methode wurden Bindungsansätze aus radioaktiv markierter DNA und steigenden Zuo1-Konzentrationen durch zwei übereinanderliegende Membranen filtriert. Aufgrund der Affinität wurden Proteine durch die obere Nitrocellulose-Membran zurückgehalten, während DNA an die untere Nylon-Membran (Hybond; GE Healthcare) binden konnte. Durch Autoradiographie wurde ersichtlich, ob die radioaktiv markierte DNA mit Zuo1 interagiert hatte und somit auf der Nitrocellulose-Membran detektierbar war oder ein Signal auf der Nylon-Membran durch nicht an Zuo1-gebundene DNA sichtbar wurde. Aufgrund dieses Verhältnisses konnte schließlich die Dissoziationskonstante K_d ermittelt werden.

Es wurde die Bindung von Zuo1 an neun verschiedene DNA-Substrate analysiert. Zusätzlich zu vier G4-Strukturen aus unterschiedlichem biologischen Kontext (G4_{IX}, G4_{rDNA}, G4_{TP1}, G4_{TP2}), wurde die Bindung an dsDNA und ssDNA sowie an *fork*-, *4-fork*- und *bubble*-DNA getestet. Als ssDNA wurde das mutierte G4 von Chromosom IX (G4_{mut}) verwendet. Die korrekte Faltung der G4-Strukturen und die ssDNA-Konformation von G4_{mut} wurden durch CD und native Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestätigt (Abb. 3.1, Abb. 3.5A, Anhang Abb. 7.3A). Wie durch Autoradiographie ersichtlich interagiert Zuo1 mit allen getesteten DNA G4-Strukturen (Anhang Abb. 7.3B). Die Quantifizierung dieser Interaktionen ergab Dissoziationskonstanten von $0,72 \pm 0,3 \mu\text{M}$ für G4_{IX}, $0,83 \pm 0,2 \mu\text{M}$ für G4_{rDNA} sowie $0,67 \pm 0,1 \mu\text{M}$ und $1,26 \pm 0,3 \mu\text{M}$ für G4_{TP1} bzw. G4_{TP2} (Abb. 3.5B+C). Im Gegensatz dazu hat Zuo1 an keine der getesteten

alternativen DNA-Strukturen $G4_{mut}$, dsDNA, *bubble*-, *fork*- und *4-fork*-DNA gebunden (Abb. 3.5D, Anhang Abb. 7.3B).

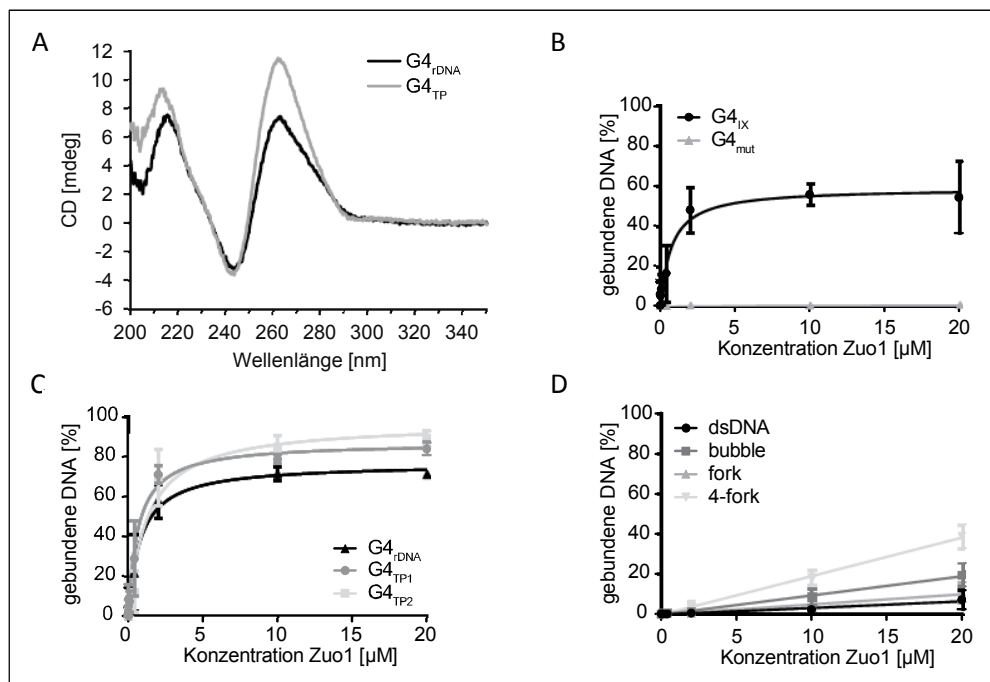


Abb. 3.5: Zuo1 bindet spezifisch an verschiedene G4-Strukturen *in vitro*. A) CD Spektren von $G4_{rDNA}$ und $G4_{TP}$ bestätigten Faltung der Oligonukleotide in 10 mM Tris + 100 mM NaCl in parallele G4-Strukturen mit charakteristischen Minimum bei 243 nm und Maximum bei 264 nm. B+C) In Doppel-Filterbindungsassays hat Zuo1 spezifisch an verschiedene G4-Strukturen gebunden. K_d -Werte wurden berechnet: $G4_{IX}$ (K_d $0,72 \pm 0,3 \mu\text{M}$), $G4_{rDNA}$ (K_d $0,83 \pm 0,2 \mu\text{M}$), $G4_{TP1}$ (K_d $0,67 \pm 0,1 \mu\text{M}$) und $G4_{TP2}$ (K_d $1,26 \pm 0,3 \mu\text{M}$). D) Zuo1 hat an keine andere getestete DNA-Struktur gebunden (dsDNA, *bubble*, *fork*, *4-fork*).

3.2.2 Zuo1 fördert die parallele Konformation und stabilisiert G4-Strukturen

Proteine können an G4-Strukturen binden, um diese zu stabilisieren oder zu entwinden. Um zu untersuchen, ob und wie die Bindung von Zuo1 G4-Strukturen verändert, sollte zunächst das Schmelzverhalten von $G4_{IX}$ bei einer Erhitzung der DNA von 5°C auf 95°C anhand der Absorption bei 295 nm untersucht und der Schmelzpunkt bestimmt werden. Durch die Änderung dieser Schmelzkurve nach Zugabe von Zuo1 ließe sich ableiten, ob Zuo1 G4 stabilisiert oder destabilisiert, d.h. den Schmelzpunkt der DNA erhöht oder erniedrigt. Da sich allerdings herausstellte, dass Zuo1 bei 30°C denaturierte, war diese Methode nicht nutzbar (Anhang Abb. 7.4).

Stattdessen wurde zur Charakterisierung der Bindung von Zuo1 an G4 eine CD Titration durchgeführt. Messungen am CD Spektrometer ermöglichen strukturelle Veränderungen von DNA zu verfolgen sowie parallele und antiparallele G4-Konformationen zu unterscheiden (Karsisiotis et al., 2011). Generell ist für parallele G4-Strukturen ein Maximum bei 264 nm und ein Minimum bei 243 nm charakteristisch, für die antiparallele G4-Konformation liegt das

Minimum bei 240 nm und zwei Maxima bei 264 nm und 290 nm. Bei ssDNA und B-DNA ist das Spektrum verschoben, so dass sich das Minimum bei 245 nm und das Maximum zwischen 260 und 280 nm befinden (Karsisiotis et al., 2011). Durch die Zugabe von Protein in steigenden Konzentrationen kann beobachtet werden, ob und bei welcher Konzentration sich das CD Spektrum ändert.

Für dieses Experiment wurde $G4_{ix}$ in Puffer mit 100 mM KCl gefaltet. Das CD Spektrum zeigte, dass die DNA im Gleichgewicht zwischen paralleler und antiparalleler $G4$ -Konformation vorlag (Anhang Abb. 7.5A). Zuo1 wurde in 5-fachem molaren Überschuss sowie 5-fachem molaren Defizit im Vergleich zur DNA zugegeben. Als Kontrolle wurde das Spektrum von Zuo1 in Puffer ohne DNA aufgenommen sowie Zuo1 zu dem mutierten $G4$ ($G4_{mut}$) titriert. Die Messungen am CD Spektrometer zeigten einen Anstieg des Maximums bei 264 nm bis 15 mdeg, wenn Zuo1 in 2,5- und 5-fachen Überschuss mit $G4_{ix}$ inkubiert wurde (Abb. 3.6A). Darüber hinaus verschob sich das Gleichgewicht zugunsten der parallelen $G4$ -Konformation. Geringere Zuo1-Konzentrationen zeigten keinen Effekt. Mit der Kontrolle $G4_{mut}$, deren Minimum und Maximum in Richtung 300 nm verschoben und damit charakteristisch für ssDNA waren (Anhang Abb. 7.5A), konnte in Anwesenheit von Zuo1 keine Veränderung des CD Spektrums beobachtet werden (Abb. 3.6B).

Nur die höchste Konzentration von Zuo1 in Puffer ohne DNA führte zu einem leichten Anstieg des Maximums auf 7 mdeg (Anhang Abb. 7.5B). Aufgrund der Überlappung des Spektrums von Zuo1 in Puffer ohne DNA mit dem charakteristischen Minimum von $G4$ -Strukturen wurde nur das Maximum zur Auswertung herangezogen und Veränderungen des Minimums nicht berücksichtigt. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Zuo1 *in vitro* nicht nur spezifisch an $G4$ -Strukturen bindet, sondern diese stabilisiert und ihre parallele Konformation fördert.

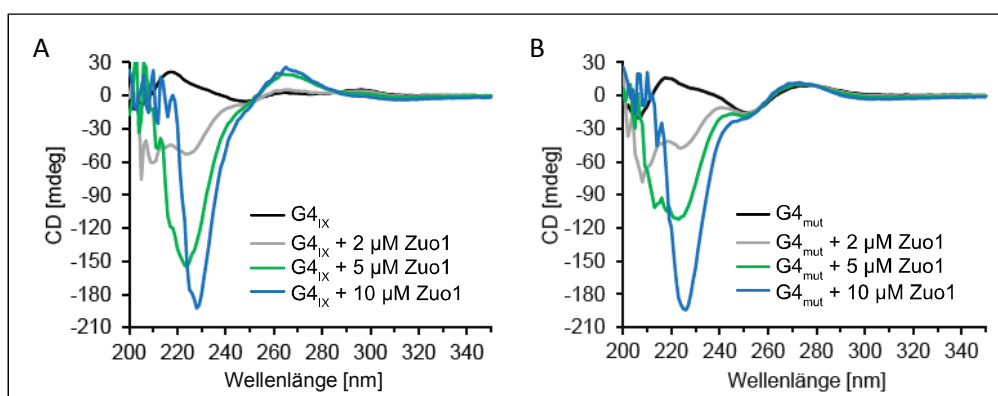


Abb. 3.6: Zuo1 stabilisiert $G4_{ix}$ *in vitro*. A) CD Spektren von $G4_{ix}$ mit steigenden Konzentrationen Zuo1. 5 μ M und 10 μ M Zuo1 führten zu einem Anstieg des Maximums bei 264 nm typisch für parallele $G4$ -Strukturen. Das zweite Maximum bei 300 nm war nicht mehr sichtbar. B) Die Zugabe von Zuo1 zu $G4_{mut}$ zeigte keine Veränderungen des Maximums im CD Spektrum, die auf eine Änderung der DNA-Konformation schließen ließen.

3.3 Untersuchung der Rolle von Zuo1 an G4 *in vivo* in *S. cerevisiae*

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass G4-Strukturen nicht nur *in vitro* existieren, sondern dass sich DNA und RNA auch *in vivo* in G4 falten können (siehe Einleitung 1.4). Darüber hinaus ist bekannt, dass sich DNA-G4 während der Replikation oder Transkription bilden und diese Prozesse dadurch positiv oder negativ beeinflussen. Somit ist die Faltung aber auch die Entwindung von G4-Strukturen extrem wichtig für den Ablauf einiger biologischer Prozesse an bestimmten Loci. Kommt es während dieser biologischen Prozesse nicht zur Faltung oder Stabilisierung von G4-Strukturen, kann dies letztendlich ein Problem für die Aufrechterhaltung der Genomstabilität darstellen (siehe Einleitung 1.5). Untersuchungen, inwieweit G4-bindende Proteine dabei eine Rolle spielen sind daher von großer Relevanz.

3.3.1 Zuo1 bindet genomweit signifikant an G4-Motive

Zuo1 konnte als neues G4-bindendes Protein identifiziert und *in vitro* validiert werden. Es zeigte sich eine Spezifität von Zuo1 für G4-Strukturen im Vergleich zu anderen getesteten DNA-Strukturen sowie eine Stabilisierung von G4. Neben diesen *in vitro* Bindungsstudien, stellte sich nun die Frage, ob Zuo1 auch *in vivo* in *S. cerevisiae* mit G4-Strukturen interagiert und welche Funktion diese Interaktion im biologischen Kontext hat. Daher sollten zunächst genomweit die Bindungsstellen von Zuo1 in Hefe identifiziert werden.

Diese genomweite Analyse von Zuo1-Bindungsstellen wurde mittels Chromatin-Immunopräzipitation und anschließender DNA-Sequenzierung im Hochdurchsatz (ChIP-Seq) durchgeführt. Hierfür wurde Zuo1 mit einem Myc-Tag am C-Terminus versehen, die Expression des Proteins und das korrekte Molekulargewicht wurden via Western Blot kontrolliert (Anhang Abb. 7.6A). Auch konnte Zuo1-Myc in den Western Input- und Eluat-Proben, die während der ChIP entnommen wurden, nachgewiesen werden (Anhang Abb. 7.6B). Somit war das Protein während der Versuchsdurchführung stabil.

Die Auswertung der Sequenzierdaten ergab, dass von $6,1 \times 10^6$ *total reads* insgesamt 94% ($5,7 \times 10^6$) zum Hefegenom SACCER3 *gemappt* werden konnten, 29% waren *unique reads*. Mit MACS 2.0 (Zhang et al., 2008) konnten insgesamt 1594 chromosomale Bindestellen von Zuo1 identifiziert werden. Die Website yeast.genomes.nl (erstellt von Victor Guryev) vergleicht, ob in experimentellen Daten verschiedene genomische *features* über- und unter-repräsentiert sind und berechnet die Signifikanz der Überlappung. So wurden die Zuo1-Bindestellen mit G4-Motiven verglichen. Dies ergab eine signifikante Überlappung von Zuo1 mit G4-Motiven

genomweit ($p < 0,0001$; Tab. 3.1). Der Vergleich mit weiteren annotierten genomischen Regionen zeigte, dass Zuo1 auch signifikant an Promotoren ($p = 0,0009$) und Replikationsursprüngen ($p = 0,0255$) angereichert war, sowie an R-Loops ($p < 0,0001$) und an Stellen, an denen die Replikation pausiert (Bindestellen der DNA Polymerase 2; $p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu war Zuo1 signifikant nicht an Pif1-Bindestellen und Bindestellen der Mutante Pif1 KA ohne Helikaseaktivität angereichert. ChIP-Seq wurde parallel auch mit Zuo1-Myc Δ *sgs1* durchgeführt, um zu untersuchen, ob Zuo1 andere chromosomale Bindestellen hat, wenn G4-Strukturen nicht mehr durch die Helikase Sgs1 entwunden werden. Der Vergleich mit G4-Motiven und annotierten genomischen Regionen zeigte nur geringe Unterschiede (Anhang Tab. 7.5). Die Überlappung mit G4-Motiven, Promotoren und Replikationsursprüngen war etwas weniger signifikant als mit Sgs1. Von $2,5 \times 10^7$ total reads konnten 97% ($9,1 \times 10^7$) zum Hefegenom SACCER3 gemappt werden. Mit MACS 2.0 (Zhang et al., 2008) konnten insgesamt 3990 chromosomale Bindungsstellen von Zuo1 in Abwesenheit von Sgs1 identifiziert werden.

Tab. 3.1: Auswertung der ChIP-Seq Daten.

Überlappung mit	Zuo1-Myc	
G4-Motiv (Tract3)	enriched	$p < 0,0001$
Promotor	enriched	$p = 0,0009$
Replikationsursprung	enriched	$p = 0,0255$
R-Loops	enriched	$p < 0,0001$
DNA Pol2	enriched	$p < 0,0001$
Pif1, Pif1 KA	depleted	$p < 0,0001$

Zur weiteren Untersuchung der Bindung von Zuo1 an G4 *in vivo* wurden konventionelle ChIP Experimente durchgeführt. Für die qPCR wurden zehn G4-Motive gewählt. An G4_{XIIIb} und G4_{XI} war Zuo1 in den ChIP-Seq Daten angereichert, bei den anderen handelt es sich um zufällig ausgewählte G4-Motive mit drei G in den G-Tracts (Tract3) (Capra et al., 2010), die nicht mit Zuo1-Bindestellen überlappten. Als Kontrollregionen wurden chromosomale Regionen ohne G4-Motiv gewählt. Die Region von Chromosom XIIIa ist laut ChIP-Seq Daten eine Zuo1-Bindestelle wohingegen an die Region von Chromosom XIV, in *TFC1* und in *ARO1* Zuo1 nicht angereichert war. Abb. 3.7 zeigt, dass Zuo1 übereinstimmend mit den ChIP-Seq Daten an G4_{XIIIb} und G4_{XI} signifikant angereichert war und darüber hinaus ebenso an der Kontrollregion von Chromosom XIIIa, im Vergleich zu den Negativkontrollen XIV, *TFC1* und *ARO1*. Außerdem war Zuo1 auch an anderen G4-Motiven (G4_{Ib}, G4_{XV}) deutlich angereichert. Zwar bindet Zuo1 signifikant an G4-Motive, jedoch nicht an alle. Daher konnte im konventionellen ChIP wie auch im ChIP-Seq keine signifikante Bindung an G4_{IX}, G4_{Ia}, G4_{XVI}, G4_X, G4_{VII} und G4_{II} festgestellt

werden (Ergebnisse mit Zuo1-Myc Δ sgs1 und Wildtyp-Kontrolle ohne Tag siehe Anhang Abb. 7.7).

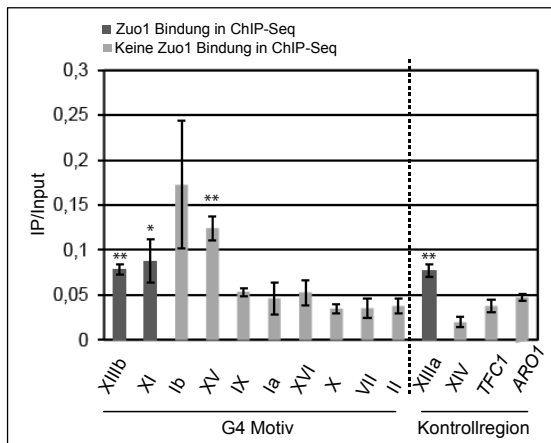


Abb. 3.7: Bestätigung der Anreicherung von Zuo1 an verschiedenen G4-Motiven. In konventionellen ChIP Experimenten war Zuo1-Myc an mehreren G4-Motiven, jedoch nicht an allen, angereichert. Die Anreicherung stimmte in einigen Fällen mit den Ergebnissen des ChIP-Seq überein. n=3, Signifikanz berechnet mit Student's Ttest: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$.

Somit konnte mit ChIP-Seq gezeigt werden, dass Zuo1 *in vivo* genomweit signifikant an G4-Motiven angereichert war. Die Bindung an verschiedene G4-Motive wurde durch ChIP-qPCR bestätigt.

3.3.2 Stablere G4-Strukturen beeinflussen das Wachstum ohne Zuo1 und mit erhöhten Zuo1-Level

Die signifikante Anreicherung von Zuo1 nicht nur an G4-Motiven, sondern auch an Promotoren, R-Loops, Replikationsursprüngen und Regionen, an denen die Replikation pausiert, legt nahe, dass die Bindung von Zuo1 an G4-Strukturen eine Rolle in der Transkription oder Replikation spielen könnte. Um somit die *in vivo*-Funktion der Zuo1-G4-Interaktion weiter zu untersuchen, wurde zunächst *ZUO1* in *S. cerevisiae* deletiert (Δ zuo1) und das Wachstum dieses Stammes in Flüssigkulturen analysiert (Abb. 3.8). Erwartungsgemäß wurde für den Wildtyp-Stamm eine Verdopplungszeit von circa 90 min berechnet. Δ zuo1 zeigte, wie bereits publiziert (Zhang et al., 1992), ein verlangsamtes Wachstum mit einer Verdopplungszeit von 144 min. Dies war signifikant 59,1% langsamer als der Wildtyp-Stamm (Abb. 3.8A).

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass verschiedene Helikasen, beispielsweise der RecQ- (Sgs1 in Hefe) oder Pif1-Familie G4-Strukturen *in vitro* und *in vivo* entwinden (Hershman et al., 2008; Huber et al., 2002; Paeschke et al., 2013; Paeschke et al., 2011; Ribeyre et al., 2009; Smith et al., 2011; Sun et al., 1999). Folglich kommen G4-Strukturen in Abwesenheit von Sgs1 oder Pif1 häufiger in der Zelle vor, da sie nicht entwunden werden. Um das verlangsamte Wachstum von Δ zuo1 und die Verbindung zu G4 zu verstehen, wurden die Verdopplungszeiten in Abwesenheit G4-entwinder Helikasen gemessen. Hierfür wurden die Hefestämme Δ zuo1

Δsgs1 und *Δzuo1 pif1-m2* hergestellt. Die Doppelmutanten mit Deletion von *SGS1* oder Mutation in *PIF1* (*pif1-m2*), in denen *Sgs1* und *Pif1* G4-Strukturen nicht mehr entwinden können, zeigten einen noch stärkeren Wachstumsdefekt (Abb. 3.8A). Dabei muss beachtet werden, dass *Δsgs1* und *pif1-m2* selbst zwar signifikant langsamer wuchsen als der Wildtyp, aber insgesamt keinen dramatischen Wachstumsdefekt haben. *Δzuo1 pif1-m2* hatte eine Verdopplungszeit von 155,4 min, das war 71,8% langsamer als der Wildtyp und 7,9% langsamer als *Δzuo1*. Die Verdopplungszeit von *Δzuo1 Δsgs1* betrug 225,6 min, was im Vergleich zum Wildtyp 149,3% und zu *Δzuo1* 56,7% erhöht und zu Wildtyp, *Δzuo1* und *Δsgs1* signifikant war.

Die Stabilität von G4-Strukturen kann auch durch die Zugabe von Liganden beeinflusst werden, die spezifisch an G4 binden (siehe Einleitung 1.4.1.2). In Hefe kamen bisher NMM und Phen-DC3 zum Einsatz. Die Bindung dieser Liganden verhindert die Entwindung von G4-Strukturen durch Helikasen (Huber et al., 2002; Piazza et al., 2010). Im Wildtyp führte die Zugabe von NMM oder Phen-DC3 zu keinen signifikanten Änderungen des Wachstums (Abb. 3.8B; Spotttest mit NMM siehe Anhang Abb. 7.8A). Nach Zugabe der Liganden zu den Deletionsstämmen wurde das Wachstum mit Wildtyp-Zellen und dem jeweiligen Stamm ohne Ligand verglichen. Phen-DC3 führte in keinem Stamm zu signifikanten Wachstumsänderungen im Vergleich zum dem jeweiligen Stamm ohne Ligand. Dennoch konnten vorallem in den Doppelmutanten kleine Unterschiede beobachtet werden. In *Δzuo1 Δsgs1* hat Phen-DC3 zu einem etwas stärkeren Wachstumsdefekt geführt verglichen mit *Δzuo1 Δsgs1* ohne Ligand. Die Verdopplungszeit betrug 251,6 min, das Wachstum war somit 178,1% langsamer als der Wildtyp und 11,5% langsamer als *Δzuo1 Δsgs1* ohne Phen-DC3. Phen-DC3 in *Δzuo1 pif1-m2* resultierte in 47,1% langsamerem Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, aber 8,5% schnellerem Wachstum im Vergleich zu *pif1-m2* + Phen-DC3 (Abb. 3.8B). NMM hatte keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum der verschiedenen Stämme (Anhang Abb. 7.8A).

Zusätzlich zur Deletion von *ZUO1* wurde auch untersucht, ob sich ein Überschuss an *Zuo1* auf das Wachstum auswirkt. Hierfür wurde *ZUO1* unter Kontrolle eines induzierbaren Gal1-Promotors von einem Plasmid überexprimiert. Dies erhöhte die Verdopplungszeit von Wildtyp-Zellen signifikant auf 112,9 min, was 24,8% langsamer im Vergleich zum Wildtyp ohne *Zuo1*-Überschuss war (Abb. 3.8C). Wenn G4-Strukturen nicht mehr von *Sgs1* oder *Pif1* entwunden werden konnten, war ein stärkerer Wachstumsdefekt zu beobachten. In *Δsgs1* führte die Überexpression von *ZUO1* zu einer Verdopplungszeit von 218,3 min, somit 96,8% langsamer als *Δsgs1* mit normalen *Zuo1*-Level. In *pif1-m2* stieg die Verdopplungszeit bei *Zuo1*-Überschuss auf 273,8 min, das war 156% langsamer im Vergleich zu *pif1-m2* mit normaler Expression von *ZUO1*.

Da bereits bekannt ist, dass G4-Strukturen in Abwesenheit von Helikasen zu replikativem Stress führen, wurde untersucht, ob die verschiedenen Deletionsstämme sensitiv gegenüber HU und MMS sind. HU und MMS führen beide zu Verzögerungen in der S-Phase (Groth et al., 2010; Koc et al., 2004). In $\Delta zuo1$ zeigte 50 μ M HU keinen dramatischen Effekt (4,6% schneller) im Vergleich zu $\Delta zuo1$ ohne HU (Abb. 3.8D). Für $\Delta sgs1$ ist eine Sensitivität gegenüber HU publiziert, allerdings wurden bei diesen Experimenten mindestens 50 mM HU in Agarplatten verwendet (Ringvoll et al., 2007). Um Hefezellen in der S-Phase zu arretieren sind 200 mM HU notwendig. Somit handelt es sich bei 50 μ M HU um eine sehr geringe Konzentration in Flüssigmedium und der Effekt auf die Replikation dürfte nur sehr gering sein. $\Delta sgs1$ war nicht sensitiv gegenüber 50 μ M HU, ebenso wenig $pif1-m2$. Das Wachstum der Doppelmutante $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ mit HU war mit einer Verdopplungszeit von 248,5 min um 174,7% langsamer als der Wildtyp und 10,2% langsamer im Vergleich zu $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ ohne HU. $\Delta zuo1 pif1-m2$ + HU wuchs mit einer Verdopplungszeit von 156,9 min 73,3% langsamer im Vergleich zum Wildtyp, aber es konnte kein Wachstumsunterschied zu $\Delta zuo1 pif1-m2$ ohne HU festgestellt werden. Zusätzlich wurde in Spotttests 100 mM HU mit Wildtyp und $\Delta zuo1$ getestet. Unter diesen Bedingungen war das Wachstum des Wildtyps schlechter als ohne HU, $\Delta zuo1$ zeigte einen noch stärkeren Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp (Anhang Abb. 7.8B). 0,01% MMS verursachte dramatische Wachstumsdefekte. Der Wildtyp hatte eine Verdopplungszeit von 307,7 min und war 240,1% langsamer als ohne MMS (Anhang Abb. 7.8C). In $\Delta zuo1$ steigerte MMS die Verdopplungszeit auf 495,1 min, dies waren 447,3% langsamer als der Wildtyp und 243,9% langsamer als $\Delta zuo1$ ohne MMS. Im Gegensatz dazu verdoppelte sich $pif1-m2$ mit MMS in 173 min, was 91,2% langsamer als der Wildtyp und 67,2% langsamer als $pif1-m2$ ohne MMS war. $\Delta zuo1 pif1-m2$, $\Delta sgs1$ und $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ hatten einen Wachstumsdefekt in MMS und es konnte keine Verdopplungszeit berechnet werden.

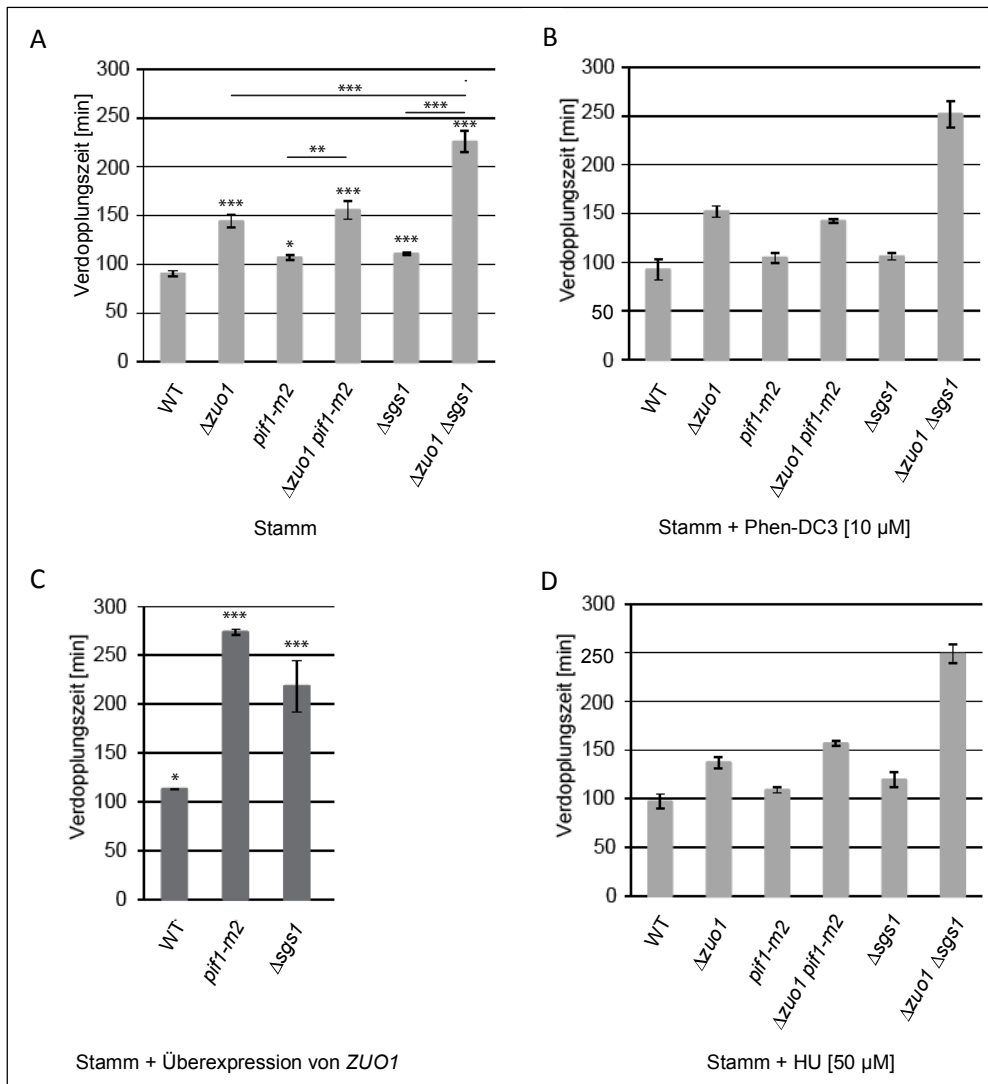
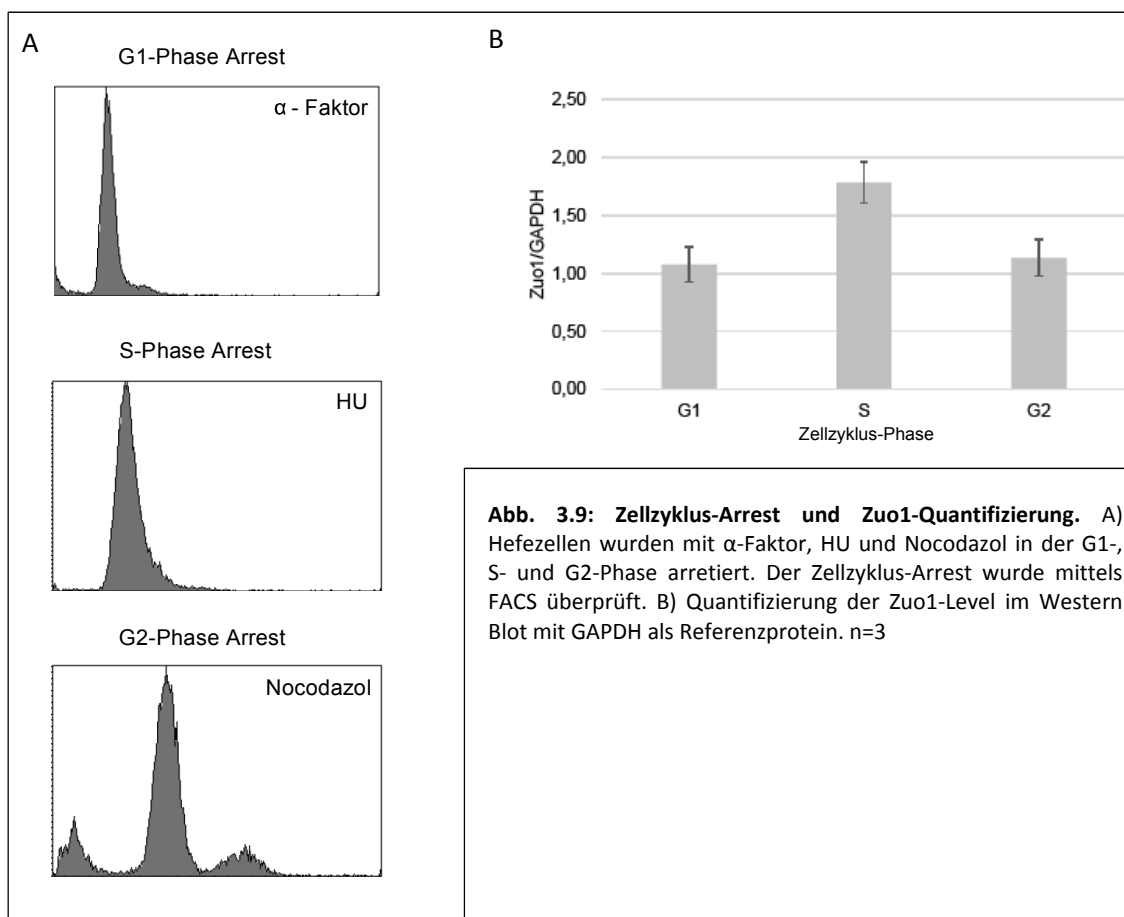


Abb. 3.8: Verdopplungszeiten von Deletionsstämmen. A) Von den angegebenen Stämmen wurden Wachstumskurven erstellt und die Verdopplungszeiten berechnet. Signifikanzen beziehen sich auf den Wildtyp oder den jeweils markierten Stamm. B) Verdopplungszeiten in Medium mit 10 μ M Phen-DC3. C) Verdopplungszeiten bei Überexpression von ZUO1. Signifikanzen beziehen sich auf den jeweiligen Stamm ohne Überexpression von ZUO1. D) Verdopplungszeiten in Medium mit 50 μ M HU. $n=3$, Signifikanz berechnet mit Student's Ttest: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$.

Zusammenfassend haben die Wachstumsanalysen gezeigt, dass $\Delta zuo1$ einen Wachstumsdefekt hatte, vor allem wenn G4-entwindende Helikasen deletiert waren. Insbesondere die Abwesenheit von Sgs1 resultierte in langsamen Wachstum von $\Delta zuo1$. Bei Überschuss von Zuo1 in der Zelle und gleichzeitiger Abwesenheit der Helikasen war der Wachstumsdefekt nochmals stärker ausgeprägt. Auch die Förderung der G4-Faltung durch replikativen Stress wirkte sich zusätzlich verlangsamend auf das Wachstum aus.

3.3.3 Zuo1-Level sind in der S-Phase am höchsten

Nachdem detailliert gezeigt wurde, dass das Wachstum von Hefezellen ohne Zuo1 oder mit Zuo1 in Überschuss verlangsamt ist, insbesondere dann, wenn die Stabilität von G4-Strukturen verändert wurde, stellte sich die Frage, in welchen Phasen des Zellzyklus Zuo1 exprimiert wird. Zur Detektion der Protein-Level wurden Hefezellen, die Zuo1 in Fusion mit einem Myc-Tag exprimierten, durch Zugabe von α -Faktor, HU und Nocodazol in der G1-, S- sowie G2-Phase arretiert. Der korrekte Zellzyklus-Arrest wurde durch FACS überprüft (Abb. 3.9A). Mittels Western Blot mit anti-Myc Antikörper konnte gezeigt werden, dass Zuo1 durchgehend im Zellzyklus exprimiert wird, aber in der S-Phase den höchsten Level hat (Abb. 3.9B). Somit könnte Zuo1 eine Funktion insbesondere während der S-Phase haben.



3.3.4 Zuo1 interagiert mit G4 zur Erhaltung der Genomstabilität

Zuo1 wird im Zellzyklus durchgehend exprimiert, erreicht aber den höchsten Protein-Level in der S-Phase. Dies legt nahe, dass Zuo1 eine Funktion bei biologischen Prozessen einnimmt, die in der S-Phase stattfinden. Hierzu gehört die DNA Replikation. Studien haben gezeigt, dass

Genomstabilität und die Unterbrechung der DNA Replikation eng miteinander verknüpft sind. In diesen Studien wurde anhand genomweiter Bindestellen von Pol2, der katalytischen Untereinheit der DNA Polymerase II (DNA Polymerase ϵ in Säugern), das Pausieren der Replikationsgabel gemessen. Die Anreicherung von Pol2 dient in Experimenten als Detektion von blockierten Replikationsgabeln. Zahlreiche Regionen korrelieren mit diesen Stellen, aber nur in Abwesenheit der Helikase Pif1 pausierte die Replikation an G4-Motiven (Paeschke et al., 2013). G4-Strukturen behindern das Fortschreiten der Replikationsmaschinerie und stellen somit ein Risiko für die Genomstabilität dar, sollten sie nicht von Helikasen entwunden werden (siehe Einleitung 1.5). Durch CHIP-Seq wurde gezeigt, dass Zuo1 an Stellen, an denen die Replikation pausiert, angereichert war. Um nun weiter die *in vivo* Rolle von Zuo1 an G4-Strukturen zu klären und die Konsequenzen für die Genomstabilität zu untersuchen, wurde der *Gross-Chromosomal Rearrangement* (GCR) Assay durchgeführt (Paeschke et al., 2013; Schmidt et al., 2006). Dieser quantitative genetische Assay ermöglicht das Messen komplexer Genom-Umstrukturierungen, indem für den gleichzeitigen Verlust der Gegenselektionsmarker *CAN1* und *URA3* auf dem linken Arm von Chromosom V selektiert wird (Abb. 3.10).

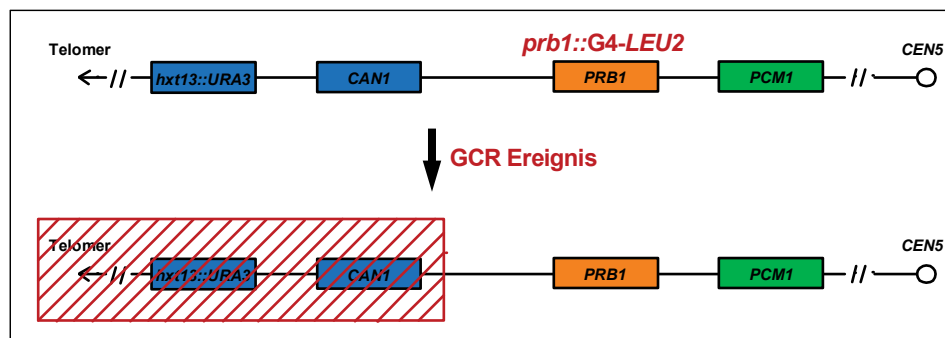


Abb. 3.10: Prinzip des GCR-Assays. Gezeigt ist der linke Arm von Chromosom V. *PCM1* ist das letzte essentielle Gen, *PRB1* ist nicht essentiell und wird durch die Integration von G4-Motiven oder Kontrollsequenzen deletiert. *URA3* und *CAN1* sind Gegenselektionsmarker. Gehen *URA3* und *CAN1* aufgrund eines GCR Ereignisses verloren, so können Kolonien auf Medium mit 5-FOA und Canavanin wachsen. Durch Fluktuationsanalyse kann die GCR-Rate ermittelt werden.

Das G4-Motiv von Chromosom I ($G4_I$) sowie eine Kontrollsequenz wurden am Locus des nicht-essentiellen Gens *PRB1* ins Hefegenom integriert (Sequenzen siehe Anhang Tab. 7.6). Der Effekt dieser Insertionen auf die Genominstabilität wurde in Wildtyp- und $\Delta zuo1$ -Stämmen untersucht. Wie bereits publiziert, entsprach die GCR-Rate des Wildtyps ohne integrierte Sequenz circa $0,1 \times 10^{-9}$ Ereignisse pro Generation (Chen and Kolodner, 1999). Tab. 3.2 zeigt, um das wieviel-fache sich die GCR-Raten in den verschiedenen Stämmen im Vergleich zum Wildtyp änderten. Sowohl $G4_I$ als auch die Kontrollregion hatten keinen signifikanten Einfluss auf die GCR-Rate des Wildtyps (Tab. 3.2). Die Deletion von *ZUO1* führte zu einer 0,7-fach

niedrigeren GCR-Rate im Vergleich zum Wildtyp. In $\Delta zuo1$ mit $G4_I$ war die GCR-Rate signifikant 2,1-fach erhöht, jedoch war dies auch mit der Kontrollsequenz zu beobachten (1,9-fach).

Da ChIP-Seq gezeigt hatte, dass Zuo1 auch in $\Delta sgs1$ an Stellen signifikant angereichert war, an denen die Replikation pausiert (Anhang Tab. 7.6), wurden $\Delta sgs1$ -Stämme ebenfalls im GCR-Assay eingesetzt. In $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ mit $G4_I$ am *PRB1*-Locus war die GCR-Rate signifikant erhöht (33,4-fach im Vergleich zum Wildtyp ohne Insertion). Dieser Anstieg der GCR-Rate war ebenso im Vergleich zu $\Delta sgs1 + G4_I$ signifikant.

Tab. 3.2: GCR-Raten verschiedener Stämme ohne Insertion sowie mit $G4_I$ und einer Kontrollsequenz am *PRB1*-Locus. Angegeben ist die x-fache Änderung der GCR-Rate des jeweiligen Stammes im Vergleich zum Wildtyp-Stamm ohne Insertion am *PRB1*-Locus \pm Standarderror. n=3

Stamm	Keine Insertion	$G4_I$	Kontroll-Sequenz
Wildtyp	1,0	1,1 \pm 0,1	1,3 \pm 0,04
$\Delta zuo1$	0,7 \pm 0,03	2,1 \pm 0,3 *	1,9 \pm 0,1 *
$\Delta sgs1$	16 \pm 5 (Paeschke et al., 2013)	12 \pm 8 (Paeschke et al., 2013)	15,0 \pm 1,1
$\Delta zuo1 \Delta sgs1$	1,3 \pm 0,1	33,4 \pm 4,2 **	1,7 \pm 0,2

Wurden $G4$ -Strukturen durch Phen-DC3 stabilisiert, so hatte das keinen signifikanten Einfluss auf die GCR-Raten im Wildtyp ohne Insertion oder mit $G4_I$ (Tab. 3.3.). In $\Delta zuo1$ war die GCR-Rate mit $G4_I$ signifikant 3,6-fach erhöht im Vergleich zu Wildtyp + $G4_I$ + Phen-DC3.

Tab. 3.3: GCR-Raten nach Zugabe von Phen-DC3. Angegeben ist die x-fache Änderung der GCR-Rate des jeweiligen Stammes im Vergleich zum Wildtyp-Stamm ohne Insertion am *PRB1*-Locus \pm Standarderror. n=3

Stamm	Keine Insertion	$G4_I$	Kontroll-Sequenz
Wildtyp	1,1 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	ND
$\Delta zuo1$	0,8 \pm 0,1	3,6 \pm 0,5 *	ND

Zusammenfassend war ohne Zuo1 die GCR-Rate erhöht, wenn $G4$ -Strukturen stabil waren, d.h. nicht mehr durch Sgs1 entwunden werden konnten oder durch Phen-DC3 stabilisiert wurden. Somit hat Zuo1 einen moderaten Einfluss auf die Genomstabilität.

Da das Fortschreiten der Replikationsgabel wichtig für die Erhaltung der Genomstabilität ist und sich bei der Auswertung der ChIP-Seq Daten gezeigt hat, dass Zuo1 an Stellen angereichert war, an denen die Replikationsgabel zum Stillstand kam, sollte dieser Aspekt weiter untersucht werden. Es wurden ChIP-qPCR Experimente durchgeführt und die Anreicherung von Pol2 an verschiedenen $G4$ -Motiven gemessen. Um den Einfluss von Zuo1 zu beobachten, wurde *ZUO1*

im Pol2-Myc Stamm deletiert. Generell liegen die aufgetragenen IP/Input-Werte an verschiedenen G4-Motiven in derselben Größenordnung wie an den Kontrollregionen *TFC1* und *ARO1* (Abb. 3.11). Jedoch war bei *TFC1* und *ARO1* der Unterschied zwischen Pol2-Myc und Pol2-Myc $\Delta zuo1$ nicht signifikant. An Bindestellen von Zuo1, den G4-Motiven G4_{IIIb}, G4_{XI} und G4_{IIb}, war die Anreicherung von Pol2 in $\Delta zuo1$ dagegen signifikant geringer. Ebenso ist G4_{XV} eine Bindestelle von Zuo1, aufgrund der Standardabweichung war hier der Unterschied weniger deutlich. An den anderen G4-Motiven, an denen Zuo1 im ChIP-Seq und konventionellen ChIP nicht angereichert war, war der Unterschied der Pol2-Anreicherung im Vergleich zu ohne Zuo1 geringer. Bei der Kontrollregion XIIIa handelt es sich ebenfalls um eine Zuo1-Bindestelle, erwartungsgemäß war auch hier eine signifikante Anreicherung von Pol2 im Wildtyp im Vergleich zu $\Delta zuo1$ zu beobachten.

Zwar ist an der Kontrollregion XIIIa kein G4-Motiv lokalisiert (Capra et al., 2010), jedoch kommen dort mehrere Wiederholungen von GG in großen Abständen vor, so dass sich möglicherweise eine relativ instabile G4-Struktur falten könnte. Dies würde die Hypothese stärken, dass Zuo1 durch die Stabilisierung von G4-Strukturen das Fortschreiten der Replikationsgabel blockiert. Die Kontrollregion XIV zeigt keinen Unterschied der Pol2 Anreicherung im Wildtyp und in $\Delta zuo1$.

Zusammenfassend war Pol2 an verschiedenen G4-Motiven deutlich angereichert, bei denen es sich um Bindestellen von Zuo1 handelt. Somit wird die Replikationsgabel blockiert, wenn Zuo1 anwesend ist und G4-Strukturen stabilisieren kann.

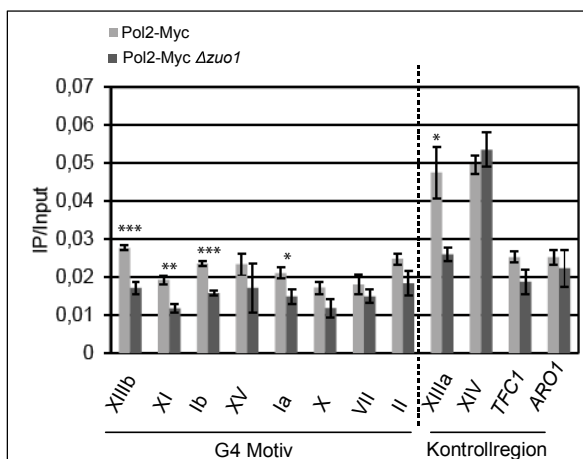


Abb. 3.11: Anreicherung von Pol2 an Zuo1-Bindestellen. In konventionellen ChIP Experimenten war Pol2-Myc in Anwesenheit von Zuo1 an Bindestellen von Zuo1 angereichert: G4_{IIIb}, G4_{XI}, G4_{IIb}, Kontrollregion XIIIa. An diesen Stellen war weniger Pol2 angereichert, wenn *ZUO1* deletiert war. n=3, Signifikanz berechnet mit Student's Ttest: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$.

3.3.5 Einfluss von Zuo1 auf die Transkription

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass Zuo1 an G4-Strukturen bindet und dies *in vivo* durchaus eine Rolle bei der Replikation spielen kann. Allerdings war Zuo1 genomweit nicht nur an Stellen angereichert, an denen die Replikation pausiert, sondern ebenso signifikant an Promotoren und R-Loops. Dadurch könnte Zuo1 auch in die Transkription involviert sein. Genomweite Computeranalysen haben gezeigt, dass G4-Motive vermehrt in Promotoren vorkommen. Darüber hinaus agiert Zuo1 als transkriptioneller Aktivator bei der *Pleiotropic Drug Resistance* (Ducett et al., 2013; Eisenman and Craig, 2004). Somit ist vorstellbar, dass Zuo1 an bestimmte G4-Strukturen bindet und dadurch Einfluss auf die Transkription nimmt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde eine genomweite Expressionsstudie mittels DNA-Microarray durchgeführt. Hierfür wurde RNA aus Wildtyp-Zellen, $\Delta zuo1$ und $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ isoliert und Veränderungen in der Genexpression analysiert. In den Mutanten zeigten sich signifikante Änderungen der Genexpression, mit mindestens 2-fach erhöhter oder erniedrigter Expression im Vergleich zum Wildtyp. In $\Delta zuo1$ waren 222 Gene signifikant anders exprimiert als im Wildtyp, 80 Gene waren hoch- und 142 waren herunterreguliert. In der Doppelmutante $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ wurden 468 Gene identifiziert, die veränderte Transkriptions-Level aufwiesen (311 hochregulierte und 157 herunterregulierte Gene). Die Expression in $\Delta sgs1$ war im Vergleich zum Wildtyp bei 175 Genen verändert, wovon 134 hoch- und 41 herunterreguliert waren. Erwartungsgemäß gab es zwischen $\Delta sgs1$ und $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ 55% Überlappung sowie zwischen $\Delta zuo1$ und $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ 45% (Abb. 3.11). GO Term Analysen der in den Mutanten verändert exprimierten Gene konnten keine Zugehörigkeit zu einem bestimmten *Pathway* oder eine spezielle Funktion zeigen.

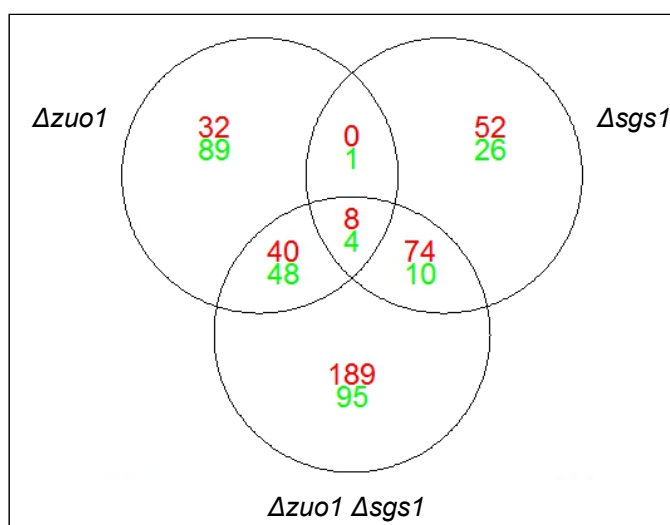


Abb. 3.11: Darstellung der Ergebnisse des DNA Microarray im Venn-Diagramm. Gene mit mehr als 2-facher Änderung der Genexpression in $\Delta zuo1$, $\Delta sgs1$ und $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ im Vergleich zum Wildtyp wurden in dieser Graphik berücksichtigt. Rot: hochregulierte Expression, grün: herunterregulierte Expression. n=3

Anschließend wurde mit der Website yeast.genomes.nl (erstellt von Victor Guryev) analysiert, ob in den verändert exprimierten Gene verschiedene genomische *features* unter- oder überrepräsentiert sind. Dies ergab in $\Delta zuo1$ signifikant keine Korrelation mit G4-Motiven ($p = 0,0268$; Tab. 3.4), ebenso wenig in $\Delta sgs1$ und $\Delta zuo1 \Delta sgs1$, allerdings war diese Verteilung nicht signifikant. In allen drei Mutanten waren die hoch- oder herunterregulierten Gene signifikant ohne G4 im Promotor ($p = 0,0548$ in $\Delta zuo1$, $p = 0,088$ in $\Delta sgs1$, $p = 0,049$ in $\Delta zuo1 \Delta sgs1$). Die Auswertung mit weiteren annotierten genomischen Regionen zeigte, dass in $\Delta zuo1$ eine signifikante Korrelation mit Bindestellen der katalytischen Untereinheit Pol2 der DNA Polymerase II festzustellen war ($p = 0,0285$), d.h. ohne Zuo1 wurden Gene, in denen die Replikation pausiert, anders exprimiert. Dies war ebenso in der Doppelmutante zu beobachten ($p < 0,0001$), jedoch nicht in $\Delta sgs1$ (depleted, $p = 0,4631$). Studien haben gezeigt, dass in Abwesenheit der Helikase Pif1 die Replikation an G4-Motiven pausiert (siehe Einleitung Abschnitt 1.5.2.2). Bei der Korrelation der Microarray-Daten von $\Delta zuo1$ mit DNA Polymerase 2-Bindestellen in *pif1-m2*-Zellen war die Überlappung noch deutlich signifikanter ($p < 0,0001$ im Vergleich zu $p = 0,0285$ im Wildtyp). Auch in der Doppelmutante war in Abwesenheit von Pif1 eine signifikante Anreicherung zu beobachten ($p = 0,0013$). Insofern wurden signifikante Korrelationen festgestellt zwischen verändert transkribierten Genen in $\Delta zuo1$ und $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ und pausierender DNA Replikation an G4-Motiven.

Darüber hinaus ergaben die Analysen, dass in allen drei Mutanten Gene verändert exprimiert wurden, die signifikant mit DNA-Doppelstrangbrüchen korrelieren (Regionen mit γ H2A, $p < 0,0001$). Weitere Analysen sind im Anhang Tab. 7.7 zu entnehmen, eine Auswahl der regulierten Gene zeigt im Anhang Tab. 7.8.

Tab. 3.4: Korrelation der Microarray-Daten mit G4-Motiven sowie weiteren annotierten genomischen Regionen.

Überlappung mit	$\Delta zuo1$		$\Delta sgs1$		$\Delta zuo1 \Delta sgs1$	
	depleted	$p = 0,0268$	depleted	$p = 0,1308$	depleted	$p = 0,4285$
G4-Motiv	depleted	$p = 0,0268$	depleted	$p = 0,1308$	depleted	$p = 0,4285$
Promotor-G4	depleted	$p = 0,0548$	depleted	$p = 0,088$	depleted	$p = 0,049$
DNA Pol2	enriched	$p = 0,0285$	depleted	$p = 0,4631$	enriched	$p < 0,0001$
DNA Pol2 <i>pif1-m2</i>	enriched	$p < 0,0001$	enriched	$p = 0,3429$	enriched	$p = 0,0013$
γ H2A	enriched	$p < 0,0001$	enriched	$p < 0,0001$	enriched	$p < 0,0001$

Zuo1-Bindestellen überlappten genomweit signifikant mit Promotoren. Obwohl keine signifikante Anreicherung von Zuo1 an G4-Motiven in Promotoren beobachtet werden konnte, sollte trotzdem überprüft werden, inwieweit Zuo1 die Expression von Genen mit G4-Motiven im Promotor beeinflusst und ob diese Daten mit dem Modell (Einleitung Abb. 1.5) vereinbar

sind. G4-Strukturen falten sich aufgrund von negativem Supercoiling und abhängig von ihrer Position können sie die Transkription beeinflussen. Eine G4-Struktur im Promotor des transkribierten Strangs inhibiert die Transkription wohingegen eine G4-Struktur auf dem komplementären Strang die Transkription begünstigt (zusammengefasst in (Bochman et al., 2012)). Mittels qPCR wurde der Einfluss von G4 und Zuo1 auf die Genexpression untersucht, indem die Expression von *OM14* quantifiziert wurde. Auf dem nicht-transkribierten Strang befindet sich ein G4-Motiv, komplementär zum Promotor von *OM14* (Abb. 3.12). Als Kontrolle wurde das G4-Motiv im Hefegenom mutiert (Sequenzen siehe Anhang Tab. 7.9). Die Hefestämme wurden uns von der Gruppe von Prof. F. Brad Johnson zur Verfügung gestellt. Die Genexpression wurde gegen den Expressionslevel von *TFC1* normalisiert. Aufgrund der Lage des G4-Motivs auf dem komplementären Strang wird dem Modell zufolge die Transkription gefördert, wenn sich die G4-Struktur faltet. Mit dem mutierten G4 sollte die Transkription geringer sein und es wurde nur eine 0,7-fache Expression gemessen. War *ZUO1* deletiert und wurden somit G4 nicht mehr durch Zuo1 stabilisiert, führte dies zu einer 0,6-fachen Reduktion der *OM14* Expression. Im Vergleich dazu war die Expression mit mutiertem G4 höher und vergleichbar mit Wildtyp-Level (mit G4). In Δ *sgs1* war die Expression von *OM14* mit G4 0,8-fach reduziert und mit mutiertem G4 nur geringfügig weniger. Obwohl das Modell vorschlägt, dass in diesem Fall die Mutationen im G4-Motiv zu einer geringeren Expression als mit G4 führen sollte, so ist zumindest diese Tendenz erkennbar. Die beschriebenen Expressionen von *OM14* in den verschiedenen Stämmen stimmen insgesamt mit dem Modell überein, obwohl manchmal nur geringe Unterschiede in der Expression messbar waren. In der Doppelmutante Δ *zuo1* Δ *sgs1* waren die Expressionslevel von *OM14* vergleichbar mit dem Wildtyp (Abb. 3.12). Zusätzlich wurden die Expressionslevel von *QNQ1* und *SOL4* quantifiziert (Anhang Abb. 7.9). Da in diesen Fällen das Modell weniger gut zutrifft, wird auf den Einfluss von Zuo1 auf die Transkription durch die Interaktion mit G4-Strukturen nicht weiter eingegangen.

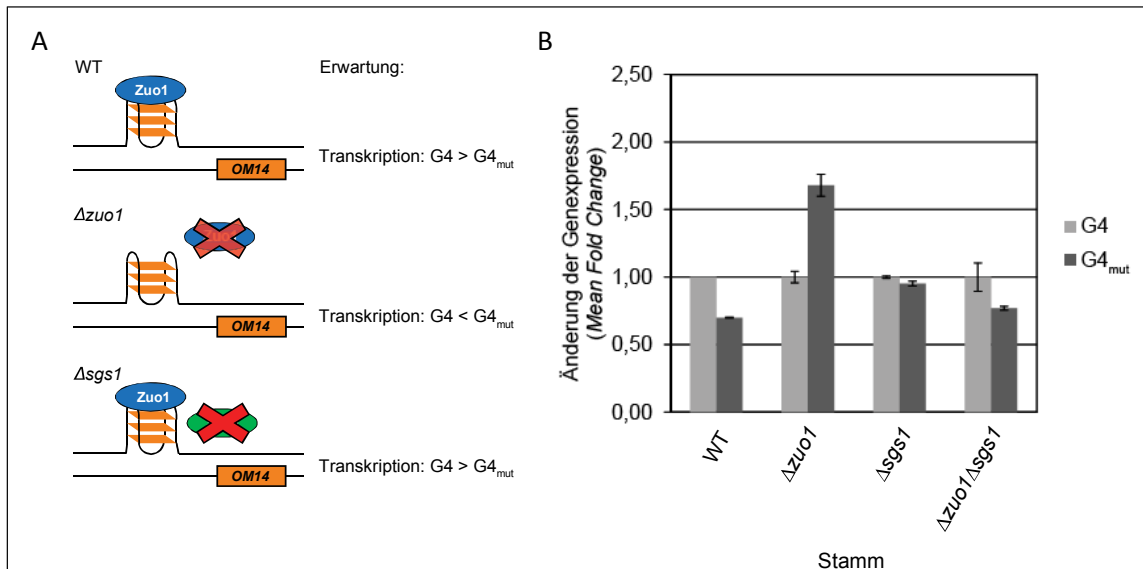


Abb. 3.12: Quantifizierung der Expression von OM14. A) Eine G4-Struktur auf dem komplementären Strang begünstigt nach dem Modell (Bochman et al., 2012) die Transkription von OM14. Gezeigt sind die verschiedenen Bedingungen in WT, $\Delta zuo1$ und $\Delta sgs1$ und der erwartete Einfluss auf die Genexpression, B) Messung der Genexpression von OM14 durch qPCR. n=3.

3.4 Untersuchung der Rolle von Slx9 an G4-Strukturen

3.4.1 Identifikation von Slx9 als G4-bindendes Protein

Neben Zuo1 gab es noch andere interessante G4-interagierende Proteine, die durch Y1H-Screenings identifiziert wurden (Anhang Tab. 7.4). In Zusammenarbeit mit Sabrina Bartsch wurde das Protein Slx9 und seine Interaktion mit G4-Strukturen im Rahmen ihrer Masterarbeit weiter untersucht.

Slx9 wurde in den Y1H-Screenings II und III jeweils einmal als G4-bindendes Protein identifiziert (Anhang Tab. 7.3). Die Retransformation des SLX9-codierenden Plasmids aus Screening II in bait-G4 resultierte in Wachstum von Kolonien auf AbA-Medium, in bait-mutG4 wuchs eine Kolonie am Rand der Agarplatte. Die Retransformation des Plasmid aus Screening III ergab kein Wachstum von Transformanten.

3.4.2 Slx9 interagiert *in vitro* mit höherer Affinität mit G4-Strukturen als mit Kontroll-DNA-Strukturen

Die Interaktion von Slx9 mit G4-Strukturen sollte durch *in vitro* Bindungsstudien mit aufgereinigtem Protein überprüft werden. Slx9 wurde mit einem 6xHis-Tag am N-Terminus (30 kDa) exprimiert und von Sabrina Bartsch aus *E. coli* aufgereinigt. Der Nachweis des Proteins erfolgte durch Western Blot mit anti-His Antikörper (Abb. 3.13).

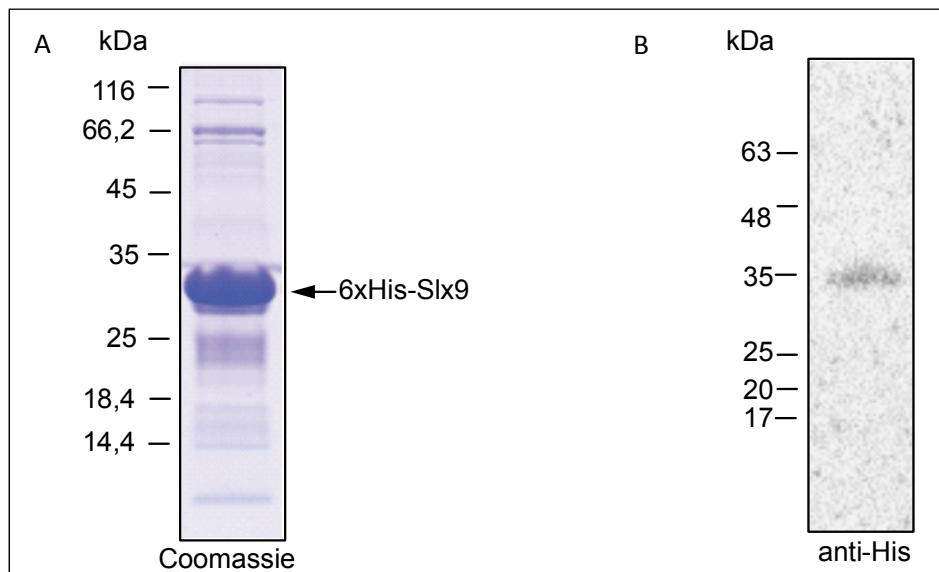


Abb. 3.13: Aufgereinigtes 6xHis-Slx9. A) SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung: Das 30 kDa große Protein läuft zwischen der 25 kDa- und 35 kDa-Bande des Protein-Markers. Es wurden 2 μg 6xHis-Slx9 aufgetragen. B) Western Blot mit anti-His Antikörper: 6xHis-Slx9 wird auf Höhe des Molekulargewichts von 35 kDa detektiert.

Zur Validierung der Interaktion von Slx9 mit G4-Strukturen wurde das aufgereinigte Protein in Doppel-Filterbindungsassays eingesetzt (Durchführung Sabrina Bartsch). Wie mit Zuo1 beschrieben (siehe Ergebnisse 3.2.1), wurden Bindungsansätze aus radioaktiv markierter DNA und steigenden Protein-Konzentrationen durch zwei übereinanderliegende Membranen filtriert. Anhand des Verhältnisses der Bindung der DNA-Protein-Komplexe an die Nitrocellulose- und Nylon-Membran konnte die Dissoziationskonstante K_d ermittelt werden. Es wurden dieselben G4- und Kontroll-DNA-Strukturen wie bereits bei den Doppel-Filterbindungsassays mit Zuo1 beschrieben, verwendet (siehe Ergebnisse 3.2.1; Nachweis der Faltung siehe Abb. 3.1+3.5A, Anhang Abb. 7.1).

Wie durch Autoradiographie ersichtlich, hat Slx9 sowohl an die verschiedenen G4-Strukturen gebunden als auch an die Kontroll-DNA-Strukturen (Anhang Abb. 7.10). Die Quantifizierung der Interaktionen mit den G4-Strukturen ergab Dissoziationskonstanten von $0,55 \pm 0,08 \mu\text{M}$ für $G4_{IX}$, $0,21 \pm 0,04 \mu\text{M}$ für $G4_{rDNA}$ sowie $0,04 \pm 0,01 \mu\text{M}$ und $0,53 \pm 0,10 \mu\text{M}$ für $G4_{TP1}$ bzw. $G4_{TP2}$ (Abb. 3.14A+B). Für die alternativen DNA-Strukturen wurden folgende K_d -Werte bestimmt: $15,69 \pm 3,57 \mu\text{M}$ für $G4_{mut}$ (Abb. 3.14A), $5,27 \pm 1,18 \mu\text{M}$ für dsDNA, $1,73 \pm 0,42 \mu\text{M}$ für *bubble*-DNA, $4,21 \pm 0,64 \mu\text{M}$ für *fork*-DNA sowie $3,72 \pm 0,62 \mu\text{M}$ für *4-fork*-DNA (Abb. 3.14C+D).

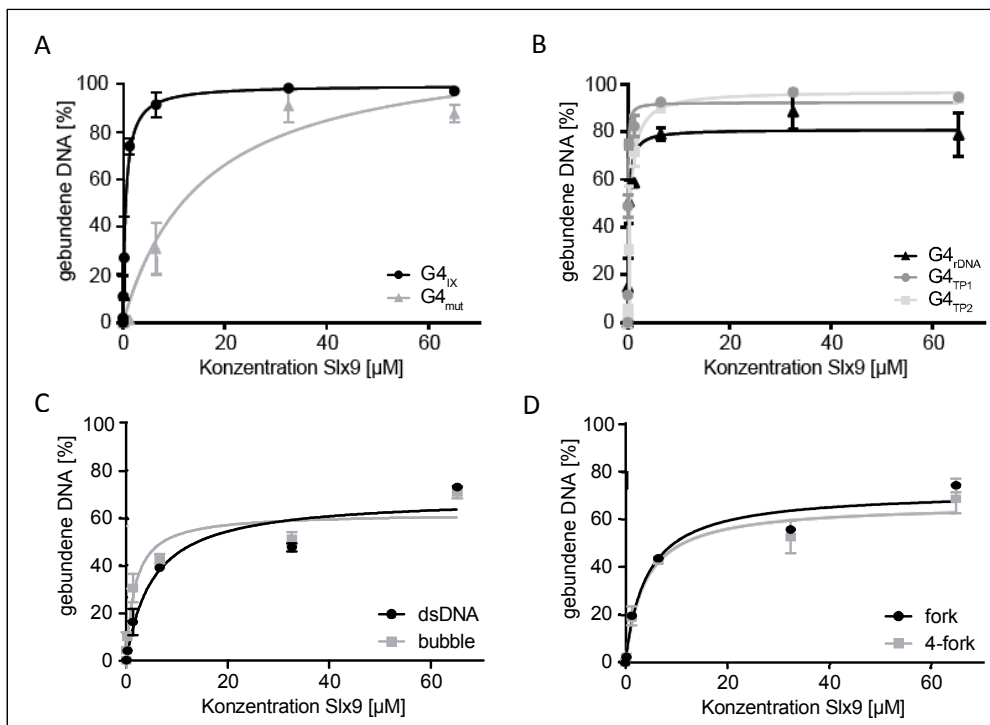


Abb. 3.14: Slx9 bindet *in vitro* mit höherer Affinität an verschiedene G4-Strukturen als an Kontroll-DNA-Strukturen. A+B) In Doppel-Filterbindungsassays hat Slx9 an alle getesteten G4-Strukturen gebunden. K_d -Werte wurden berechnet: $G4_{IX}$ ($K_d \pm \mu\text{M}$), $G4_{rDNA}$ ($K_d \pm \mu\text{M}$), $G4_{TP1}$ ($K_d \pm \mu\text{M}$) und $G4_{TP2}$ ($K_d \pm \mu\text{M}$). Die Bindung an $G4_{mut}$ war mit geringerer Affinität ($K_d \pm \mu\text{M}$ C+D) Slx9 hat mit geringerer Affinität auch an alle getesteten Kontroll-DNA-Strukturen gebunden: dsDNA, bubble, fork, 4-fork. $n=3$.

Somit hat Slx9 zwar nicht spezifisch und ausschließlich an DNA G4-Strukturen gebunden, sondern auch mit allen Kontroll-DNA-Strukturen interagiert. Jedoch war die Affinität für G4-Strukturen stets höher.

3.4.3 Genomweit ist Slx9 nicht an G4-Motiven angereichert

Da Slx9 *in vitro* zwar nicht ausschließlich aber doch mit höherer Affinität an G4-Strukturen als an die getesteten alternativen DNA-Strukturen gebunden hat, sollten durch ChIP-Seq die genomweiten Slx9-Bindestellen in *S. cerevisiae* identifiziert werden. Hierfür wurde Slx9 mit einem Myc-Tag am C-Terminus versehen. Western Input- und Eluat-Proben, die während der ChIP entnommen wurden, bestätigten das korrekte Molekulargewicht und die Expression von Slx9-Myc (Anhang Abb. 7.6B). Somit war das Protein während der Versuchsdurchführung stabil.

Die Auswertung der Sequenzierdaten ergab, dass von $9,3 \times 10^6$ total reads insgesamt 97% ($9,1 \times 10^6$) zum Hefegenom SACCER3 gemappt werden konnten. Mit MACS 2.0 (Zhang et al., 2008) konnten insgesamt 3990 chromosomale Bindestellen von Slx9 identifiziert werden. Anschließend wurde mit der Website yeast.genomes.nl (erstellt von Victor Guryev) untersucht,

ob in den experimentellen Daten verschiedene genomische *features* über- und unterrepräsentiert sind und die Signifikanz der Überlappung berechnet. Beim Vergleich der Slx9-Bindestellen mit G4-Motiven wurde gezeigt, dass Slx9 genomweit nicht an G4-Motiven angereichert war ($p = 0,2775$; siehe Tab. 3.5). Der Vergleich mit weiteren annotierten genomischen Regionen zeigte, dass Slx9 auch signifikant nicht an Promotoren ($p < 0,0001$) und Replikationsursprüngen ($p = 0,0272$) angereichert war. An Stellen, an denen die Replikation pausiert (Bindestellen von Pol2) war Slx9 dagegen signifikant vorhanden ($p = 0,0333$), allerdings nicht in der Mutante *pif1-m2* ($p = 0,1439$). Außerdem ergab die Auswertung der Sequenzierdaten, dass die Bindung von Slx9 genomweit signifikant nicht mit Pif1-Bindestellen überlappte ($p = 0,0577$), aber eine signifikante Anreicherung an Bindestellen des mutierten Proteins Pif1 KA vorlag ($p = 0,0332$). Pif1 KA kann G4-Strukturen nicht mehr entwinden, da es durch die Mutation keine Helikaseaktivität mehr besitzt. Daher werden G4-Strukturen an Pif1 KA-Bindestellen nicht entwunden.

Tab. 3.5: Auswertung der ChIP-Seq Daten.

Überlappung mit	Slx9-Myc	
	G4-Motiv (Tract3)	depleted
Promotor	depleted	$p < 0,0001$
Replikationsursprung	depleted	$p = 0,0272$
DNA Pol2	enriched	$p = 0,0333$
DNA Pol2 <i>pif1-m2</i>	depleted	$p = 0,1439$
Pif1	depleted	$p = 0,0577$
Pif1 KA	enriched	$p = 0,0332$

Somit konnte *in vivo* die Bindung von Slx9 an G4-Motive genomweit nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse bestätigen allerdings die Ergebnisse der *in vitro* Bindungsstudien, wonach Slx9 auch an andere DNA-Strukturen bindet.

3.4.4 Δ slx9 hat keinen dramatischen Wachstums-Phänotyp

Zur weiteren *in vivo* Untersuchung von Slx9 und einer möglichen Interaktion mit G4-Strukturen wurde *SLX9* in *S. cerevisiae* deletiert (Δ slx9) und das Wachstum dieses Stammes in Flüssigkulturen analysiert. Erwartungsgemäß wurde für den Wildtyp-Stamm eine Verdopplungszeit von circa 90 min berechnet. Δ slx9 wuchs mit einer Verdopplungszeit von 97,5 min 7,7% langsamer als der Wildtyp (Abb. 3.15A). Wie bei den Wachstumsanalysen von Δ zuo1 beschrieben (siehe 3.3.2), wurden die Verdopplungszeiten in Abwesenheit der G4-entwindenden Helikasen Sgs1 und Pif1 analysiert. Hierfür wurden die Hefestämme

$\Delta slx9$ $\Delta sgs1$ und $\Delta slx9$ $pif1-m2$ hergestellt. Die Stämme $\Delta sgs1$ und $pif1-m2$ selbst wachsen signifikant 18,2% bzw. 22,6% langsamer als der Wildtyp. Die Doppelmutante mit Mutation in *PIF1* ($pif1-m2$), zeigte mit einer Verdopplungszeit von 113,4 min 25% langsames Wachstum als der Wildtyp und war 16% langsamer als $\Delta slx9$ (Abb. 3.15A). Die Verdopplungszeit von $\Delta slx9$ $\Delta sgs1$ betrug 94,5 min, was vergleichbar mit dem Wachstum von Wildtyp-Zellen und $\Delta slx9$ war, obwohl $\Delta slx9$ als synthetischer Fitness-Interaktor von $\Delta sgs1$ identifiziert wurde und ein Wachstumsdefekt publiziert ist (Ooi et al., 2003). Jedoch war im Vergleich zu $\Delta sgs1$ das Wachstum signifikant um 14,8% schneller. Die Zugabe von Phen-DC3 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von $\Delta slx9$. Die Verdopplungszeit betrug 85,8 min (Abb. 3.15B).

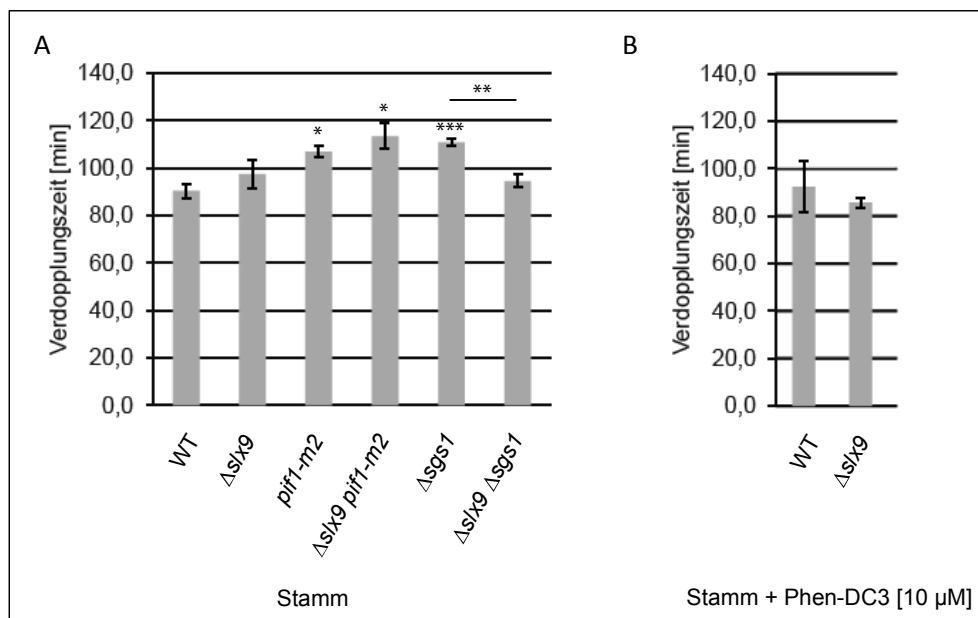


Abb. 3.15: Verdopplungszeiten von Deletionsstämmen. A) Von den angegebenen Stämmen wurden Wachstumskurven erstellt und die Verdopplungszeiten berechnet. Signifikanzen beziehen sich auf den Wildtyp oder entsprechend der Markierung. B) Verdopplungszeiten in Medium mit 10 μ M Phen-DC3. n=3 für WT, $\Delta sgs1$, $pif1-2$; alle weiteren n=2; Signifikanz berechnet mit Student's Ttest: * \leq 0,05, ** \leq 0,01, *** \leq 0,001.

Zusammenfassend haben die Wachstumsanalysen gezeigt, dass $\Delta slx9$ keinen Wachstumsdefekt hatte und keine dramatischen Veränderungen der Verdopplungszeit beobachtet werden konnten.

Ebenso wenig war der Phänotyp der Telomere durch die Deletion von *SLX9* beeinflusst. Ein Telomerblot (Durchführung Sabrina Bartsch) zeigte, dass sich die Länge der Telomere von Wildtyp und $\Delta slx9$ nicht unterschied. Auch bei Abwesenheit der Helikasen *Sgs1* oder *Pif1*, wo die Telomere im Vergleich zum Wildtyp verkürzt sind, hatte $\Delta slx9$ in diesen Stämmen keinen weiteren Einfluss auf die Länge der Telomere.

3.4.5 Slx9 hat keinen Einfluss auf die Genomstabilität

Zur weiteren Untersuchung der *in vivo* Rolle von Slx9 an G4-Strukturen und der Konsequenzen für die Genomstabilität, wurde von Sabrina Bartsch der GCR Assay durchgeführt. Ein G4-Motiv von Chromosom IV (G4_{IV}) sowie die Kontroll-Sequenz wurden am Locus des nicht-essentiellen Gens *PRB1* ins Hefegenom integriert. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine G-reiche Sequenz integriert (Sequenzen siehe Anhang Tab. 7.6). Der Effekt dieser integrierten Sequenzen auf die Genominstabilität wurde in Wildtyp- und $\Delta slx9$ -Stämmen untersucht. Wie bereits publiziert, entsprach die GCR-Rate des Wildtyps ohne integrierte Sequenz circa $0,1 \times 10^{-9}$ Ereignissen pro Generation (Chen and Kolodner, 1999). In Wildtyp-Zellen wurden die GCR-Raten durch Integration von G4_{IV} oder Kontroll-Sequenzen nicht signifikant beeinflusst (Tab. 3.6). Die Deletion von *SLX9* resultierte ebenso wenig in einer veränderten GCR-Rate. Dies war sowohl im Wildtyp als auch in den anderen Stämmen mit integrierten G4_{IV} oder Kontroll-Sequenzen der Fall. Somit hatte Slx9 keinen Einfluss auf die Genomstabilität.

Tab. 3.6: $\Delta slx9$ hat keinen Einfluss auf die Genomstabilität. Angegeben ist die Änderung der GCR-Rate des jeweiligen Stammes im Vergleich zum Wildtyp-Stamm ohne Insertion am *PRB1*-Locus \pm Standarderror. n=3

Stamm	Keine Insertion	G4 _{IV}	Kontroll-Sequenz	G-reiche Kontroll-Sequenz
Wildtyp	1,0	1,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,2
$\Delta slx9$	0,9 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	1,3 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2

4. Diskussion

Der Fokus dieser Diskussion liegt auf der Interaktion von Zuo1 mit G4-Strukturen. Für Slx9 wurde gezeigt, dass die Affinität für DNA G4-Strukturen größer war als für die anderen getesteten DNA-Konformationen, aber es genomweit nicht zu einer signifikanten Überlappung mit G4-Motiven kam. Dies kann mehreres bedeuten. Entweder, dass Slx9 *in vivo* nicht an konventionelle G4-Strukturen bindet oder dass es an nicht-konventionelle G4 bindet, wie beispielsweise an G4 mit nur zwei G in den G-Tracts (Tract2), mit Haarnadelstrukturen in den Loops (Lim et al., 2015) oder sogar an Strukturen mit GAGA- oder GCGC-Quartets (Kocman and Plavec, 2017). Außerdem könnte sein, dass Slx9 nur in bestimmten Zellzyklus-Phasen mit G4-Strukturen interagiert (z.B. unter Stress). Ferner ist es auch möglich, dass Slx9 an RNA-G4 bindet, da verschiedene Studien zeigen, dass RNA- und DNA-G4 strukturell sehr ähnlich sind (zusammengefasst in (Agarwala et al., 2015)). Da nach den bisherigen Experimenten noch unklar ist, welche Rolle die Interaktion von Slx9 mit G4 *in vivo* spielen könnte, wird Slx9 hier nicht diskutiert.

Nachdem die *in vivo* Existenz von G4-Strukturen in den letzten Jahren durch verschiedene genetische und globale Studien belegt werden konnte (Biffi et al., 2013; Henderson et al., 2014; Liu et al., 2016; Paeschke et al., 2013; Paeschke et al., 2011; Ribeyre et al., 2009; Schaffitzel et al., 2001), rückte die Untersuchung von G4 bei biologischen Prozessen mehr in den Mittelpunkt. Aufgrund der starken Konservierung der Nukleotidsequenz des G4-Motivs und dessen Verteilung im Genom verschiedener Eukaryoten, ist davon auszugehen, dass G4-Strukturen eine Funktion bei biologischen Prozessen in der Zelle haben (Capra et al., 2010; Nakken et al., 2009). Jedoch muss dabei berücksichtigt werden, dass wegen der hohen thermodynamischen Stabilität eine spontane Faltung und Entfaltung unwahrscheinlich ist, um zeitnah regulatorisch Einfluss bei verschiedenen Abläufen zu nehmen. Darüber hinaus wurde *in silico* eine sehr große Anzahl von G4-Motiven identifiziert (Bedrat et al., 2016; Capra et al., 2010; Chambers et al., 2015; Hershman et al., 2008). Aus diesen Gründen sind für die Regulation der Faltung, Stabilisierung und Entfaltung von G4-Strukturen Proteine notwendig, die spezifisch mit den polymorphen G4-Konformationen interagieren. Obwohl bereits Proteine identifiziert wurden, die *in vivo* an der Regulation von G4-Strukturen beteiligt sind, ist wegen der hohen Variabilität der G4-Strukturen und der notwendigen Selektivität und Spezifität der Proteine davon auszugehen, dass noch weitaus mehr Proteine eine Rolle an G4-Strukturen *in*

in vivo spielen. Die Identifikation von immer mehr G4-bindenden Proteinen bestätigt zudem indirekt die Existenz von G4-Strukturen *in vivo*.

In dieser Arbeit wurde Zuo1 als neues G4-stabilisierendes Protein identifiziert. Die weitere *in vivo* Charakterisierung in *S. cerevisiae* erlaubte die Erstellung eines Modells, das Zuo1 mit der Reparatur von DNA Schäden in der Nähe von G4-Strukturen in Verbindung bringt und somit durch die Interaktion mit G4 zur Erhaltung der Genomstabilität beiträgt.

Bisher wurden G4-interagierende Proteine mit Pull-Down Experimenten und Massenspektrometrie identifiziert (Gonzalez et al., 2009; Pagano et al., 2015; von Hacht et al., 2014). Zwar waren diese Studien durchaus erfolgreich, dennoch wurde auch deutlich, dass beispielsweise keine RecQ-Helikasen detektiert wurden und somit nicht alle G4-bindenden Proteine zu finden waren (Gonzalez et al., 2009). Dies könnte zum einen an der Limitation von *Proteomics* liegen, wonach man nicht alle Proteine finden kann. Zum anderen spielt aber auch die Anzahl eine Rolle, wie häufig ein Protein in der Zelle vorliegt und aus welcher Zellzyklus-Phase das Lysat verwendet wurde. Daher können andere Methoden dazu beitragen, weitere Kandidaten zu identifizieren. In diesem Kontext ist das Y1H System eine neue Methode zur Identifikation neuer G4-interagierender Proteine.

In einem Y1H-Screening mit einer selbst hergestellten Hefe cDNA Bibliothek konnte die Interaktion von Zuo1 mit G4_{IX} detektiert und durch Retransformationen bestätigt werden. Zuo1 war in 23 von insgesamt 28 Klonen das interagierende Protein (siehe Anhang Tab. 7.2).

Bei den Screenings II und III wurde eine erworbene Hefe cDNA Bibliothek eingesetzt. Wie sich bei der Sequenzierung der Plasmide gezeigt hatte, waren auch in dieser Bibliothek teilweise nur ORF-Fragmente vorhanden. Dennoch konnten insgesamt 156 verschiedene G4-bindende Proteine identifiziert werden. Zuo1 war nicht unter diesen Proteinen, ebenso wenig andere bekannte G4-bindende Proteine wie Pif1 (siehe Anhang Tab. 7.3). Da die erworbene Bibliothek nicht normalisiert war und von Pif1 mit 60 (Kulak et al., 2014) oder 259 (Ghaemmaghami et al., 2003) Molekülen pro Zelle relativ wenig Protein exprimiert ist, könnte dies ein möglicher Grund sein, warum Pif1 nicht detektiert wurde. Zuo1 jedoch ist mit 45.188 (Kulak et al., 2014) oder 86.400 (Ghaemmaghami et al., 2003) Molekülen pro Zelle vermehrt vorhanden, sodass in diesem Fall die fehlende Normalisierung der Bibliothek nicht ausschlaggebend sein sollte. Davon abgesehen sollten Proteine selektiv und spezifisch an G4-Strukturen binden, somit können in einem Screening mit G4_{IX} nur Proteine identifiziert werden, die mit dessen G4-Konformation interagieren. Da bei den Screenings II und III HU in geringer Konzentration eingesetzt wurde, um die Faltung von G4-Strukturen unter geringem replikativem Stress zu fördern, könnte dies möglicherweise ebenso Einfluss darauf genommen haben, welche

Proteine gebunden haben und welche nicht. Darüber hinaus wurde die Sequenz von G4_{ix} nur einfach ins Hefegenom des Screening-Stamms integriert. Die Integration von mehreren Kopien kann ebenfalls die Detektion weiterer Proteine fördern.

Da sich RNA-G4 und DNA-G4 sehr ähnlich sind (zusammengefasst in (Agarwala et al., 2015)), kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei den Y1H-Screenings mit DNA-G4_{ix} auch Proteine detektiert wurden, die an RNA-G4 binden. Auffällig war, dass circa 37% der identifizierten G4-bindenden Kandidaten ribosomale oder mit der Translation in Verbindung stehende Proteine waren (siehe Anhang Tab. 7.3, grau markiert). Hierbei könnte es sich um Proteine handeln, deren biologische Relevanz eher mit RNA-G4 zusammenhängt. Übereinstimmend mit dieser Vermutung publizierten van Hacht und Kollegen eine Liste an humanen Proteinen, die in Pull-Down Experimenten präferiert an RNA G4-Strukturen gebunden hatten, darunter waren ebenfalls viele ribosomale Proteine (von Hacht et al., 2014). Aber auch Pull-Down Experimente mit DNA-G4 identifizierten ribosomale Proteine (Gonzalez et al., 2009).

Insgesamt können unter den 156 Kandidaten noch Falsch-Positive sein, die beispielsweise durch Autoaktivierung aufgrund einer Mutation die Expression des Reportergens aktiviert haben. Mit *ZUO1*-codierenden Plasmiden wurden deshalb Retransformationen durchgeführt. So zeigte sich, dass die Interaktion nur mit G4_{ix} stattfand und nicht mit G4_{mut}. Das Vorhandensein von G4_{ix} auf dem komplementären Strang führte ebenfalls zur Expression des Reportergens, obwohl das G4-Motiv komplementär zur *bait*-Stelle integriert war. Aufgrund der Faltung des G4 könnte nach Bindung von Zuo1 die fusionierte GAL4-AD dennoch in räumliche Nähe zum GAL4-Promotor gelangen und zur Expression des Reportergens führen.

Zusammenfassend gehe ich davon aus, dass die Y1H-Screenings funktioniert haben, um neue G4-bindende Proteine zu identifizieren. Jedoch sind zur Validierung einzelner Kandidaten neben den Retransformationen weitere Versuche notwendig.

4.1 Zuo1 stabilisiert G4-Strukturen *in vitro*

In vitro konnte die direkte Interaktion von Zuo1 mit G4_{ix} durch EMSA und Doppel-Filterbindungsassays bestätigt werden (Abb. 3.4, 3.5B+C). Mittels EMSA wanderte der Zuo1-G4-Komplex jedoch nicht bis zur Mitte ins Gel, sondern steckte mit steigender Proteinkonzentration in den Geltaschen fest. Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten war deshalb nur mit Doppel-Filterbindungsassays möglich. Die K_d -Werte lagen zwischen 0,67 μ M und 1,26 μ M (Mittelwert $K_d = 0,87 \mu$ M) (Abb. 3.5B+C). Zum Vergleich interagierten die ersten hochspezifischen G4-Antikörper mit Telomer-G4-DNA mit Affinitäten von $K_d = 0,13$ nM bis 3

nM (Schaffitzel et al., 2001). Für die Helikasen BLM und Sgs1 wurden durch EMSA Dissoziationskonstanten von 4 nM und 5 nM für G4-Strukturen ermittelt (Huber et al., 2002). Dabei zeigte sich für BLM und Sgs1 eine größere Affinität für G4-Strukturen als für Holliday-Junctions ($K_d = 76$ nM bzw. 83 nM). Doppel-Filterbindungs-Assays mit Pif1 ergaben eine Präferenz für G-reiche ($K_d = 0,04$ nM) gegenüber nicht-G-reicher ($K_d = 0,2$ nM) ssDNA und eine Affinität für G4-Strukturen mit $K_d = 0,08$ nM (Paeschke et al., 2013). EMSA mit Nucleolin und rDNA-G4 zeigten eine starke Affinität für die G4-Struktur sowohl mit endogenem ($K_d = 1$ nM) als auch mit rekombinantem ($K_d = 0,5$ nM) Nucleolin (Hanakahi et al., 1999). Obwohl die Affinität von Zuo1 für G4 im Vergleich zu den genannten Beispielen geringer ist, so muss dennoch hervorgehoben werden, dass für alle Kontroll-DNA-Strukturen, einschließlich des GC-reichen mutierten G4-Oligonukleotids G4_{mut} keine Dissoziationskonstante ermittelt werden konnte und somit keine nennenswerte Bindung an lineare ssDNA und alternative DNA-Strukturen stattfand (Abb. 3.5B+D).

Alle G4-Strukturen falteten sich in Na⁺ in die parallele G4-Konformation (Abb. 3.1, 3.4). Wurde die G4-Struktur G4_{ix} in K⁺ gefaltet, so zeigte sich im CD-Spektrum, dass ein Gleichgewicht aus paralleler und antiparalleler Konformation vorlag (Anhang Abb. 7.5A). Die Zugabe von Zuo1 in 2,5- und 5-fachem Überschuss bewirkte eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der parallelen G4-Struktur und eine Stabilisierung (Abb. 3.6A). Eine solche Bindung an gemischt vorliegenden parallelen und antiparallelen G4-Konformationen konnte auch bei Experimenten mit dem G4-Antikörper 1H6 beobachtet werden (Kazemier et al., 2017). Ebenso können Liganden die G4-Konformation von gemischt zu parallel verschieben (Liu et al., 2016). Somit könnte Zuo1 in zukünftigen Experimenten eingesetzt werden, um G4-Strukturen *in vivo* zu detektieren, ähnlich wie Liganden oder Antikörper. Um herauszufinden, ob Zuo1 die G4-Struktur nur stabilisiert oder auch induziert, sind weitere CD Titrations-Experimente mit einem linearen G4-Oligonukleotid nötig.

Gelfiltration mit aufgereinigtem Zuo1 hat gezeigt, dass das Protein als Trimer vorliegen könnte (Anhang Abb. 7.2). Allerdings muss für eine verlässliche Aussage auch die Proteinstruktur berücksichtigt werden, weshalb bei einem dynamischen Protein wie Zuo1 mit unstrukturierten Bereichen, noch weitere Versuche notwendig sind, um eine Oligomerisierung zu bestätigen. Unstrukturierte Bereiche könnten auch eine Erklärung dafür sein, warum 6xHis-Zuo1 nach Auftrennung durch SDS-PAGE nicht wie erwartet bei 50 kDa detektiert wurde, sondern auf Höhe der 66,2 kDa-Bande des Größenstandards (Abb. 3.3). Nichtsdestotrotz wurde auch mit dem humanen Ortholog ZRF1 durch Gelfiltration eine Oligomerisierung beobachtet (Richly et al., 2010). Da zwar 54 Proteine bekannt sind, die physikalisch mit Zuo1 interagieren (siehe

www.yeastgenome.com), Zuo1 selbst allerdings nicht aufgelistet ist, könnte zunächst die Zuo1-Zuo1-Bindung durch Y2H oder mittels MST (Microscale Thermophoresis) überprüft werden. Vorhersagen der Homo-Oligomerisierung von Zuo1 anhand der Aminosäure-Sequenz des Proteins mit GalaxyWEB (Ko et al., 2012; Shin et al., 2014) ergaben insgesamt fünf verschiedene Modelle, darunter viermal ein Dimer und einmal ein Trimer. Einen tiefen Einblick in die Struktur der Interaktion von Zuo1 mit G4-Strukturen könnte durch NMR Spektroskopie erlangt werden. In diesem Fall müssen jedoch die optimalen Bedingungen für das DNA-G4 als auch für das Protein miteinander kombiniert werden, was experimentell anspruchsvoll ist. Durch die Expression verkürzter Zuo1-Proteine kann herausgefunden werden, welche Domäne des Proteins für die Oligomerisierung als auch für die Interaktion mit G4-Strukturen notwendig ist.

4.2 Zuo1 und G4-Strukturen *in vivo* in *S. cerevisiae*

ChIP-Seq bestätigte die Bindung von Zuo1 an G4-Motive *in vivo* in *S. cerevisiae*. Die genomweite Überlappung von Zuo1-Bindestellen mit G4-Motiven, die G4-Strukturen mit drei G-Quartetts bilden (Capra et al., 2010), war signifikant ($p < 0,0001$; Tab. 3.1). Zwar kann bei dieser Methode auch die indirekte Bindung von Zuo1 durch Protein-Protein-Interaktionen an G4-Motive nicht ausgeschlossen werden, dennoch ist aufgrund der *in vitro* Bindungsstudien eine direkte Interaktion von Zuo1 mit G4 plausibel. Durch konventionellen ChIP und qPCR wurde die Bindung an ausgewählten G4-Motiven überprüft. Dabei wurden sowohl G4 ausgewählt, an denen Zuo1 im ChIP-Seq angereichert war als auch G4-Motive, die nicht mit Zuo1-Bindestellen überlappen. Wegen der stringenten Bedingungen bei der Durchführung des ChIP-Seq wurden im Gegensatz zum konventionellen ChIP weniger G4-Motive detektiert, an denen Zuo1 angereichert war. Daher wurde im konventionellen ChIP nicht nur die Bindung an G4_{XIIIb} und G4_{XI} bestätigt, sondern auch gezeigt, dass Zuo1 noch an anderen G4-Motiven angereichert war (G4_{Ib}, G4_{XV}), jedoch nicht an allen getesteten (G4_{IX}, G4_{Ia}, G4_{XVI}, G4_X, G4_{VII} und G4_{II}) (Abb. 3.7). Die Kontrollregion von Chromosom XIIIa diente zudem als Positivkontrolle, da sie im ChIP-Seq mit Zuo1 überlappte. Weil auch im konventionellen ChIP Zuo1 an dieser Region angereichert war, kann davon ausgegangen werden, dass das Experiment funktioniert hat und die Anreicherung von Zuo1 an den genannten G4-Motiven die korrekte Situation *in vivo* widerspiegelt.

Zur weiteren Untersuchung der *in vivo* Funktion von Zuo1 an G4-Strukturen wurden Wachstumskurven mit verschiedenen Mutanten und unterschiedlichen Wachstumsbedingungen erstellt (Abb. 3.8). Wie bereits publiziert ist (Zhang et al., 1992), wirkt sich die Deletion von *ZUO1* auf den Phänotyp aus und führte zu 59,1% langsamerem Wachstum als der Wildtyp. Hierbei spielt vermutlich die Funktion von Zuo1 als Co-Chaperon eine Rolle, denn ohne Zuo1 kann die Protein-Synthese nicht wie gewohnt ablaufen. Übereinstimmend mit dieser Hypothese führte auch die Deletion von *SSB1/2* und *SSZ1*, den anderen Komponenten der Chaperon-Triade, zu langsamen Wachstum (Gautschi et al., 2002; Hundley et al., 2002). Die Helikasen Sgs1 und Pif1 entwinden G4-Strukturen *in vitro* und *in vivo* (Hershman et al., 2008; Huber et al., 2002; Paeschke et al., 2013; Paeschke et al., 2011; Ribeyre et al., 2009; Smith et al., 2011; Sun et al., 1999). Konnten G4-Strukturen in Abwesenheit von Sgs1 oder Pif1 nicht mehr von diesen Helikasen entwunden werden und waren somit in der Zelle angereichert, so zeigten $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ und $\Delta zuo1 pif1-m2$ einen starken Wachstumsdefekt (56,7% bzw. 7,9% langsamer), der auf das Fehlen von Zuo1 zurückzuführen ist (Abb. 3.8A). Dies bedeutet, dass es Probleme beim Wachstum gibt, wenn das Gleichgewicht aus gefalteten und ungefalteten G4-Strukturen gestört wird. Somit kann das als Hinweis für eine positive Rolle von G4-Strukturen angesehen werden.

Im Vergleich zu Pif1 hatte das Fehlen von Sgs1 in $\Delta zuo1$ dramatischere Auswirkungen auf die Verdopplungszeiten. Bei Überexpression von *ZUO1* war der Wachstumsdefekt dagegen in $pif1-m2$ stärker ausgeprägt als in $\Delta sgs1$ (Abb. 3.8C). Mit einem Anstieg der Verdopplungszeiten um 156% ($pif1-m2$) bzw. 96,8% ($\Delta sgs1$) haben erhöhte Zuo1-Level somit ähnlich dramatische Effekte wie die Abwesenheit von Zuo1. Dies passt zu der Annahme, dass Zuo1 G4-Strukturen *in vivo* nur für bestimmte biologische Funktionen stabilisiert, zu hohe Zuo1-Level sich daher schon wieder negativ auswirken und speziell beim Fehlen von Pif1 oder Sgs1 das Wachstum von Zellen behindern. Obwohl Zuo1 G4-Strukturen *in vitro* stabilisiert und daher auch *in vivo* ähnlich wie ein Ligand wirken könnte, hatte Phen-DC3 im Gegensatz zu hohen Zuo1-Level keinen Einfluss auf das Wachstum von $pif1-m2$ und $\Delta sgs1$. Zwar ist publiziert, dass die Stabilisierung von G4-Strukturen mit Phen-DC3 eine Entwindung durch Pif1 verhindert (Piazza et al., 2010), dennoch führte Phen-DC3 in $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ zu einem Wachstumsdefekt von 11,5% (im Vergleich zu $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ ohne Phen-DC3) (Abb. 3.8B) und in allen anderen Stämmen war der Effekt geringer. Dies suggeriert, dass die *in vivo* Rolle von Zuo1 an G4-Strukturen mit weiteren biologischen Prozessen zusammenhängt, infolgedessen es zu Verzögerungen im Wachstum kommt oder Zuo1 agiert an anderen G4-Strukturen als Phen-DC3. Für die Funktion von Zuo1 an G4-Strukturen *in vivo* bedeutet dies, dass Zuo1 genau zwischen G4-Strukturen unterscheiden kann und nicht wie Liganden generell an G4-Strukturen wirkt. Dies ermöglicht

der Zelle, durch G4-Strukturen biologische Prozesse, wie beispielsweise die DNA Reparatur, sehr spezifisch zu regulieren.

G4-Strukturen führen in Abwesenheit von Helikasen oder nach Zugabe von HU zu replikativem Stress. Zwar ist für $\Delta sgs1$ eine Sensitivität gegenüber HU publiziert, bei der geringen Konzentration von 50 μM war diese aber nicht erkennbar (Abb. 3.8D). Nur in $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ bewirkte HU einen Anstieg der Verdopplungszeit um 10,2%. Somit trug in diesem Stamm die Abwesenheit von Zuo1 zu langsamerem Wachstum unter geringem replikativem Stress bei. In anderen Studien werden Zellen 50 – 150 mM HU ausgesetzt, um die Replikation zu verlangsamen und die S-Phase zu verlängern (Clarke et al., 2001). Dennoch konnte in der Doppelmutante auch mit 50 μM bereits ein Effekt beobachtet werden. Wachstumskurven mit höheren HU Konzentrationen könnten diesen Effekt noch verstärken, denn in Spotttests mit 100 mM waren bereits dramatische Wachstumsdefekte von $\Delta zuo1$ erkennbar (Anhang Abb. 7.8B). Auf das Wachstum von $pif1-m2$ sowie $\Delta zuo1 pif1-m2$ hatte HU keine Auswirkungen. Dramatische Wachstumsdefekte wurden durch replikativen Stress mit MMS beobachtet. Für Stämme ohne Sgs1 sowie $\Delta zuo1 pif1-m2$ konnten keine Verdopplungszeiten berechnet werden, da die Zellen zum Teil nicht die log-Phase erreicht haben. $\Delta zuo1$ und $pif1-m2$ wuchsen mit 243,9% bzw. 67,2% deutlich langsamer als ohne MMS. Somit wirkt sich MMS stärker auf das Wachstum von $\Delta zuo1$ aus als HU und das Fehlen von Helikasen, die G4-Strukturen entwinden behindert den Eintritt in die log-Phase.

Da sich vorallem in der Doppelmutante $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ Wachstumsdefekte zeigten und diese in $\Delta zuo1 pif1-m2$ weniger stark ausgeprägt waren, steht die Funktion von Zuo1 an G4-Strukturen vermutlich eher in Zusammenhang mit Sgs1 als mit Pif1. Diese Hypothese wird durch ChIP-Seq belegt. Bindestellen von Zuo1 überlappten signifikant nicht mit Bindestellen von Pif1 oder Pif1 KA (jeweils $p < 0,0001$; Tab. 3.1). Das mutierte Protein Pif1 KA kann aufgrund einer Mutation in der Helikase-Domäne keine G4-Strukturen entwinden (Paeschke et al., 2013). Dagegen spricht, dass bei erhöhten Zuo1-Level das Wachstum von $pif1-m2$ stärker beeinflusst war als von $\Delta sgs1$. Jedoch könnte eine generelle „Überdosierung“ von Zuo1 zu einer gewissen Unspezifität führen, so dass wegen der Akkumulation von Zuo1 zusätzliche G4-Strukturen durch Zuo1 stabilisiert werden und sich dies generell negativ auf das Wachstum von Zellen ohne Pif1 oder Sgs1 auswirkt und die eigentliche Funktion von Zuo1 an G4 nicht mehr deutlich wird. Dabei könnten G4, die sonst von Pif1 entwunden werden, stärker betroffen sein bzw. in $pif1-m2$ ist der Wachstumsdefekt dramatischer, da es stärker von der normalen *in vivo* Situation abweicht. Diese Vermutung könnte durch ChIP-Seq mit Überexpression von *ZUO1* beantwortet werden.

4.3 Zuo1 und die Replikation

Die Deletion von *SGS1* in Hefe hatte keinen Einfluss auf die Genomstabilität von G4-Strukturen in Minisatelliten (Ribeyre et al., 2009). Der Nachweis für eine Rolle von Sgs1 an G4-Strukturen *in vivo* stammt von Experimenten, die gezeigt haben, dass die mRNA-Level in $\Delta sgs1$ im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert waren, wenn diese Gene G4-Motive im ORF hatten (Hershman et al., 2008). Daher scheint Sgs1 an G4-Strukturen eine Funktion bei der Transkription zu haben. Aus diesem Grund wurde auch Zuo1 in Zusammenhang mit der Transkription untersucht. Dies lieferte jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Zwar überlappen Bindestellen von Zuo1 signifikant mit Promotoren ($p = 0,0009$), jedoch signifikant nicht mit G4 in Promotoren ($p = 0,1893$) und G4 in ORFs ($p < 0,0001$) (Tab. 3.1). Weitere *in vivo* Experimente lieferten ebenfalls keine Ergebnisse, die einen klaren Zusammenhang von Zuo1 und G4-Strukturen mit der Transkription widerspiegeln.

Zuo1 war durchgehend im Zellzyklus exprimiert und erreichte den höchsten Protein-Level in der S-Phase. Experimente mit synchronisierten Zellen zeigten die Abhängigkeit der G4 Faltung und Entfaltung im Laufe des Zellzyklus mit einem Maximum an G4 während der S-Phase (Biffi et al., 2013). Durch ChIP-Seq wurde gezeigt, dass Zuo1 an Stellen signifikant angereichert war ($p < 0,0001$; Tab. 3.1), wo die DNA Polymerase II stoppt und somit die Replikation pausiert. Dies war auch bei Abwesenheit von Sgs1 der Fall ($p < 0,0001$; Anhang Tab. 7.6). Somit erscheint es plausibel, dass Zuo1 G4-Strukturen insbesondere während der S-Phase stabilisiert und damit Einfluss auf die Replikation nimmt. Da gezeigt wurde, dass in Abwesenheit von Pif1 die Replikation an G4-Motiven pausiert und G4-Strukturen ein Risiko für die Genomstabilität darstellen, weil sie das Fortschreiten der Replikationsmaschinerie behindern, würde sich eine Stabilisierung von G4-Strukturen durch Zuo1 eigentlich negativ auf die Genomstabilität auswirken. Jedoch erscheint die Funktion von Zuo1 bisher eher in Zusammenhang mit Sgs1 als mit Pif1 zu stehen. Tatsächlich wurden bei GCR-Assays moderate Effekte von $\Delta zuo1$ auf die Genomstabilität beobachtet. Die Integration eines G4-Motivs von Chromosom I in $\Delta zuo1$ hatte keinen dramatischen Effekt im Vergleich zur Integration einer Kontrollsequenz. Wurden G4-Strukturen durch Phen-DC3 stabilisiert, so stieg die GCR-Rate in $\Delta zuo1 + G4_i$ signifikant an (Tab. 3.3). Auch in der Doppelmutante $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ war die GCR-Rate im Vergleich zu $\Delta sgs1 + G4_i$ signifikant erhöht, wenn $G4_i$ am *PRB1*-Locus integriert war (Tab. 3.2). Somit waren ohne Zuo1 die GCR-Raten erhöht, wenn G4-Strukturen stabil waren, d.h. nicht mehr durch Sgs1 entwunden werden konnten oder durch Phen-DC3 stabilisiert wurden.

In Zusammenhang mit der Genomstabilität wurde auch untersucht, ob die Replikation an G4 in Abhängigkeit von Zuo1 beeinflusst ist. Durch Pol2-ChIP konnte bisher gezeigt werden, dass an G4-Motiven, an denen Zuo1 bindet, Pol2 angereichert ist und der Pol2-Level an diesen Stellen deutlich geringer ist, wenn Zuo1 fehlt (Abb. 3.11). Somit könnten durch Zuo1 stabilisierte G4-Strukturen das Fortschreiten der DNA Polymerase II behindern. Da jedoch dieselbe Beobachtung an der Kontrollregion XIIIa gemacht wurde, die ebenfalls eine Zuo1-Bindestelle ist, jedoch kein klassisches G4-Motiv mit drei G-Quartetts enthält (Capra et al., 2010), sind weitere qPCR an verschiedenen Regionen (G4-Motive und keine G4-Motive) notwendig, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Da das Fortschreiten der Replikationsgabel wichtig für die Erhaltung der Genomstabilität ist, sich aber bei der Auswertung der ChIP-Seq Daten gezeigt hat, dass Zuo1 an Stellen angereichert war, an denen die Replikationsgabel zum Stillstand kam, sollte dieser Aspekt weiter untersucht werden. Pol2 ist die katalytische Untereinheit der DNA Polymerase II (DNA Polymerase ϵ in Säugern). Die Anreicherung von Pol2 dient in Experimenten als Detektion von blockierten Replikationsgabeln. Um in konventionellen ChIP und qPCR Experimenten zu untersuchen, ob Pol2 an G4-Strukturen angereichert ist wurde ein Pol2-Myc Stamm verwendet. Damit der Einfluss von Zuo1 beobachtet werden kann, wurde *ZUO1* im Pol2-Myc Stamm deletiert. Für die qPCR wurden dieselben Regionen gewählt wie beim konventionellen ChIP mit dem Zuo1-Myc Stamm. Generell liegen die aufgetragenen IP/Input-Werte an verschiedenen G4-Motiven in derselben Größenordnung wie an den Kontrollregionen *TFC1* und *ARO1* (Abb. 3.11). Jedoch ist an den G4-Motiven $G4_{IIIb}$, $G4_{XI}$ und $G4_{Ib}$ die Anreicherung von Pol2 in $\Delta zuo1$ deutlich geringer als bei *TFC1* und *ARO1*. Interessanterweise handelt es sich bei $G4_{IIIb}$, $G4_{XI}$ und $G4_{Ib}$ um Bindestellen von Zuo1. Weniger signifikant ist dagegen der Unterschied der Pol2 Anreicherung in Wildtyp und $\Delta zuo1$ an den anderen G4-Motiven, an denen Zuo1 im ChIP-Seq und konventionellen ChIP nicht angereichert war. Bei der Kontrollregion XIIIa handelt es sich ebenfalls um eine Zuo1-Bindestelle, erwartungsgemäß ist auch hier eine deutliche Anreicherung von Pol2 im Wildtyp im Vergleich zu $\Delta zuo1$ zu beobachten. Zwar ist an der Kontrollregion XIIIa kein G4-Motiv lokalisiert (Capra et al., 2010), jedoch kommen dort mehrere Wiederholungen von GG in großen Abständen vor, so dass sich möglicherweise eine relativ instabile G4-Struktur falten könnte. Dies würde die Hypothese stärken, dass Zuo1 durch die Stabilisierung von G4-Strukturen das Fortschreiten der Replikationsgabel blockiert. Die Kontrollregion XIV zeigt keinen Unterschied der Pol2 Anreicherung im Wildtyp und in $\Delta zuo1$.

Insgesamt war Pol2 in Anwesenheit von Zuo1 an allen Zuo1-Bindestellen angereichert. Dabei handelt es sich um verschiedene G4-Motive. Ohne Zuo1 waren die Pol2-Level geringer. Somit

wird die Replikationsgabel blockiert, wenn Zuo1 anwesend ist und G4-Strukturen stabilisieren kann.

4.4 Modell zur Rolle von Zuo1 an G4-Strukturen bei der DNA Reparatur

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und mit Blick auf die Rolle des humanen Orthologs ZRF1 bei der NER (Gracheva et al., 2016), konnte ein Modell aufgestellt werden, dass die Bindung von Zuo1 an G4-Strukturen mit der DNA Reparatur in *S. cerevisiae* in Verbindung bringt (Abb. 4.1).

Ein DNA Schaden während der S-Phase induziert die Faltung oder Stabilisierung einer G4-Struktur durch Zuo1 neben der DNA Schadstelle. Da das G4 aufgrund der Bindung von Zuo1 nicht länger von Sgs1 entwunden werden kann, stellt die G4-Struktur ein Hindernis für die Replikationsmaschinerie dar und stoppt deren Fortschreiten. Ähnlich wie ZRF1 könnte auch Zuo1 mit Reparaturfaktoren in Verbindung stehen und diese zur Schadstelle rekrutieren, während die Replikation pausiert. Wurde der DNA Schaden behoben, so verlassen die Reparaturproteine die DNA und eine Stabilisierung der G4-Struktur durch Zuo1 ist nicht länger notwendig. Sgs1 kann die G4-Struktur nun wieder entwenden und die Replikation kann fortgesetzt werden (Abb. 4.1).

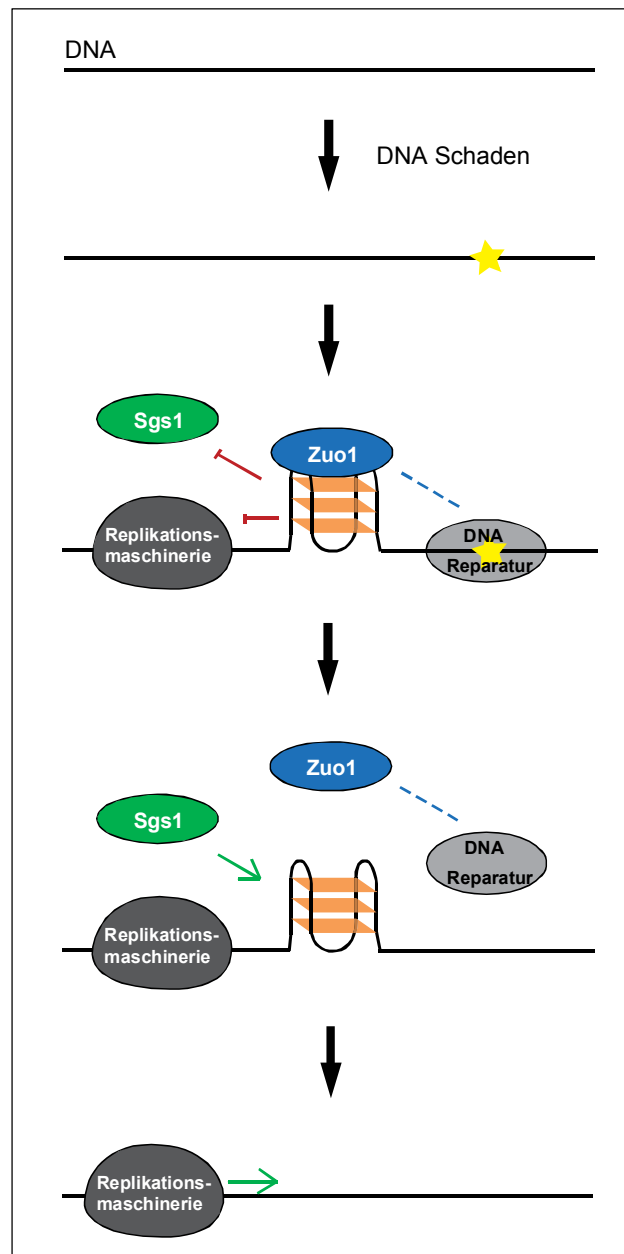


Abb. 4.1: Modell für die Rolle von Zuo1 bei der DNA Reparatur in *S. cerevisiae*. Ein DNA Schaden (gelber Stern) induziert die Faltung oder Stabilisierung einer G4-Struktur durch Zuo1 neben der DNA Schadstelle. Die G4-Struktur kann nicht länger von Sgs1 entwunden werden und stoppt die Replikationsmaschinerie am G4. Zuo1 könnte wie ZRF1 während der Reparatur mit DNA Reparaturproteinen in Verbindung stehen. Nach der Reparatur des DNA Schadens verlassen die Reparaturproteine die DNA und Zuo1 stabilisiert nicht länger die G4-Struktur. Die Entwindung der G4-Struktur durch Sgs1 ermöglicht das Fortschreiten der Replikation.

Insgesamt würde Zuo1 in diesem Modell die DNA Reparatur durch Stabilisierung der G4-Struktur vereinfachen oder begünstigen, ohne generell für die Reparatur und die Replikation essentiell zu sein. Da bekannt ist, dass die Abwesenheit von Helikasen *in vivo* zu Mutationen oder Deletionen an G4-Motiven führt, würde eine G4-Faltung während der Replikation wenig Sinn für die Zelle machen, da dies ein Risiko für die Genomstabilität darstellt.

In Verbindung mit der DNA Reparatur wäre die Faltung von G4 während der Replikation jedoch positiv für die Zelle.

Die Daten des Microarray unterstützen das vorgeschlagene Modell denn sie haben gezeigt, dass in $\Delta zuo1$ und $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ Gene verändert exprimiert werden, die signifikant mit Bindestellen der DNA Polymerase II überlappen ($\Delta zuo1$ $p = 0,0285$, $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ $p < 0,0001$; Tab. 3.4). Außerdem wurde in $\Delta zuo1$, $\Delta sgs1$ und $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ eine signifikante Korrelation hoch- oder herunterregulierter Gene mit DNA-Doppelstrangbruchstellen beobachtet (jeweils $p < 0,0001$; Tab. 3.4). Unklar ist, um welche Art von DNA Schaden es sich bei diesem Modell handelt oder ob wie beim humanen ZRF1 nur eine Rolle bei der NER in Frage kommt. In $\Delta zuo1$ war die Expression der NER-Proteine Rad34 und Rad28 und in der Doppelmutante $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ die Expression von Rad16 hochreguliert. Rad34 ist ein homologes Protein in Hefe zu Rad4 (XPC) und Rad28 ist verwandt mit dem humanen CSA, das bei der TC-NER involviert ist. Zu Rad16 ist kein humanes Homolog bekannt, in Hefe bindet Rad16 UV-geschädigte DNA. In der Doppelmutante $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ war außerdem die Expression von zwei Komponenten des Shu-Komplexes, *SHU2* und *CSM2*, hochreguliert. Der Shu-Komplex fördert die Reparatur durch HR im Gegensatz zum Einsatz von *Translesion Synthesis* Polymerasen an DNA Schäden, die die Replikation behindern (Godin et al., 2016). Dies würde bedeuten, dass ohne Zuo1 und ohne Sgs1 die DNA Reparatur alternativ ausgeführt werden muss und deshalb vermehrt Komponenten des Shu-Komplex exprimiert werden, um eine Reparatur durch HR unabhängig von Zuo1 und G4-Strukturen zu ermöglichen. Zudem könnte es ein Hinweis sein, dass Zuo1 speziell mit NER in Zusammenhang steht und nicht mit HR, wo der Shu-Komplex agiert. Darüber hinaus interagiert Zuo1 direkt mit dem NER-Protein Mms22 (DDB2) (Buser et al., 2016) und Zuo1-Bindestellen überlappen signifikant mit Bindestellen von Mms1 (DDB1) (Wanzek et al., 2017). Genetisch interagiert *ZUO1* mit einigen Reparaturprotein-codierenden Genen: *DOA1* ist in NHEJ involviert, *UNG1* ist an der Reparatur von Uracil in DNA beteiligt, *IES4* ist eine Komponente des INO80-Chromatin-Remodellierungskomplexes und *MSH2* ist in die Initiation der Mismatch-Reparatur involviert (Analyse mit DRYGIN: (Koh et al., 2010)). Somit scheint die NER in diesem Modell eine Möglichkeit zu sein, andere Reparaturwege können aber bisher nicht ausgeschlossen werden.

ZRF1 wird infolge der Erkennung des DNA Schadens durch XPC rekrutiert (Gracheva et al., 2016). Ob auch Zuo1 in Hefe durch die Reparaturproteine rekrutiert wird oder durch die Stabilisierung der DNA-Struktur durch Zuo1 die Reparaturproteine besser zur Schadstelle finden, bleibt zu klären. Ebenso stellt sich die Frage wie groß der Abstand zwischen DNA Schadstelle und G4-Motiv ist. Da Zuo1 aber möglicherweise oligomerisiert, sind auch größere Entfernungen vorstellbar. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Zuo1 im Fall einer

Oligomerisierung sowohl an die G4-Struktur bindet als auch parallel eine ähnliche Rolle wie ZRF1 an der DNA-Schadstelle einnimmt.

Möglicherweise werden auch die G4-Struktur und der komplementäre Einzelstrang selbst als Schädigung der DNA registriert, denn XPC erkennt thermodynamisch destabilisierte Duplex-DNA (Sugasawa et al., 2001). In diesem Fall würde die G4-Faltung und Stabilisierung durch Zuo1 unabhängig von einem DNA Schaden stattfinden. In Wachstumsversuchen mit Überexpression von *ZUO1* in Deletionsstämmen verschiedener NER-Proteine wie $\Delta rad4$ und $\Delta rad23$ sollte dann keine Sensitivität gegenüber UV Strahlung beobachtet werden können, während im oben dargestellten Modell die Zellen UV sensitiv sein müssten. Außerdem würde UV Strahlung im dargestellten Modell wegen der Akkumulation von DNA Schäden mit einer verstärkten G4-Faltung einhergehen. Dies könnte mit G4-Antikörpern *in vivo* beobachtet werden und würde das Modell weiter stützen. Mittels ChIP-Seq könnte analysiert werden, ob aufgrund der UV Strahlung und somit Ansammlung von G4-Strukturen in der Zelle noch mehr Zuo1-Bindestellen detektiert werden können, die mit G4-Motiven überlappen.

Bei Überexpression von *ZUO1* hatten $\Delta sgs1$ und *pif1-m2* einen starken Wachstumsdefekt (Abb. 3.8C). Mit Screenings mit einer Hefe-Deletions- und einer Hefe-Überexpressions-Bibliothek könnten weitere genetische Interaktoren und Suppressoren identifiziert werden. Beim Abgleich der Listen mit G4-bindenden Proteinen können so weitere *Pathways* identifiziert werden, die mit G4-Strukturen in Verbindung stehen.

Durch konventionellen ChIP kann zudem überprüft werden, ob weitere Reparaturproteine wie Rad4 und Rad23 an oder neben G4-Motiven binden. Interessanterweise wurde Rad23 beim Y1H-Screening als G4-bindendes Protein detektiert (Anhang Tab. 7.3), die Interaktion wurde aber bisher nicht validiert. Um eine Konservierung der Funktion von Zuo1 an G4 aufzudecken, wären Experimente mit dem humanen ZRF1 in Hefe sinnvoll. ZRF1 könnte von einem Plasmid in $\Delta zuo1$ exprimiert und in Wachstumskurven sowie im GCR-Assay eingesetzt werden. *In vitro* könnte die Bindung von aufgereinigtem ZRF1 an G4-Strukturen durch Doppel-Filterbindungsassays und CD Titration getestet und analysiert werden.

Die Kristallisation von Zuo1 und der gebundenen G4-Struktur würde strukturelle Einblicke in die Interaktion ermöglichen. Anhand dieser Daten könnten weitere Mechanismen im vorgeschlagenen Modell erkannt werden.

Insgesamt sind noch viele Fragen offen, die in zukünftigen Experimenten geklärt werden müssen. Auch der genaue Zusammenhang mit Sgs1 oder anderen Helikasen bleibt zu untersuchen. Auf eine Rolle von Sgs1 bei der DNA Reparatur wurde in dieser Arbeit nicht eingegangen, wäre aber auch noch ein interessanter Aspekt (Mimitou and Symington, 2008; Saffi et al., 2000).

Die Ergebnisse meiner Arbeit postulieren eine bislang unbekannte positive Funktion von G4-Strukturen *in vivo*. Durch die gezielte Blockierung der DNA Replikation, um die Reparatur eines DNA Schadens zu begünstigen, tragen durch Zuo1 stabilisierte G4-Strukturen zur Erhaltung der Genomstabilität in Hefe bei.

5. Material und Methoden

5.1 Stämme

5.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Tab. 5.1: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft	Verwendung
W303	<i>MATa ura3-1 trp1Δ 2 leu2-3, 112 his3-11,15 ade2-1 can1-100</i>	R. Rothstein	Standard-Stamm
Y1H Gold	<i>MATα ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3, 112 gal4Δ gal80Δ met- MEL1</i>	Clontech	Y1H
YPH500	<i>MATα ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1</i>	(Paeschke et al., 2013)	GCR
BY4741	<i>MATa his3Δ 1 leu2Δ 0 met15Δ 0 ura3Δ 0</i>	(Brachmann et al., 1998)	qPCR Expression
BY4742	<i>MATα his3Δ 1 leu2Δ 0 lys2Δ 0 ura3Δ 0</i>		

Tab. 5.2: In dieser Arbeit verwendete und hergestellte *S. cerevisiae*-Stämme.

Name	Genotyp	Hergestellt von	Verwendung
SG46	Y1HGold G4 _{ix}	SG	Y1H
SG101	Y1HGold G4 _{mut}	SG	
SG948	Y1HGold C4 _{ix}	SG	
SG1014	W303 Zuo1-Myc TRP1	SG	ChIP-Seq
SG1132	W303 Zuo1-Myc TRP1 <i>sgs1::HIS3</i>	SG	
SG1010	W303 Slx9-Myc TRP1	SG	
SG77	W303 <i>zuo1::TRP1</i>	SG	Wachstumskurven
SG922	W303 <i>sgs1::HIS3</i>	SG	
SG923	W303 <i>zuo1::TRP1 sgs1::HIS3</i>	SG	
SG599	W303 <i>pif1-m2</i>	K.Wanzek	
SG785	W303 <i>pif1-m2 zuo1::TRP1</i>	SG	
SG386	W303 <i>slx9::TRP1</i>	SG	
SG917	W303 <i>slx9::TRP1 sgs1::HIS3</i>	SG	
SG673	W303 <i>pif1-m2 slx9::TRP1</i>	SG	
SG1154-1156	W303 + BG1805	SG	Überexpression ZUO1
SG1160-1162	W303 <i>sgs1::HIS3</i> + BG1805	SG	
SG1157-1159	W303 <i>pif1-m2</i> + BG1805	SG	
SG23	YPH500 WT	(Paeschke et al., 2013)	GCR
SG85	YPH500 <i>zuo1::TRP1</i>	SG	
SG1023	YPH500 <i>sgs1::HIS3</i>	SG	
SG1020	YPH500 <i>zuo1::TRP1 sgs1::HIS3</i>	SG	
SG64	YPH500 <i>prb1::G4_r-LEU2</i>	SG	

SG104	YPH500 <i>prb1::G4_I-LEU2 zuo1::TRP1</i>	SG	
KP314	YPH500 <i>prb1::G4_I-LEU2 sgs1::HIS3</i>	K.Paeschke	
SG1026	YPH500 <i>prb1::G4_I-LEU2 zuo1::TRP1 sgs1::HIS3</i>	SG	
KW200	YPH500 <i>prb1::Kontroll-Sequenz-LEU2</i>	K.Wanzek	
SG1067	YPH500 <i>prb1::Kontroll-Sequenz-LEU2 zuo1::TRP1</i>	SG	
SG1076	YPH500 <i>prb1::Kontroll-Sequenz-LEU2 sgs1::HIS3</i>	SG	
SG1091	YPH500 <i>prb1::Kontroll-Sequenz-LEU2 zuo1::TRP1 sgs1::HIS3</i>	SG	
KW172	YPH500 <i>pif1-m2</i>	K.Wanzek	
SG1036	YPH500 <i>pif1-m2 zuo1::TRP1</i>	SG	
KW204	YPH500 <i>pif1-m2 prb1::G4_I-LEU2</i>	K.Wanzek	
SG1039	YPH500 <i>pif1-m2 prb1::G4_I-LEU2 zuo1::TRP1</i>	SG	
SG431	YPH500 <i>slx9::TRP1</i>	SG	
SG66	YPH500 <i>prb1::G4_{IV}-LEU2</i>	SG	
SG654	YPH500 <i>prb1::G4_{IV}-LEU2 slx9::TRP1</i>	SG	
KW203	YPH500 <i>prb1::G-reich-LEU2</i>	K.Wanzek	
SB17	YPH500 <i>prb1::G-reich-LEU2 slx9::TRP1</i>	S.Bartsch	
SB21	YPH500 <i>prb1::Kontroll-Sequenz-LEU2 slx9::TRP1</i>	S.Bartsch	
KW178	W303 Pol2-Myc <i>TRP1</i>	K.Wanzek	Pol2 ChIP
SG1163	W303 Pol2-Myc <i>TRP1 zuo1::KAN</i>	E.Schwindt	
SG952	BY4742	F.B.Johnson	qPCR Expression <i>SOL4, OM14</i>
SG1073	BY4742 <i>zuo1::HIS3</i>	SG	
SG1097	BY4742 <i>sgs1::LEU2</i>	SG	
SG1128	BY4742 <i>sgs1::LEU2 zuo1::HIS3</i>	SG	
SG960	BY4742 <i>G4_{mut}</i>	F.B.Johnson	qPCR Expression <i>SOL4</i>
SG1074	BY4742 <i>G4_{mut} zuo1::HIS3</i>	SG	
SG1114	BY4742 <i>G4_{mut} sgs1::LEU2</i>	SG	
SG1124	BY4742 <i>G4_{mut} sgs1::LEU2 zuo1::HIS3</i>	SG	
SG951	BY4741	B.Johnson	qPCR Expression <i>QNQ1</i>
SG1063	BY4741 <i>zuo1::HIS3</i>	SG	
SG1104	BY4741 <i>sgs1::LEU2</i>	SG	
SG1102	BY4741 <i>sgs1::LEU2 zuo1::HIS3</i>	SG	
SG955	BY4741 <i>G4_{mut}</i>	F.B.Johnson	
SG1060	BY4741 <i>G4_{mut} zuo1::HIS3</i>	SG	
SG1117	BY4741 <i>G4_{mut} sgs1::LEU2</i>	SG	
SG1121	BY4741 <i>G4_{mut} sgs1::LEU2 zuo1::HIS3</i>	SG	
SG958	BY4742 <i>G4_{mut}</i>	F.B.Johnson	qPCR Expression <i>OM14</i>
SG1108	BY4742 <i>G4_{mut} zuo1::HIS3</i>	SG	
SG1110	BY4742 <i>G4_{mut} sgs1::LEU2</i>	SG	
SG1127	BY4742 <i>G4_{mut} sgs1::LEU2 zuo1::HIS3</i>	SG	

5.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Tab. 5.3: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft	Verwendung
DH5 α	<i>F</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15 endA1 recA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44 thi-1 gyrA96</i> (<i>Nal^r</i>) <i>relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> λ	(Hanahan, 1983)	Klonierung
XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96</i> (<i>nal^R</i>) <i>thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'</i> [<i>::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15]</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>)	Stratagene	Y1H
Rosetta pLysS	<i>F</i> <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE (Cam ^R)	Novagen	Protein-aufreinigung

Tab. 5.4: In dieser Arbeit hergestellte *E. coli*-Stämme.

Name	Genotyp	Hergestellt von	Verwendung
SG22	DH5 α pAbAi-G4 _{ix}	SG	Y1H
SG70	DH5 α pAbAi-G4 _{mut}	SG	Y1H
SG45	DH5 α pRS415-G4 _i	SG	GCR
SG43	DH5 α pRS415-G4 _{iv}	SG	GCR
SG140	Rosetta pLysS pET28a-ZUO1	SG	Zuo1 Aufreinigung
SG146	Rosetta pLysS pET28a-SLX9	SG	Slx9 Aufreinigung

5.2 Oligonukleotide

Tab.5.5: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für *in vitro* Bindungsstudien. Mutationen sind rot markiert, G-Tracts von G4-Motiven sind fett gedruckt.

Name	Sequenz 5'-3'	Verwendung
G4 _{ix}	AAAAAAAAAAAA GGG TACGGT GGG TAATAA GGG AAGGTAT CGGG	Faltung in G4-Strukturen <i>in vitro</i>
G4 _{mut}	AAAAAAAAAAG C GTACGGT G CGTAATAA C GCAAG C TAT CGCG	
G4 _{TP}	AAAAAAAAAAAA GGGGG AGCT GGGG TAGAT GGG AATGT GAGGG	
G4 _{rDNA}	AAAAAAAAAAAA GGG TAAC GGGG AATAA GGG TTTCGAT TCCGGGAGAGGG	
dsDNA	GACGCTGCCGAATTCTGGCTTGCTAGGACATCTTTGCCACGTTGAC CCG + CGGGTCAACGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAAGCCAGAATTCGGCAGC GTC	Kontroll-DNA-Strukturen für <i>in vitro</i> Bindungsstudien Sequenzen aus (Mohaghegh et al., 2001)
<i>bubble</i>	CGGGTCAACGTGGGCAAAGCCAATGCGATCGGCCAGAATTCGGCAGC GTC + GACGCTGCCGAATTCTGGCTTGCTCGGACATCTTTGCCACGTTGAC CCG	
<i>fork</i>	GACGCTGCCGAATTCTGGCTTGCTAGGACATCTTTGCCACGTTGAC CCG + CGGGTCAACGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAATGTAATCGTCTATGAC GTC	
<i>4-fork</i>	GACGCTGCCGAATTCTGGCTTGCTAGGACATCTTTGCCACGTTGAC CCG + CGGGTCAACGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAATGTAATCGTCTATGAC GTC + GACGTCATAGACGATTACATTGCTAGGACATGCTGTCTAGAGACTAT CGC + GCGATAGTCTCTAGACAGCATGTCCTAGCAAGCCAGAATTCGGCAGC GTC	

Tab.5.6: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für konventionelle ChIP-qPCR Experimente.

Name	Sequenz 5'-3'	Orientierung	Merkmal
KW195	GCTTCAGCCTGGGGTAAC	fw	XIIIb: G4 (Tract3), Zuo1 binding in ChIP-Seq
KW196	GGCACCATTAGATTCACCAC	rev	
KW59	AATCCCGTCGCTATGCTC	fw	XI: G4 (Tract3), Zuo1 binding in ChIP-Seq
KW60	CTCCCGGTCTGTTATTTTC	rev	
SP01	CCGATCCAGTCCCACAGTAA	fw	Ib: G4 (Tract2)
SP01	TGATCCTTGTCCCTTCCACC	rev	
KW314	ATACGCAGTATGGTGATATC	fw	XV (Tract3)
KW315	GTTTATTGCCGATATACCTC	rev	
KW160	AGAGTCTTTGGCACTGTTG	fw	IX: G4 (Tract3)
KW161	ATTATCCCTTAATGGCCTAC	rev	
KW322	TCGTATACATGCCGAGTAG	fw	Ia: G4 (Tract3)
KW323	GTTACCACAGAATTGAACTG	rev	
KW99	ACCAGCCACAGCACTTAG	fw	XVI: G4 (Tract3)
KW100	GGTGCCACTGCGGAAAG	rev	
KW328	CACAAACACATAAACACATAC	fw	X: G4 (Tract3)
KW329	CGGATTTGCATAGTTGTC	rev	
SG385	GACGTATCTTCATCGCTATC	fw	VII: G4 (Tract3, SOL4)
SG386	TATAATTACTTACAGTGCACATA	rev	
SG391	CTCCTCTGTTCTTGCCTCA	fw	II: G4 (Tract3, OM14)
SG382	TACGCAGGGACGATTAACG	rev	
KP233	CCAAACCAGACCAACCATTG	fw	XIIIa: G-reich
KP233	TGCTGACCACAACGAACC	rev	
KW377	AGTGATTGTGCCGTTATAAC	fw	XIV: no G4, overlap with Zuo1 binding site from ChIP-Seq
KW378	CGGTTCGCACTACGATAC	rev	
SG389	TTAAAACGACCTCATTATCACA	fw	TFC1: no G4
SG390	AGCTTAAAGATGGGGTAAACT	rev	
KW203	TCGTTACAAGGTGATG	fw	ARO1: no G4 (McGee et al., 2010)
KW204	AATAGCGGCAACAAC	rev	

Tab.5.7: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für die Quantifizierung der Expression durch qPCR.

Name	Sequenz 5'-3'	Orientierung	Verwendung
SG336	CTGCATCATTCGACCTAATC	fw	Expression <i>SOL4</i>
SG337	TGCGGTCCATCTCTTCTAC	rev	
SG360	GATCAAACCTGGAGTCCCAC	fw	Expression <i>QNQ1</i>
SG361	GATATGATCCGATAGTGTGC	rev	
SG359	TGACTCTGAAGACGGTCAC	fw	Expression <i>OM14</i>
SG333	GATGCACTATTTAACCCTGC	rev	
SG369	TCGAATCAGACACTCCAGG	fw	Expression <i>TFC1</i> als Referenzgen
SG368	CAACATCAGGTACCACGGT	rev	

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Sigma-Aldrich bestellt.

5.3 Plasmide

Tab.5.8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Name	Herkunft	Verwendung
pAbAi	Clontech	Y1H
pET28a	Novagen	Proteinexpression 6xHis-Tag
BG1805	GE Dharmacon	Überexpression <i>ZUO1</i>
pRS304-306	(Sikorski and Hieter, 1989)	Deletionen
pFA6a	(Van Driessche et al., 2005)	Myc-Tag
pRS415	(Sikorski and Hieter, 1989)	Klonierung GCR-Stämme

5.4 Gele, Puffer, Lösungen für Standardmethoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen VWR, Carl Roth sowie Sigma-Aldrich bestellt.

Agarosegel: 1% bzw. 2% Agarose, 1x TBE

TBE (5x): 80 mM Tris-Base, 80 mM Borsäure, 2 mM EDTA pH 8,0

PCR-Puffer (10x): 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM KCl, 1% Triton-X-100, 20 mM MgCl₂, 10 mM β-Mercaptoethanol

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA

Ladepuffer

DNA-Gel (6x): 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin

Proteingel (6x): 300 mM Tris-HCl pH 6.8, 0,1% Bromphenolblau, 15% Glycerin, 6% SDS, 140 mM DTT

Coomassie: 50% Methanol, Essigsäure, 0,1% Coomassie R250

Coomassie-Entfärber: 50% Methanol oder Ethanol, 7% Essigsäure

5.5 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden für 20 min bei 121°C und 1 atm Überdruck autoklaviert. Hitzelabile Zusätze wurden sterilfiltriert und dem Medium nach dem Abkühlen zugesetzt. Flüssigmedium enthielt standardmäßig 2% Glukose als Kohlenstoffquelle, Plattenmedium zusätzlich 2% Agar.

5.5.1 Hefemedien

YPD: 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glukose (bzw. Galaktose, Raffinose)

SC: 0,67% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 0,6% NaOH Pellets, 1% Bernsteinsäure, 2 g Aminosäure-Mix, 2% Glukose

FOA/Can-Platten:

0,67% g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 60 mg/L Canavanin, 0,1% 5-FOA, 1,1 g

GCR Aminosäure-Mix (-Arg, + 50 µg/ml Uracil), 2% Glukose in 250 ml H₂O

Nach Sterilfiltrieren zu autoklaviertem Agar (24 g in 750 ml H₂O) zugeben.

5.5.2 *E. coli*-Medien

LB: 1% Bactopecton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl

Zur Selektion auf Plasmide wurde nach dem Autoklavieren und Abkühlen sterilfiltriertes 100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin oder 30 µg/ml Chloramphenicol zugegeben.

SOC: 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂

5.5.3 Herstellung von Dauerkulturen

Zur Herstellung von Dauerkulturen von Hefe- oder *E. coli*-Stämmen wurden 500 µl einer frischen stationären Kulturen zu 500 µl sterilem 50% Glycerin gegeben und in 1,5 ml-Schraubdeckelgefäßen bei -80°C gelagert.

5.6 Molekularbiologische Standardmethoden

5.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA mittels PCR wurde eine selbst-hergestellte Taq (*Thermo aquaticus*) DNA-Polymerase, Phusion oder *Pfu* eingesetzt. PCR-Produkte wurden mit dem „DNA Clean & Concentrator™-5“-Kit (Zymo Research) oder dem „innuPREP PCRpure Kit“ (Analytik Jena AG) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zur Aufreinigung aus 1% Agarosegelen wurde das „innuPREP Gel Extraction Kit“ (Analytik Jena AG) verwendet.

5.6.2 Klassische Klonierung mittels DNA-Restriktion und DNA-Ligation

Die Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Thermo Fisher Scientific oder NEB) erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde mit 1 µl SAP dephosphoryliert. Der Ligationsansatz enthielt PCR-Produkt in 4-fachen molaren Überschuss im Vergleich zur Plasmid-DNA und T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific) und wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transformation in hitzeschock-kompetente *E. coli*-Zellen erfolgte für 90 sec bei 42°C.

5.6.3 Sequenz- und Ligations-unabhängige Klonierung (*sequence and ligation independent cloning, SLIC*)

SLIC ermöglichte Klonierungen an jede gewünschte Position in einem Plasmid, unabhängig von Restriktionsschnittstellen. Das Plasmid wurde durch PCR linearisiert. Die einzufügende DNA (Oligonukleotide nach Annealing oder PCR-Produkt) überlappte 20 bp mit dem linearen Plasmid an der Integrationsstelle. Sowohl Plasmid als auch Insert wurden auf 100 ng/µl verdünnt, wovon je 30 µl DNA in je einen T4 DNA Polymerase Verdau eingesetzt wurden, um einzelsträngige DNA-Überhänge zu generieren. Diese 60 µl Ansätze enthielten neben 30 µl DNA, 1 µl T4 DNA Polymerase (NEB), 6 µl NEB2 (NEB), 6 µl 10x BSA und 17 µl H₂O. Nach 30 min bei RT wurden 7 µl dCTP zugefügt und die Ansätze auf Eis gestellt. Bei der Annealing-Reaktion wurden 300 ng Plasmid mit Insert im 10 oder 50 molaren Überschuss in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl T4 Ligationspuffer (NEB) und H₂O für 3 min bei 70°C inkubiert und anschließend im ausgeschalteten für 30 bis 40 min abgekühlt. Es wurden 10 µl des Ansatzes in kompetente *E. coli* DH5α transformiert.

5.6.4 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse nach einem modifizierten Protokoll nach (Birnboim and Doly, 1979).

5.6.5 Gerichtete *in vitro* Mutagenese

Mutationen in Plasmid-DNA wurden durch gerichtete *in vitro* Mutagenese eingeführt, nach dem Protokoll von BioTechniques 1999, basierend auf dem „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Agilent Technologies). In dieser Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um G4-Motive gezielt in den G-Tracts zu mutieren.

5.6.6 Kontrolle von klonierten oder mutierten Plasmiden

Klonierte oder mutierte Plasmide wurden mittels Restriktion und Gelelektrophorese überprüft. Alternativ wurden Plasmide von den Firmen GATC oder Eurofins nach der Sanger-Methode sequenziert.

5.7 Biochemische Methoden

5.7.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgte mit dem Mini-Protean Tetra Cell-System (Bio-Rad) in 1x SDS-Laufpuffer nach einem Standardprotokoll (Maniatis et al., 1982). Alternativ zur Coomassie-Färbung wurde dem Trenngel 0,5% 2,2,2-Trichloroethanol (TCE) zugegeben.

5.7.2 Western Blot

Zum spezifischen Protein-Nachweis mit Antikörpern wurden die Proteine mittels *Semi-Dry* Blot nach einem Standardprotokoll auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Protran 0,2 µm, GE Healthcare Life Sciences) transferiert (Maniatis et al., 1982). Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C und mit dem Sekundärantikörper 1 h bei RT. Antikörper waren in 1x NET-Gelatinepuffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7,5,

0,05 % (v/v) Triton-X-100, 0,25 % (w/v) Gelatine, 0,02 % (w/v) Natriumazid) verdünnt. Die Detektion erfolgte mit einer Lösung aus 5 ml Luminol, 0,5 µl Cumarinsäure und 5 µl H₂O₂ für 3 min an einem Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) detektiert. Alternativ zur Luminol-Detektion wurde das Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) nach Herstellerangaben verwendet.

5.7.3 Expression und Aufreinigung von Zuo1

ZUO1 wurde an genomischer DNA aus *S. cerevisiae* mit den Oligonukleotiden SG117

(5'-AAAAAgaattcATGTTTTCTTTACCTACCCTAAC-3') und SG118 (5'-AAAAAagcggccgcTCACACGAAGTAGGACAACAAG-3') amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit EcoRI und NotI geschnitten und in den ebenfalls linearisierten Vektor pET28a ligiert. pET28a-*ZUO1* wurde in *E. coli* DH5α transformiert und durch Sequenzierung der Erfolg der Klonierung überprüft. N-terminal 6xHis-Zuo1 wurde in Rosetta pLysS exprimiert. Für die Expression wurden 1 l LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin and 30 µg/ml Chloramphenicol mit einer Vorkultur von 100 ml angeimpft auf eine OD₆₀₀ von 0,15 und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen der entsprechenden OD₆₀₀, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM Isopropyl β-D-thiogalactosid (IPTG) über Nacht bei 18°C induziert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4°C) geerntet und das Pellet in 30 ml eiskaltem Lysis-Puffer (300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 5 mM Imidazol) resuspendiert. Alternativ wurde das Pellet bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Alle nachfolgenden Aufreinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Für den Zellaufschluss wurde der Homogenisator EmulsiFlex-C5 (Avestin) verwendet. Das Zelllysate wurde zentrifugiert (45 min, 13000 rpm, 4°C, 70 Ti Rotor (Beckman Coulter)) und der Überstand auf eine Ni-NTA-Säule (Qiagen) geladen, dem Protokoll des Herstellers folgend. Nach drei Waschschritten mit jeweils 10 ml Waschpuffer (300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 15 mM Imidazol) (alternativ: Waschpuffer mit steigender Imidazol-Konzentration: 15 mM, 20 mM, 25 mM), wurde das gebundene Protein mit 5 ml Elutionspuffer (300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 250 mM Imidazol) eluiert. Die Fraktionen, die Zuo1 enthielten wurden durch 15% SDS-PAGE und Western Blot (Primärantikörper: anti-His rabbit 1:1000; Sekundärantikörper: goat anti-rabbit 1:5000 (Thermo Fisher Scientific) identifiziert und vereinigt. Der Pufferaustausch mit Puffer ohne Imidazol sowie das Einkonzentrieren des Proteins wurde durch Zentrifugation in einer Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (30 kDa cut-off) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde

nach Bradford gemessen und anhand einer SDS-PAGE mit bekannten Mengen BSA als Standardprotein bestimmt.

5.7.4 Gelfiltration mit Zuo1

Zur Gelfiltration wurde das aufgereinigte und einkonzentrierte Zuo1 (350 µl) auf eine Superdex 200 Säule (GE Healthcare Life Sciences) geladen und mit 48 ml Puffer (300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.5, 10% glycerol, 1 mM DTT) eluiert. Die Flussrate betrug 0,1 ml/min und es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Elution wurde bei 280 nm verfolgt. Als Standardproteine wurden BSA und Aldolase verwendet.

5.7.5 Expression und Aufreinigung von Slx9

SLX9 wurde an genomischer DNA aus *S. cerevisiae* mit den Oligonukleotiden SG304 (5'-AAAAAgaattcATGGTTGCTAAGAAGAGAAACA-3') und SG305 (5'-AAAAAagcggcgcTCATTGTTTTTGCAGCTTGATAA-3') amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit EcoRI und NotI geschnitten und in den ebenfalls linearisierten Vektor pET28a ligiert. pET28a-*SLX9* wurde in *E. coli* DH5α transformiert und durch Sequenzierung der Erfolg der Klonierung überprüft. Die Expression von N-terminal 6xHis-Slx9 in Rosetta pLysS wurde, wie bereits für Zuo1 im Detail beschrieben, mit 1 mM IPTG bei 18°C über Nacht induziert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4°C) geerntet und das Pellet in 40 ml eiskaltem Lysis-Puffer (300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 5 mM Imidazol) resuspendiert. Zur Suspension wurde 1 mg DNase I und die Proteaseinhibitoren L/P (1:1000), AP (1:1000) und AEBSF (1:200) hinzugegeben. Alternativ wurde das Pellet bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Alle nachfolgenden Aufreinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Sonifizierung: 6x 45 sec, 50% Pulsintensität, Output-Kontrolle Stufe 4, dazwischen jeweils 1 min Pause. Das Zelllysate wurde zentrifugiert (1 h, 40.000 rpm, 4°C, 70 Ti Rotor (Beckman Coulter) und der Überstand auf eine Ni-NTA-Säule (Qiagen) geladen, dem Protokoll des Herstellers folgend. Nach fünf Waschschritten mit jeweils 10 ml Waschpuffer (300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 15 mM Imidazol), wurde das gebundene Protein mit 5 ml Elutionspuffer (300 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 300 mM Imidazol) eluiert. Die Fraktionen, die Zuo1 enthielten wurden durch 15% SDS-PAGE und Western Blot (Primärantikörper: anti-His rabbit 1:1000; Sekundärantikörper: goat anti-

rabbit 1:5000 (Thermo Fisher Scientific) identifiziert und vereinigt. Es erfolgte eine Dialyse über Nacht in 5 l Puffer ohne Imidazol. Das Einkonzentrieren des Proteins wurde durch Zentrifugation in Vivaspin 6 Centrifugal Concentrator (10 kDa cut-off) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford gemessen und anhand einer SDS-PAGE mit bekannten Mengen BSA als Standardprotein bestimmt.

5.7.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

5 µg RNA wurden mit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) und Oligo(dT) nach Herstellerangaben revers transkribiert. Für die Synthese von cDNA wurde der SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad) verwendet und durch qPCR in einem CFX96 real-time system (Bio-Rad) analysiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 5.7 aufgelistet. Die Daten wurden mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode analysiert (Livak and Schmittgen, 2001).

5.8 Experimente mit G4-Strukturen *in vitro*

5.8.1 Faltung von G4-Strukturen und Nachweis durch CD Spektroskopie

Oligonukleotide wurden nach dem Protokoll von (Bachrati and Hickson, 2006) mit kleinen Änderungen in G4-Strukturen gefaltet. Die Oligonukleotide wurden in 1 M NaCl auf eine Konzentration von 2 µg/µl verdünnt, 5 min auf 100°C erhitzt und anschließend 48 h bei 60°C inkubiert. Nach Fällung mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 1 Volumen Isopropanol, wurde die DNA im Ausgangsvolumen in H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Die Bildung von G4-Strukturen wurde durch CD Spektroskopie überprüft indem 20 µg DNA in H₂O in einem Volumen von 200 µl bei 20°C zehnmal an einem J-810 Spectropolarimeter (Jasco) im kontinuierlicher Modus (200 - 350 nm) mit Scan-Geschwindigkeit 100 nm/min, Response 0,5 sec, Bandweite 2 nm und Data Pitch 2 nm gemessen wurde (Universität Würzburg).

Alternativ wurden Oligonukleotide in G4-Strukturen gefaltet, indem die DNA in 10 mM Tris und 100 mM KCl (oder NaCl) 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend über Nacht im ausgeschalteten Heizblock abgekühlt wurde.

CD zur Kontrolle der G4-Faltung wurde an einem J-815 Spectropolarimeter (Jasco) durchgeführt, 2 – 5 µM DNA in einem Volumen von 1 ml wurde dreimal im kontinuierlichen

Modus (200 – 350 nm) mit Scan-Geschwindigkeit 200 nm/min, Response 0,5 sec, Bandweite 2 nm und Data Pitch 1 nm gemessen (Universität Groningen).

5.8.2 *Annealing* von Oligonukleotiden

Oligonukleotide zur Herstellung von dsDNA, *bubble*, *fork* und *4-fork* wurden in Annealing-Puffer (50 mM HEPES, 2 mM MgAc, 100 mM KAc) für 1 min bei 98°C, 60 min bei 37°C und 30 min bei 22°C inkubiert (Mohagheh et al., 2001).

5.8.3 Radioaktive 5'-Endmarkierung von DNA-Strukturen

DNA-Strukturen wurden mit illustra MicroSpin G-25 Columns (GE Healthcare) entsalzt und 20 pmol DNA am 5'-Ende mit 25 μCi [γ - ^{32}P] ATP durch T4 Polynukleotidkinase (NEB) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert. G4-Strukturen sowie G4_{mut} wurden aus einem nativen 7% Polyacrylamidgel eluiert, Kontroll-DNA-Strukturen wurden durch illustra MicroSpin G-25 Columns (GE Healthcare) aufgereinigt.

5.8.4 EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*)

Steigende Konzentrationen Zuo1 (0 bis 200 μM) wurden mit 10 nM radioaktiv markierter DNA (Endkonzentration) wie in (Paeschke et al., 2005) beschrieben für 30 min auf Eis inkubiert und in einem 7% nativen Polyacrylamidgel 20 min bei 200 V aufgetrennt. Das Gel wurde auf Whatman-Papier getrocknet und die Banden nach 60 min im *Phosphor-Imager-Screen* (Imaging Plate, Fuji Film) an einem Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare Life Sciences) sichtbar gemacht.

5.8.5 Doppel-Filterbindungsassay

Der Doppel-Filterbindungsassay nach (Wong and Lohman, 1993) wurde mit einer „96-well Bio-Dot SF“ Apparatur (Bio-Rad) durchgeführt. 10 μl Ansätze wie bei der Durchführung eines EMSA beschrieben, mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (Zuo1: 0 – 20 μM ; Slx9:) wurden nach der Inkubation auf Eis durch eine Nitrocellulose-Membran und eine Hybond-Membran gefiltert und die Membranen dreimal mit 1x Bindepuffer gewaschen. Nach dem Trocknen der Membranen wurde 30 min ein Phosphor-Imager-Screen (Imaging Plate, Fuji Film) aufgelegt und die Signale am Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare Life Sciences) sichtbar gemacht. Die Prozentwerte von gebundenem Protein an die Membranen wurde mit ImageQuant bestimmt

und zur Berechnung einer Dissoziationskonstanten (K_d) durch GraphPad Prism6 (*curve fitting, nonlinear regression*) verwendet.

5.8.6 Schmelzkurve

Messungen der Schmelztemperatur von G4-Strukturen (in KCl-Puffer gefaltet) wurden an einem V-670 Spektrophotometer (Jasco) in einem Temperaturgradient von 15°C bis 95°C durchgeführt und die Absorption bei 295 nm verfolgt. Die Temperatur wurde 0,25°C/min sowie 0,5°C/min erhöht. Um Luftblasen zu entfernen, wurde die DNA in der Küvette auf 50°C erhitzt. Anhand dieser Schmelzkurve kann nach Zugabe von Zuo1 zu der abgekühlten DNA erkannt werden, ob sich die Schmelztemperatur verändert. Interkalierende Proteine, die die DNA-Struktur stabilisieren, führen zu einer höheren Schmelztemperatur.

5.8.7 CD Titration

Für CD Titrationsexperimente wurde aufgereinigtes Zuo1 in fünffachem Überschuss und fünffachem Defizit mit gefalteten G4-Strukturen für 30 min auf Eis inkubiert und an einem J-815 Spektropolarimeter (Jasco) ein CD Spektrum aufgenommen (Parameter siehe Abschnitt 5.9.1). Als Negativkontrollen wurde Puffer (100 mM KCl, 10 mM Tris) ohne DNA und G4_{mut} verwendet.

5.9 Arbeitstechniken mit Hefe

5.9.1 Isolierung chromosomaler DNA

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe wurden 10 ml einer stationären Kultur durch Zentrifugation (5 min, 1500 rpm) geerntet, das Pellet mit 1 ml H₂O gewaschen und in 200 µl Extraktionspuffer (0,5 M NaCl, 0,2 M Tris-HCl pH 7,6, 0,01 M EDTA, 1% SDS) resuspendiert. Um die Lyse zu unterstützen wurden die Zellen kurz in flüssigem Stickstoff gefroren und wieder aufgetaut. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss durch Glasperlen 1 min in der FastPrep-24 (MP). Die Glasperlen wurden durch Zentrifugation (1 min, 1000 rpm) abgetrennt und mit dem Lysat wurde zuerst eine Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) durchgeführt, gefolgt von einer Ethanol-Fällung. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol wurde das getrocknete Pellet in 50 µl TE resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Alternativ wurde das „Epicentre Masterpure yeast genomic DNA Purification Kit“ nach Herstellerangaben verwendet.

5.9.2 Plasmidisolierung aus Hefe

Um Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* zu isolieren, wurden 1,5 ml einer stationären Kultur durch Zentrifugation (10 sec, 14000 rpm) geerntet und das Pellet in 200 µl DNA-Lysis-Puffer (2% Triton-X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,1, 1 mM EDTA) resuspendiert. Alle nachfolgenden Schritte entsprachen dem Protokoll zur Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe. Die DNA wurde in 30 µl TE resuspendiert.

5.9.3 Transformation von Hefe

Die Transformation von DNA in *S. cerevisiae* erfolgt mit der Lithium-Acetat-Methode (Schiestl and Gietz, 1989)

5.9.4 Isolierung von RNA

RNA aus *S. cerevisiae* wurde mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche). Mit einer stationären Kultur wurde 5 ml Medium auf eine OD600 von 0,25 inokuliert und bis zu einer OD600 von 0,8 bei 30°C geschüttelt. 10^8 Zellen in log-Phase wurden durch Zentrifugation geerntet. Zur Berechnung der Zellzahl wurde $1 \text{ OD600} = 2,4 \times 10^7$ Zellen/ml berücksichtigt. Das Pellet wurde in 200 µl Extraktionspuffer (0,5 M NaCl, 0,2 M Tris-HCl pH 7,6, 0,01 M EDTA, 1% SDS) resuspendiert und der Zellaufschluss erfolgte mit Glasperlen für 1 min in der FastPrep-24 (MP). Die Glasperlen wurden durch Zentrifugation (1 min, 1000 rpm) abgetrennt. Die weiteren Schritte entsprachen dem Protokoll des Herstellers. Die RNA wurde mit 50 µl H₂O eluiert, 1 µg auf einem 1% Agarosegel kontrolliert und bei -80°C gelagert.

5.9.5 Yeast One-Hybrid System (Y1H)

Herstellung des Screening-Stamms

Zur Detektion von DNA-Protein-Interaktionen wurde das „Matchmaker Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System“ (Clontech) verwendet. Nach Herstellerangaben wurde der gewünschte Screening-Stamm hergestellt, indem die *bait*-Sequenz (G4 und mutiertes G4) in das Plasmid pAbAi kloniert und das mit BstBI linearisierte Plasmid durch homologe

Rekombination in das Genom des *S. cerevisiae*-Stamms Y1HGold integriert wurde. Der Erfolg dieser Transformation wurde durch *single colony*-PCR mit dem „Matchmaker Insert Check PCR Mix 1“ (Clontech) nach dem Protokoll des Herstellers überprüft. Zum Testen, welche Aureobasidin A (AbA)-Konzentration im Screening verwendet werden muss, wurden Spotttests durchgeführt. Eine Kolonie wurde in 400 µl sterilem H₂O resuspendiert und vier serielle 1:5 Verdünnungen hergestellt. 5 µl dieser Verdünnungen wurden auf verschiedene Platten SC-ura mit 100, 150, 200, 500 und 1000 ng/ml AbA pipettiert und bei 30°C inkubiert. Zur genaueren AbA-Konzentrations-Bestimmung wurden gegebenenfalls noch weitere AbA-Konzentrationen getestet. Die Platte, auf der kein Wachstum mehr stattfindet, enthielt die AbA-Konzentration, die in einem Screening mit diesem Stamm eingesetzt werden sollte.

Herstellung einer *S. cerevisiae* cDNA Bibliothek

Wie im Protokoll des Herstellers beschrieben wurde eine *S. cerevisiae* cDNA Bibliothek hergestellt. RNA aus W303 Wildtyp-Zellen wurde isoliert und 1,6 µg RNA zur Herstellung einzelsträngiger cDNA mit Oligo-dT verwendet. Diese wurde durch PCR amplifiziert, dabei wurde Pfu_{nd}s DNA Polymerase (Genaxxon) verwendet. Wegen zu starker Verluste wurde die cDNA nicht wie im Protokoll angegeben über Gelfiltrationssäulen (CHROMA SPIN+TE-400, Clontech) aufgereinigt. Verschiedene Abänderungen des Protokolls und Unterstützung durch Clontech (Einsatz verschiedener Mengen RNA, ReproFast DNA Polymerase, mehr PCR-Zyklen, Vereinigung mehrerer Ansätze) haben die Ausbeute an cDNA Bibliothek leider nicht erhöht.

Screening

Das erste Y1H-Screening wurde mit 5 µg (nicht über Gelfiltrationssäulen aufgereinigter) selbsthergestellter *S. cerevisiae* cDNA Bibliothek nach dem Protokoll des Herstellers für „Library scale“ Transformationen durchgeführt. Die *S. cerevisiae* cDNA Bibliothek wurde in den Stamm SG46 (G4_{ix}) transformiert. Als Positivkontrolle wurde eine „Small scale“-Transformation eines p53-Fragments in SG22 (Y1HGold[53/AbAi]) durchgeführt. Zum Ausplattieren wurden 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 Verdünnungen in H₂O hergestellt. Die Kontrolle wurde auf SC-leu und SC-leu + 200 ng/ml AbA plattiert, der Screening-Stamm SG46 auf SC-leu und SC-leu + 100 ng/ml AbA. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert. Wenn auf AbA-Platten nach fünf Tagen noch keine Kolonien gewachsen waren, wurden diese Platten zwei weitere Tage inkubiert. Anhand der Koloniezahlen wurde die Anzahl *gescreeenter* Klone berechnet. Von den restlichen 15 ml der Large-scale Transformation wurden je 150 µl auf 150 mm Platten SC-leu + 100 ng/ml AbA ausplattiert.

Da die Herstellung einer *S. cerevisiae* cDNA Bibliothek nicht die gewünschte Ausbeute lieferte und daher statt mindestens einer Million Klone, nur 300.000 bis 860.000 *gescreent* wurden, wurde für zwei weitere Screenings die „*S. cerevisiae* DUALhybrid cDNA library P12108“ (Dualsystems Biotech, Vertrieb durch Biozol) verwendet. Für die Large-scale Transformation wurden nach dem Protokoll zur Library Transformation (DUALhybrid Kit) 7 µg cDNA Bibliothek in den Stamm SG46 (G4_{IX}) transformiert und je 300 µl auf 150 mm Platten SC-leu + 100 ng/ml AbA + 5 bzw. 10 mM HU ausplattiert, bis die 4,5 ml verbraucht waren. Zusätzlich wurden 1:100, 1:1000 und 1:10.000 Verdünnungen auf SC-leu + HU plattiert. Die Platten wurden bis zu sechs Tage bei 30°C inkubiert.

Auswertung

Alle Klone auf den Screening-Platten wurden jeweils zweimal frisch auf SC-leu + 100 ng/ml AbA (+ 5 bzw. 10 mM HU) ausgestrichen bis schließlich das Plasmid isoliert, in *E. coli* XL-1 Blue transformiert und durch alkalische Lyse isoliert wurde. Die Plasmide wurden mit dem Oligonukleotid 5'-ACCACTACAATGGATGATG-3' (Sequenz von Dualsystems Biotech) sequenziert um herauszufinden, welches Protein am Screening an G4_{IX} gebunden hatte.

Retransformation

Zur Kontrolle der Interaktion mit G4_{IX} wurden ausgewählte Plasmide in den Screening-Stamm SG46 (G4_{IX}) nach dem Protokoll für Small-scale Transformationen (Clontech) retransformiert und auf SC-leu und SC-leu + AbA (+HU) ausplattiert. Zusätzlich wurden die Kontroll-Stämme SG101 (G4_{mut}; 400 ng/ml AbA) und SG948 (G4_{IX} auf komplementären Strang; 100 ng/ml AbA) verwendet.

5.9.6 Wachstumskurve

Stationäre Kulturen wurden verwendet, um 20 ml Medium auf eine Start-OD600 von 0,15 anzuimpfen und bei 30°C zu inkubieren. Nach 90 min und danach alle 60 min wurde die OD600 gemessen und notiert, bis die Kultur eine OD600 von 1 erreicht hatte. Wachstumskurven wurden in Triplikaten erstellt. Anhand der OD600 zu zwei Zeitpunkten in der log-Phase wurde die Verdopplungszeit berechnet. Um die Stabilität von G4-Strukturen zu beeinflussen wurde dem Medium 10 µM Phen-DC3, 50 µM HU oder 0,01% MMS zugefügt.

Zur Überexpression von *ZUO1* wurde das Plasmid BG1805 (Yeast ORF Collection, Dharmacon) in die Hefestämme transformiert und dem Medium 2% Galaktose statt Glukose zugefügt.

5.9.7 Spotttest

Mit einer stationären Hefe-Kultur wurde das Medium auf eine OD600 von 0,15 inokuliert und bei 30°C inkubiert, bis eine OD600 von 0,8 erreicht war. Alle Kulturen wurden auf exakt auf OD600 = 0,8 verdünnt und eine Verdünnungsreihe mit sechs 1:5-Verdünnungen in einer sterilen 96-well-Platte erstellt. Von jeder Verdünnungen wurden 3 oder 5 µl auf eine Platte getropft und nach Trocknen bei 30°C inkubiert. Nach 2 Tagen wurde das Wachstum kontrolliert und die Platten gescannt.

5.9.8 Synchronisation

Arrest in der G1-Phase

Hefezellen wurden ähnlich wie bei (Azvolinsky et al., 2006) beschrieben, in der G1-Phase arretiert. Den 15 ml Kulturen (Zellen haben keine Deletion $\Delta bar1$) wurde bei einer OD600 von 0,15 α -Faktor (5 µg/ml Endkonzentration; Genskript) zugegeben und bei 24°C inkubiert. Nach 60 min erfolgte erneut eine Zugabe von derselben Menge α -Faktor. Nach 3,5 h Wachstum wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob mindestens 80% der Zellen "shmoo" gebildet hatten, so dass ein Teil der Kultur weiterhandelt werden konnte, um den Arrest in der G1-Phase durch FACS zu bestätigen. 3,5 ml Kultur wurde mit 0,75 ml Buffer (200 µl 10% Na_3 + 6,5 ml 0,5 M EDTA) versetzt und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Weitere 10 ml Kultur wurden zur Proteinisolierung mittels TCA verwendet.

Arrest in der S- und G2-Phase

Um Hefezellen in der S- oder G2-Phase zu arretieren wurde das Protokoll von (Amberg et al., 2005) modifiziert. Hefezellen wurden bis zu einer OD600 von 0,4 inkubiert und für den S-Phase-Arrest 0,2 M HU zugefügt bzw. 15 µg/ml Nocodazol (gelöst in DMSO) für den Arrest in der G2-Phase. Die Kulturen wurden für 3,5 h bei 30°C inkubiert und 3,5 ml wurden für die Kontrolle mittels FACS (siehe oben) verwendet sowie 5 ml zur Proteinisolierung durch TCA.

FACS Analyse (modifiziertes Protokoll von Boris Pfander)

1-2 x 10⁷ Zellen wurden durch Zentrifugation (3 min, 4000 rpm) geerntet und mit 1 ml 70% Ethanol + 50 mM Tris-HCl pH 7,8 sowie in 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,8 jeweils einmal gewaschen. Das Pellet wurde in 520 µl RNase-Lösung (500 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 µl RNase A (10 mg/ml)) resuspendiert und für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (3 min, 13000 rpm) wurde das Pellet in 220 µl Proteinase K-Lösung (200 µl 50

mM Tris-HCl pH 7,8, 20 µl Proteinase K (10 mg/ml)) resuspendiert und für 1,5 h bei 50°C inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (3 min, 13000 rpm) und das Pellet in 500 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,8 resuspendiert. Als nächstes erfolgte der Zellaufschluss durch Sonifizierung an einem Branson sonifier W250-D mit 30% Amplitude und 50% Duty Cycle (1 sec Puls, 1 sec Pause). 200 µl wurden mit 1 ml SYTOX-Lösung (1,5 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,5 µl SYTOX Green (Thermo Fisher Scientific)) gemischt und an einem FACS Canto II (Becton Dickinson) mit folgenden Parametern gemessen: FSC log 200 V, SSC log 300 V, GFP lin 416 V, FSC threshold 5000, hohe Flussrate, Aufzeichnung von 10.000 *events*.

5.9.9 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

ChIP-Experimente wurden wie in (Azvolinsky et al., 2006) beschrieben, durchgeführt. Zur Fixierung von DNA-Protein-Interaktionen wurde zu 50 ml Kultur bei einer OD600 von 0,5 1% Formaldehyd (Endkonzentration) zugegeben und für exakt 5 min bei 25°C und 160 rpm inkubiert, bevor Glycin zu einer Endkonzentration von 125 mM zugefügt und ebenfalls 5 min bei 25°C und 160 rpm inkubiert wurde. Bei den nachfolgenden Schritten wurden die Zellen stets auf Eis gehalten und auf 4°C gekühlte Puffer verwendet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3 min, 3000 rpm, 4°C) geerntet, zuerst mit 30 ml HBS-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5, 140 mM NaCl), dann mit 20 ml ChIP-Lyse-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 0, 1% IGEPAL CA-630, 0,1% Natrium-Deoxycholat) gewaschen. Das Pellet wurde in 400 µl ChIP-Lyse-Puffer mit 1 mM PMSF resuspendiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Der Zellaufschluss der aufgetauten Proben erfolgte nach Zugabe von Glasperlen in der FastPrep-24 (MP) für 1 min, 5 min Inkubation auf Eis und erneut 30 sec in der FastPrep. Nach Abtrennung der Glasperlen durch Zentrifugation (1 min, 1000 rpm) wurden die Zellen zentrifugiert (20 min, Maximalgeschwindigkeit, 4°C) und vorsichtig der Überstand entfernt. Das Pellet inklusive fixierter DNA als oberste Schicht wurde in 500 µl ChIP-Lyse-Puffer resuspendiert. Um die DNA in Stücke von 500 bis 1000 bp zu zerkleinern, wurden die Proben mit einem Branson sonifier W250-D (50% Amplitude, 50% Duty Cycle (1 sec Puls, 1 sec Pause) mit fünfmal fünf Pulsen sonifiziert und dazwischen jeweils 4 min auf Eis gehalten. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 10000 g, 4°C) wurde der Überstand in silikonisierte 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Vom Überstand wurden 5 µl als Input-Probe und 10 µl als Kontrolle für Western Blot entnommen. Der restliche Überstand wurde mit 8 µl c-Myc Antikörper (1 mg/ml, Clontech) für 1 h bei 4°C und anschließend mit 80 µl Dynabeads Protein G (Invitrogen) für 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Die Dynabeads wurden vor Benutzung

zweimal mit ChIP-Lyse-Puffer gewaschen. Die nächsten Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit Hilfe eines Magnetständers wurden die Dynabeads gesammelt und der Überstand entfernt. Die Proben wurden exakt 4 min mit jeweils 1 ml verschiedener Puffer in der folgenden Reihenfolge gewaschen: Zweimal mit SDS-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,025% SDS), einmal mit Hi-Salt-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5, 1 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0) und einmal mit T/L-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0, 1,06% LiCl, 0,5% Natrium-Deoxycholat, 0,5% IGEPAL-CA 630). Beim zweimaligen Waschen mit je 1 ml T/E-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA pH 8,0) war die Zeit irrelevant. Die Dynabeads wurden in 135 µl TE + 1% SDS durch Vortexen, 2 min Inkubation bei 65°C, Vortexen schließlich im Magnetständer abgetrennt und 120 µl des Überstandes wurden als ChIP-Probe 8-16 h bei 65°C inkubiert. Zu den 5 µl Input-Proben wurde 115 µl TE + 1% SDS zugegeben und wie die ChIP-Proben inkubiert. 10 µl des Überstands wurden als Western Blot Eluat-Probe entnommen und zusammen mit den Western Blot Input-Proben jeweils in 1x SDS-Ladepuffer für 30 min bei 95°C inkubiert. Durch SDS-PAGE und Western Blot wurde kontrolliert, ob das Protein während der Versuchsdurchführung abgebaut wurde oder stabil war. Zu den 5 µl Input-Proben wurde 115 µl TE + 1% SDS zugegeben und wie die ChIP-Proben inkubiert. Nach der Inkubation wurde die DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Für die Analyse der DNA wurde qPCR an einem CFX96™ Cycloer (Bio-Rad) und unter Verwendung des SYBR Green (Bio-Rad) mit folgendem Programm durchgeführt: 98°C 3 min, 40 Zyklen 98°C 30 sec, 55°C 30 sec und 60°C 30 sec, gefolgt von einer Schmelzkurve (65 - 95°C).

5.9.10 Gross chromosomal rearrangement Assay (GCR)

Der GCR-Assay wurde mit Änderungen wie in (Putnam and Kolodner, 2010) publiziert, durchgeführt. Jeweils sieben Kolonien pro Stamm wurden verwendet, um YPD anzupflanzen und für 48 h bei 30°C zu inkubieren. Von jeder Kultur wurde eine Verdünnung von 1×10^{-7} auf YPD ausplattiert und nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die Kolonien gezählt. Außerdem wurden 1,5 ml pro Kultur zentrifugiert, das Pellet in H₂O resuspendiert und die Zellen auf Selektionsmedium ohne Uracil und Arginin, aber mit 0,9 g/l 5-FOA und 60 mg/l Canavanin (Santa Cruz). Nach 7 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die Kolonien gezählt. Um die GCR-Rate zu berechnen wurden Fluktuationsanalysen mit dem FALCOR Web-Server und der MMS Maximum Likelihood Methode (Hall et al., 2009), normalisiert zur Wildtyp-GCR-Rate von 10^{-9} GCR-Events pro Zellteilung, durchgeführt.

5.10 Genomweite Untersuchungen

5.10.1 ChIP-Seq

ChIP-Seq wurde prinzipiell wie ein konventionelles ChIP-Experiment durchgeführt, allerdings in einem größeren Maßstab und einigen Änderungen. Die Fixierung mit Formaldehyd wurde in 700 ml Kultur durchgeführt. Bei den Waschschrritten wurden 700 ml HBS und 200 ml ChIP-Lyse-Puffer verwendet. Das Pellet wurde in 2x 500 µl ChIP-Lyse-Puffer mit 0,1 M PMSF resuspendiert und je Stamm auf sechs Schraubdeckelgefäße verteilt. Nach dem Zellaufschluss wurde das Pellet in 900 µl ChIP-Lysis-Puffer mit 1 µg/ml LP, 1 µg/ml AP, 0.5 mM AEBSF and 1% 0.1 M PMSF resuspendiert. Zur Fragmentierung der DNA wurde die S220 Covaris mit folgenden Einstellungen verwendet: 140 Watt, 5% Duty Factor, 200 *cycles per burst*, 20 min, 4°C. Die Proben wurde mit ChIP-Lyse-Puffer auf 1,4 ml aufgefüllt und 15 min bei 10.000 g zentrifugiert. Anschließend wurden vom Überstand 15 µl als Input-Probe, 10 µl als Input-Kontrolle für Western Blot und 20 µl als DNA-Probe entnommen. Die DNA-Probe diente dazu, die Fragmentierung der DNA auf einem Agarosegel zu überprüfen. Der restliche Überstand wurde mit 60 µl c-Myc Antikörper (1 mg/ml, Clontech) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Input-Probe wurde mit 345 µl TE + 1% SDS versetzt und maximal 16 h bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Input-Probe mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Dafür wurde die Probe gedrittelt, mit je 5 Volumen Binde-Puffer gemixt, auf die Säulen geladen und zentrifugiert (1 min, 2348 g). Die Säulen wurden zuerst mit 500 µl Waschpuffer, dann mit 750 µl gewaschen. Vor der Zentrifugation (30 sec, 13000 rpm) wurden die mit Waschpuffer gefüllten Säulen jeweils 5 min bei RT stehen gelassen. Die leere Säule wurde 2 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Die DNA wurde mit 2x 40 µl H₂O (1 min Inkubation bei RT, 13.000 rpm, 1 min) eluiert.

Der ChIP-Probe wurden 400 µl mit ChIP-Lyse-Puffer äquilibrierte Dynabeads Protein G (Invitrogen) zugefügt und für 4 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Probe in vier Gefäße verteilt und dem Protokoll bei 5.9.9 folgend gewaschen. Die Dynabeads wurden in 145 µl TE + 1% SDS durch Vortexen, 2 min Inkubation bei 65°C, Vortexen schließlich im Magnetständer abgetrennt und 120 µl des Überstandes wurden als ChIP-Probe 8-16 h bei 65°C inkubiert. 10 µl des Überstands wurden als Western Blot Eluat-Probe entnommen und zusammen mit den Western Blot Input-Proben wie bei 5.9.9 beschrieben behandelt und für SDS-PAGE und Western Blot verwendet.

Die ChIP-Proben wurden wie die Input-Proben mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit 2x 30 µl H₂O eluiert. Die Konzentration von Input- und ChIP-Proben wurde mit Qubit (Thermo Fisher Scientific) gemessen. 8 ng Input-DNA und die komplette ChIP-DNA wurde zur Herstellung der Bibliothek mit dem NEBNext ChIP-Seq Library Prep Master Mix Set for Illumina (NEB) verwendet. Anders als im Protokoll des Herstellers empfohlen wurden die Aufreinigungen statt mit AMPure XP Beads (Beckman Coulter, Inc.) mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) durchgeführt. Nach der Adaptor-Ligation wurden die aufgereinigten Proben auf einem 2% Agarose E-Gel EX (Thermo Fisher Scientific) aufgetrennt, die DNA-Fragmente mit einer Größe von 300 – 500 bp ausgeschnitten und mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die DNA wurde durch PCR wie im Protokoll angegeben amplifiziert und mit einem nur für diese Proben verwendeten MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Da das Ergebnis des Bioanalyzer nicht zufriedenstellend war, wurden die Proben zusätzlich mit AMPure XP Beads aufgereinigt. Nach Messung am Qubit wurden die Proben am Bioanalyzer analysiert und äquimolare Pools hergestellt, die an einem xy sequenziert von Jorn Staal (ERIBA) sequenziert wurden.

Das Alignment der Reads zum Hefe-Referenzgenom SACCER3 wurde von Stefan Juranek (ERIBA) vorgenommen.

5.10.2 Microarray

RNA von Wildtyp, *Δzuo1*, *Δsgs1* und *Δzuo1Δsgs1* wurde isoliert und der Microarray wurde nach dem Protokoll für One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Agilent) von Michael Walter (Agilent Technologies) durchgeführt.

6. Literaturverzeichnis

- Aboul-ela, F., Murchie, A.I., and Lilley, D.M. (1992). NMR study of parallel-stranded tetraplex formation by the hexadeoxynucleotide d(TG4T). *Nature* *360*, 280-282.
- Aboul-ela, F., Murchie, A.I., Norman, D.G., and Lilley, D.M. (1994). Solution structure of a parallel-stranded tetraplex formed by d(TG4T) in the presence of sodium ions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of molecular biology* *243*, 458-471.
- Agarwal, T., Roy, S., Kumar, S., Chakraborty, T.K., and Maiti, S. (2014). In the sense of transcription regulation by G-quadruplexes: asymmetric effects in sense and antisense strands. *Biochemistry* *53*, 3711-3718.
- Agarwala, P., Pandey, S., and Maiti, S. (2015). The tale of RNA G-quadruplex. *Organic & biomolecular chemistry* *13*, 5570-5585.
- Aguilera, A., and Gomez-Gonzalez, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature reviews. Genetics* *9*, 204-217.
- Albanese, V., Reissmann, S., and Frydman, J. (2010). A ribosome-anchored chaperone network that facilitates eukaryotic ribosome biogenesis. *J Cell Biol* *189*, 69-81.
- Albanese, V., Yam, A.Y., Baughman, J., Parnot, C., and Frydman, J. (2006). Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* *124*, 75-88.
- Amberg, D.C., Burke, D., and Strathern, J.N. (2005). *Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Arora, A., and Maiti, S. (2009). Differential biophysical behavior of human telomeric RNA and DNA quadruplex. *The journal of physical chemistry. B* *113*, 10515-10520.
- Arthanari, H., Basu, S., Kawano, T.L., and Bolton, P.H. (1998). Fluorescent dyes specific for quadruplex DNA. *Nucleic acids research* *26*, 3724-3728.
- Azvolinsky, A., Dunaway, S., Torres, J.Z., Bessler, J.B., and Zakian, V.A. (2006). The *S. cerevisiae* Rrm3p DNA helicase moves with the replication fork and affects replication of all yeast chromosomes. *Genes & development* *20*, 3104-3116.
- Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriantuli, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* *318*, 798-801.
- Bachrati, C.Z., and Hickson, I.D. (2006). Analysis of the DNA unwinding activity of RecQ family helicases. *Methods in enzymology* *409*, 86-100.
- Balasubramanian, S., Hurley, L.H., and Neidle, S. (2011). Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nature reviews. Drug discovery* *10*, 261-275.
- Bang, I. (1910). Untersuchungen über die Guanylsäure. *Biochem. Z.* *26*, 293-311.

- Bates, P.J., Kahlon, J.B., Thomas, S.D., Trent, J.O., and Miller, D.M. (1999). Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *The Journal of biological chemistry* *274*, 26369-26377.
- Bax, R., Raue, H.A., and Vos, J.C. (2006). Slx9p facilitates efficient ITS1 processing of pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* *12*, 2005-2013.
- Beaume, N., Pathak, R., Yadav, V.K., Kota, S., Misra, H.S., Gautam, H.K., and Chowdhury, S. (2013). Genome-wide study predicts promoter-G4 DNA motifs regulate selective functions in bacteria: radioresistance of *D. radiodurans* involves G4 DNA-mediated regulation. *Nucleic acids research* *41*, 76-89.
- Bedrat, A., Lacroix, L., and Mergny, J.L. (2016). Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. *Nucleic acids research* *44*, 1746-1759.
- Berberich, S.J., and Postel, E.H. (1995). PuF/NM23-H2/NDPK-B transactivates a human c-myc promoter-CAT gene via a functional nuclease hypersensitive element. *Oncogene* *10*, 2343-2347.
- Bergink, S., Salomons, F.A., Hoogstraten, D., Groothuis, T.A., de Waard, H., Wu, J., Yuan, L., Citterio, E., Houtsmuller, A.B., Neefjes, J., *et al.* (2006). DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes & development* *20*, 1343-1352.
- Bernstein, K.A., Gangloff, S., and Rothstein, R. (2010). The RecQ DNA helicases in DNA repair. *Annual review of genetics* *44*, 393-417.
- Bhasikuttan, A.C., and Mohanty, J. (2015). Targeting G-quadruplex structures with extrinsic fluorogenic dyes: promising fluorescence sensors. *Chemical communications* *51*, 7581-7597.
- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., and Topisirovic, I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* *14*, 261-278.
- Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., and Balasubramanian, S. (2013). Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nat Chem* *5*, 182-186.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* *7*, 1513-1523.
- Bochman, M.L., Paeschke, K., and Zakian, V.A. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature reviews. Genetics*.
- Bouaziz, S., Kettani, A., and Patel, D.J. (1998). A K cation-induced conformational switch within a loop spanning segment of a DNA quadruplex containing G-G-G-C repeats. *Journal of molecular biology* *282*, 637-652.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* *14*, 115-132.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nature reviews. Molecular cell biology* *11*, 208-219.

- Brazda, V., Haronikova, L., Liao, J.C., and Fojta, M. (2014). DNA and RNA quadruplex-binding proteins. *International journal of molecular sciences* *15*, 17493-17517.
- Brooks, T.A., and Hurley, L.H. (2010). Targeting MYC Expression through G-Quadruplexes. *Genes Cancer* *1*, 641-649.
- Brooks, T.A., Kendrick, S., and Hurley, L. (2010). Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters. *The FEBS journal* *277*, 3459-3469.
- Brosh, R.M., Jr. (2013). DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. *Nature reviews. Cancer* *13*, 542-558.
- Brys, A., and Maizels, N. (1994). LR1 regulates c-myc transcription in B-cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 4915-4919.
- Buser, R., Kellner, V., Melnik, A., Wilson-Zbinden, C., Schellhaas, R., Kastner, L., Piwko, W., Dees, M., Picotti, P., Maric, M., *et al.* (2016). The Replisome-Coupled E3 Ubiquitin Ligase Rtt101Mms22 Counteracts Mrc1 Function to Tolerate Genotoxic Stress. *PLoS genetics* *12*, e1005843.
- Cammas, A., and Millevoi, S. (2016). RNA G-quadruplexes: emerging mechanisms in disease. *Nucleic acids research*.
- Capra, J.A., Paeschke, K., Singh, M., and Zakian, V.A. (2010). G-quadruplex DNA sequences are evolutionarily conserved and associated with distinct genomic features in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Comput Biol* *6*, e1000861.
- Chambers, V.S., Marsico, G., Boutell, J.M., Di Antonio, M., Smith, G.P., and Balasubramanian, S. (2015). High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nat Biotechnol* *33*, 877-881.
- Chen, C., and Kolodner, R.D. (1999). Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nature genetics* *23*, 81-85.
- Chen, D.H., Huang, Y., Liu, C., Ruan, Y., and Shen, W.H. (2014). Functional conservation and divergence of J-domain-containing ZUO1/ZRF orthologs throughout evolution. *Planta* *239*, 1159-1173.
- Chen, W., Bucaria, J., Band, D.A., Sutton, A., and Sternglanz, R. (2003). Enp1, a yeast protein associated with U3 and U14 snoRNAs, is required for pre-rRNA processing and 40S subunit synthesis. *Nucleic acids research* *31*, 690-699.
- Cheung, I., Schertzer, M., Rose, A., and Lansdorp, P.M. (2002). Disruption of dog-1 in *Caenorhabditis elegans* triggers deletions upstream of guanine-rich DNA. *Nature genetics* *31*, 405-409.
- Chung, W.J., Heddi, B., Hamon, F., Teulade-Fichou, M.P., and Phan, A.T. (2014). Solution structure of a G-quadruplex bound to the bisquinolinium compound Phen-DC(3). *Angewandte Chemie* *53*, 999-1002.

- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell* *40*, 179-204.
- Clarke, D.J., Segal, M., Jensen, S., and Reed, S.I. (2001). Mec1p regulates Pds1p levels in S phase: complex coordination of DNA replication and mitosis. *Nature cell biology* *3*, 619-627.
- Coin, F., Oksenychn, V., and Egly, J.M. (2007). Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Molecular cell* *26*, 245-256.
- Compe, E., and Egly, J.M. (2016). Nucleotide Excision Repair and Transcriptional Regulation: TFIIH and Beyond. *Annual review of biochemistry* *85*, 265-290.
- De Cian, A., Cristofari, G., Reichenbach, P., De Lemos, E., Monchaud, D., Teulade-Fichou, M.P., Shin-Ya, K., Lacroix, L., Lingner, J., and Mergny, J.L. (2007a). Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 17347-17352.
- De Cian, A., Delemos, E., Mergny, J.L., Teulade-Fichou, M.P., and Monchaud, D. (2007b). Highly efficient G-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds. *Journal of the American Chemical Society* *129*, 1856-1857.
- de Laat, W.L., Jaspers, N.G., and Hoeijmakers, J.H. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & development* *13*, 768-785.
- Dempsey, L.A., Sun, H., Hanakahi, L.A., and Maizels, N. (1999). G4 DNA binding by LR1 and its subunits, nucleolin and hnRNP D, A role for G-G pairing in immunoglobulin switch recombination. *The Journal of biological chemistry* *274*, 1066-1071.
- Deng, H., and Braunlin, W.H. (1995). Duplex to quadruplex equilibrium of the self-complementary oligonucleotide d(GGGGCCCC). *Biopolymers* *35*, 677-681.
- Dillingham, M.S. (2011). Superfamily I helicases as modular components of DNA-processing machines. *Biochemical Society transactions* *39*, 413-423.
- Du, Z., Kong, P., Gao, Y., and Li, N. (2007). Enrichment of G4 DNA motif in transcriptional regulatory region of chicken genome. *Biochemical and biophysical research communications* *354*, 1067-1070.
- Ducett, J.K., Peterson, F.C., Hoover, L.A., Prunuske, A.J., Volkman, B.F., and Craig, E.A. (2013). Unfolding of the C-terminal domain of the J-protein Zuo1 releases autoinhibition and activates Pdr1-dependent transcription. *Journal of molecular biology* *425*, 19-31.
- Eddy, J., and Maizels, N. (2006). Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucleic acids research* *34*, 3887-3896.
- Eisenman, H.C., and Craig, E.A. (2004). Activation of pleiotropic drug resistance by the J-protein and Hsp70-related proteins, Zuo1 and Ssz1. *Mol Microbiol* *53*, 335-344.
- Evans, E., Moggs, J.G., Hwang, J.R., Egly, J.M., and Wood, R.D. (1997). Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *The EMBO journal* *16*, 6559-6573.

- Fan, L., Fuss, J.O., Cheng, Q.J., Arvai, A.S., Hammel, M., Roberts, V.A., Cooper, P.K., and Tainer, J.A. (2008). XPD helicase structures and activities: insights into the cancer and aging phenotypes from XPD mutations. *Cell* 133, 789-800.
- Fang, G., and Cech, T.R. (1993a). The beta subunit of *Oxytricha* telomere-binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA. *Cell* 74, 875-885.
- Fang, G., and Cech, T.R. (1993b). Characterization of a G-quartet formation reaction promoted by the beta-subunit of the *Oxytricha* telomere-binding protein. *Biochemistry* 32, 11646-11657.
- Fiaux, J., Horst, J., Scior, A., Preissler, S., Koplín, A., Bukau, B., and Deuerling, E. (2010). Structural analysis of the ribosome-associated complex (RAC) reveals an unusual Hsp70/Hsp40 interaction. *The Journal of biological chemistry* 285, 3227-3234.
- Fischer, U., Schauble, N., Schutz, S., Altvater, M., Chang, Y., Faza, M.B., and Panse, V.G. (2015). A non-canonical mechanism for Crm1-export cargo complex assembly. *eLife* 4.
- Fousteri, M., and Mullenders, L.H. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell research* 18, 73-84.
- Franklin, R.E., and Gosling, R.G. (1953). Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature* 172, 156-157.
- Fresco, J.R., and Massoulié, J. (1963). Polynucleotides. V. Helix-coil transition of polyriboguanilyc acid. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 1352-1353.
- Friedberg, E.C. (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature reviews. Cancer* 1, 22-33.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* 313, 17-42.
- Fry, M. (2007). Tetraplex DNA and its interacting proteins. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 4336-4351.
- Fry, M., and Loeb, L.A. (1999). Human werner syndrome DNA helicase unwinds tetrahelical structures of the fragile X syndrome repeat sequence d(CGG)_n. *The Journal of biological chemistry* 274, 12797-12802.
- Gautschi, M., Lilie, H., Funfschilling, U., Mun, A., Ross, S., Lithgow, T., Rucknagel, P., and Rospert, S. (2001). RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zutin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3762-3767.
- Gautschi, M., Mun, A., Ross, S., and Rospert, S. (2002). A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4209-4214.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciati, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.

- Gellert, M., Lipsett, M.N., and Davies, D.R. (1962). Helix formation by guanylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *48*, 2013-2018.
- Gelperin, D., Horton, L., Beckman, J., Hensold, J., and Lemmon, S.K. (2001). Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *Rna* *7*, 1268-1283.
- Gessner, R.V., Frederick, C.A., Quigley, G.J., Rich, A., and Wang, A.H. (1989). The molecular structure of the left-handed Z-DNA double helix at 1.0-Å atomic resolution. Geometry, conformation, and ionic interactions of d(CGCGCG). *The Journal of biological chemistry* *264*, 7921-7935.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* *425*, 737-741.
- Giraldo, R., and Rhodes, D. (1994). The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA. *The EMBO journal* *13*, 2411-2420.
- Godin, S.K., Zhang, Z., Herken, B.W., Westmoreland, J.W., Lee, A.G., Mihalevic, M.J., Yu, Z., Sobol, R.W., Resnick, M.A., and Bernstein, K.A. (2016). The Shu complex promotes error-free tolerance of alkylation-induced base excision repair products. *Nucleic acids research* *44*, 8199-8215.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* *274*, 546, 563-547.
- Gomez, D., Lemarteleur, T., Lacroix, L., Mailliet, P., Mergny, J.L., and Riou, J.F. (2004a). Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing. *Nucleic acids research* *32*, 371-379.
- Gomez, D., O'Donohue, M.F., Wenner, T., Douarre, C., Macadre, J., Koebel, P., Giraud-Panis, M.J., Kaplan, H., Kolkes, A., Shin-ya, K., *et al.* (2006). The G-quadruplex ligand telomestatin inhibits POT1 binding to telomeric sequences in vitro and induces GFP-POT1 dissociation from telomeres in human cells. *Cancer research* *66*, 6908-6912.
- Gomez, D., Paterski, R., Lemarteleur, T., Shin-Ya, K., Mergny, J.L., and Riou, J.F. (2004b). Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang. *The Journal of biological chemistry* *279*, 41487-41494.
- Gonzalez, V., Guo, K., Hurley, L., and Sun, D. (2009). Identification and characterization of nucleolin as a c-myc G-quadruplex-binding protein. *The Journal of biological chemistry* *284*, 23622-23635.
- Gonzalez, V., and Hurley, L.H. (2010). The C-terminus of nucleolin promotes the formation of the c-MYC G-quadruplex and inhibits c-MYC promoter activity. *Biochemistry* *49*, 9706-9714.
- Gordon, D.J., Resio, B., and Pellman, D. (2012). Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nature reviews. Genetics* *13*, 189-203.

- Gracheva, E., Chitale, S., Wilhelm, T., Rapp, A., Byrne, J., Stadler, J., Medina, R., Cardoso, M.C., and Richly, H. (2016). ZRF1 mediates remodeling of E3 ligases at DNA lesion sites during nucleotide excision repair. *J Cell Biol* *213*, 185-200.
- Grand, C.L., Han, H., Munoz, R.M., Weitman, S., Von Hoff, D.D., Hurley, L.H., and Bearss, D.J. (2002). The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo. *Molecular cancer therapeutics* *1*, 565-573.
- Gray, L.T., Vallur, A.C., Eddy, J., and Maizels, N. (2014). G quadruplexes are genomewide targets of transcriptional helicases XPB and XPD. *Nature chemical biology* *10*, 313-318.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K., and Nakatani, Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* *113*, 357-367.
- Groth, P., Auslander, S., Majumder, M.M., Schultz, N., Johansson, F., Petermann, E., and Helleday, T. (2010). Methylated DNA causes a physical block to replication forks independently of damage signalling, O(6)-methylguanine or DNA single-strand breaks and results in DNA damage. *Journal of molecular biology* *402*, 70-82.
- Guedin, A., Gros, J., Alberti, P., and Mergny, J.L. (2010). How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability. *Nucleic acids research* *38*, 7858-7868.
- Guerrero-Santoro, J., Kapetanaki, M.G., Hsieh, C.L., Gorbachinsky, I., Levine, A.S., and Rappaport, V. (2008). The cullin 4B-based UV-damaged DNA-binding protein ligase binds to UV-damaged chromatin and ubiquitinates histone H2A. *Cancer research* *68*, 5014-5022.
- Guo, J.U., and Bartel, D.P. (2016). RNA G-quadruplexes are globally unfolded in eukaryotic cells and depleted in bacteria. *Science* *353*.
- Ha, S.C., Lowenhaupt, K., Rich, A., Kim, Y.G., and Kim, K.K. (2005). Crystal structure of a junction between B-DNA and Z-DNA reveals two extruded bases. *Nature* *437*, 1183-1186.
- Hall, B.M., Ma, C.X., Liang, P., and Singh, K.K. (2009). Fluctuation analysis CalculatOR: a web tool for the determination of mutation rate using Luria-Delbruck fluctuation analysis. *Bioinformatics* *25*, 1564-1565.
- Han, H., Bennett, R.J., and Hurley, L.H. (2000). Inhibition of unwinding of G-quadruplex structures by Sgs1 helicase in the presence of N,N'-bis[2-(1-piperidino)ethyl]-3,4,9,10-perylenetetra-carboxylic diimide, a G-quadruplex-interactive ligand. *Biochemistry* *39*, 9311-9316.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* *166*, 557-580.
- Hanakahi, L.A., Sun, H., and Maizels, N. (1999). High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA. *The Journal of biological chemistry* *274*, 15908-15912.

Hansel-Hertsch, R., Antonio, M.D., and Balasubramanian, S. (2017). DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential. *Nature reviews. Molecular cell biology*.

Hansel-Hertsch, R., Beraldi, D., Lensing, S.V., Marsico, G., Zyner, K., Parry, A., Di Antonio, M., Pike, J., Kimura, H., Narita, M., *et al.* (2016). G-quadruplex structures mark human regulatory chromatin. *Nature genetics* *48*, 1267-1272.

Hardin, C.C., Watson, T., Corregan, M., and Bailey, C. (1992). Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry* *31*, 833-841.

Hatzakis, E., Okamoto, K., and Yang, D. (2010). Thermodynamic stability and folding kinetics of the major G-quadruplex and its loop isomers formed in the nuclease hypersensitive element in the human c-Myc promoter: effect of loops and flanking segments on the stability of parallel-stranded intramolecular G-quadruplexes. *Biochemistry* *49*, 9152-9160.

Hazel, P., Huppert, J., Balasubramanian, S., and Neidle, S. (2004). Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes. *Journal of the American Chemical Society* *126*, 16405-16415.

Henderson, A., Wu, Y., Huang, Y.C., Chavez, E.A., Platt, J., Johnson, F.B., Brosh, R.M., Jr., Sen, D., and Lansdorp, P.M. (2014). Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells. *Nucleic acids research* *42*, 860-869.

Henderson, E., Hardin, C.C., Walk, S.K., Tinoco, I., Jr., and Blackburn, E.H. (1987). Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. *Cell* *51*, 899-908.

Hershman, S.G., Chen, Q., Lee, J.Y., Kozak, M.L., Yue, P., Wang, L.S., and Johnson, F.B. (2008). Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* *36*, 144-156.

Huang, P., Gautschi, M., Walter, W., Rospert, S., and Craig, E.A. (2005). The Hsp70 Ssz1 modulates the function of the ribosome-associated J-protein Zuo1. *Nature structural & molecular biology* *12*, 497-504.

Huang, W.C., Tseng, T.Y., Chen, Y.T., Chang, C.C., Wang, Z.F., Wang, C.L., Hsu, T.N., Li, P.T., Chen, C.T., Lin, J.J., *et al.* (2015). Direct evidence of mitochondrial G-quadruplex DNA by using fluorescent anti-cancer agents. *Nucleic acids research* *43*, 10102-10113.

Huber, M.D., Lee, D.C., and Maizels, N. (2002). G4 DNA unwinding by BLM and Sgs1p: substrate specificity and substrate-specific inhibition. *Nucleic acids research* *30*, 3954-3961.

Hud, N.V., Smith, F.W., Anet, F.A., and Feigon, J. (1996). The selectivity for K⁺ versus Na⁺ in DNA quadruplexes is dominated by relative free energies of hydration: a thermodynamic analysis by ¹H NMR. *Biochemistry* *35*, 15383-15390.

Hundley, H., Eisenman, H., Walter, W., Evans, T., Hotokezaka, Y., Wiedmann, M., and Craig, E. (2002). The in vivo function of the ribosome-associated Hsp70, Ssz1, does not require its putative peptide-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 4203-4208.

- Huppert, J.L. (2008a). Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chem Soc Rev* 37, 1375-1384.
- Huppert, J.L. (2008b). Hunting G-quadruplexes. *Biochimie* 90, 1140-1148.
- Huppert, J.L. (2010). Structure, location and interactions of G-quadruplexes. *The FEBS journal* 277, 3452-3458.
- Huppert, J.L., and Balasubramanian, S. (2005). Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic acids research* 33, 2908-2916.
- Huppert, J.L., and Balasubramanian, S. (2007). G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic acids research* 35, 406-413.
- Huppert, J.L., Bugaut, A., Kumari, S., and Balasubramanian, S. (2008). G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic acids research* 36, 6260-6268.
- Inoue, T., Shoji, W., and Obinata, M. (2000). MIDA1 is a sequence specific DNA binding protein with novel DNA binding properties. *Genes Cells* 5, 699-709.
- International Human Genome Sequencing, C. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.
- Jeggo, P.A., Pearl, L.H., and Carr, A.M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nature reviews. Cancer* 16, 35-42.
- Ji, L., Arcinas, M., and Boxer, L.M. (1995). The transcription factor, Nm23H2, binds to and activates the translocated c-myc allele in Burkitt's lymphoma. *The Journal of biological chemistry* 270, 13392-13398.
- Jin, R., Gaffney, B.L., Wang, C., Jones, R.A., and Breslauer, K.J. (1992). Thermodynamics and structure of a DNA tetraplex: a spectroscopic and calorimetric study of the tetramolecular complexes of d(TG3T) and d(TG3T2G3T). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8832-8836.
- Joachimi, A., Benz, A., and Hartig, J.S. (2009). A comparison of DNA and RNA quadruplex structures and stabilities. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17, 6811-6815.
- Kang, C., Zhang, X., Ratliff, R., Moyzis, R., and Rich, A. (1992). Crystal structure of four-stranded Oxytricha telomeric DNA. *Nature* 356, 126-131.
- Kanoh, Y., Matsumoto, S., Fukatsu, R., Kakusho, N., Kono, N., Renard-Guillet, C., Masuda, K., Iida, K., Nagasawa, K., Shirahige, K., *et al.* (2015). Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances. *Nature structural & molecular biology* 22, 889-897.
- Kapetanaki, M.G., Guerrero-Santoro, J., Bisi, D.C., Hsieh, C.L., Rapic-Otrin, V., and Levine, A.S. (2006). The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2588-2593.

- Karsisiotis, A.I., Hessari, N.M., Novellino, E., Spada, G.P., Randazzo, A., and Webba da Silva, M. (2011). Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism. *Angewandte Chemie* 50, 10645-10648.
- Kazemier, H.G., Paeschke, K., and Lansdorp, P.M. (2017). Guanine quadruplex monoclonal antibody 1H6 cross-reacts with restrained thymidine-rich single stranded DNA. *Nucleic acids research*.
- Kemp, M.G., Reardon, J.T., Lindsey-Boltz, L.A., and Sancar, A. (2012). Mechanism of release and fate of excised oligonucleotides during nucleotide excision repair. *The Journal of biological chemistry* 287, 22889-22899.
- Kettani, A., Bouaziz, S., Gorin, A., Zhao, H., Jones, R.A., and Patel, D.J. (1998). Solution structure of a Na cation stabilized DNA quadruplex containing G.G.G.G and G.C.G.C tetrads formed by G-G-G-C repeats observed in adeno-associated viral DNA. *Journal of molecular biology* 282, 619-636.
- Kim, M.Y., Gleason-Guzman, M., Izbicka, E., Nishioka, D., and Hurley, L.H. (2003). The different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures. *Cancer research* 63, 3247-3256.
- Kim, M.Y., Vankayalapati, H., Shin-Ya, K., Wierzba, K., and Hurley, L.H. (2002). Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *Journal of the American Chemical Society* 124, 2098-2099.
- Ko, J., Park, H., Heo, L., and Seok, C. (2012). GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. *Nucleic acids research* 40, W294-297.
- Koc, A., Wheeler, L.J., Mathews, C.K., and Merrill, G.F. (2004). Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *The Journal of biological chemistry* 279, 223-230.
- Kocman, V., and Plavec, J. (2017). Tetrahelical structural family adopted by AGCGA-rich regulatory DNA regions. *Nature communications* 8, 15355.
- Koh, J.L., Ding, H., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Toufighi, K., Bader, G.D., Myers, C.L., Andrews, B.J., and Boone, C. (2010). DRYGIN: a database of quantitative genetic interaction networks in yeast. *Nucleic acids research* 38, D502-507.
- Kruisselbrink, E., Guryev, V., Brouwer, K., Pontier, D.B., Cuppen, E., and Tijsterman, M. (2008). Mutagenic capacity of endogenous G4 DNA underlies genome instability in FANCI-defective *C. elegans*. *Curr Biol* 18, 900-905.
- Kulak, N.A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014). Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nature methods* 11, 319-324.
- Kumar, N., Sahoo, B., Varun, K.A., Maiti, S., and Maiti, S. (2008). Effect of loop length variation on quadruplex-Watson Crick duplex competition. *Nucleic acids research* 36, 4433-4442.

- Kumari, S., Bugaut, A., Huppert, J.L., and Balasubramanian, S. (2007). An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nature chemical biology* 3, 218-221.
- Lam, E.Y., Beraldi, D., Tannahill, D., and Balasubramanian, S. (2013). G-quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA. *Nature communications* 4, 1796.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Lane, A.N., Chaires, J.B., Gray, R.D., and Trent, J.O. (2008). Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic acids research* 36, 5482-5515.
- Langridge, R., and Rich, A. (1963). Molecular structure of helical polycytidylic acid. *Nature* 198, 725-728.
- Lans, H., Marteiijn, J.A., and Vermeulen, W. (2012). ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics & chromatin* 5, 4.
- Laughlan, G., Murchie, A.I., Norman, D.G., Moore, M.H., Moody, P.C., Lilley, D.M., and Luisi, B. (1994). The high-resolution crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex. *Science* 265, 520-524.
- Law, M.J., Lower, K.M., Voon, H.P., Hughes, J.R., Garrick, D., Viprakasit, V., Mitson, M., De Gobbi, M., Marra, M., Morris, A., *et al.* (2010). ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner. *Cell* 143, 367-378.
- Lee, K., Sharma, R., Shrestha, O.K., Bingman, C.A., and Craig, E.A. (2016). Dual interaction of the Hsp70 J-protein cochaperone Zuo1 with the 40S and 60S ribosomal subunits. *Nature structural & molecular biology*.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Li, L., Elledge, S.J., Peterson, C.A., Bales, E.S., and Legerski, R.J. (1994). Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5012-5016.
- Li, L., Peterson, C.A., Lu, X., and Legerski, R.J. (1995). Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nucleotide excision repair. *Molecular and cellular biology* 15, 1993-1998.
- Li, Q., Xiang, J.F., Yang, Q.F., Sun, H.X., Guan, A.J., and Tang, Y.L. (2013). G4LDB: a database for discovering and studying G-quadruplex ligands. *Nucleic acids research* 41, D1115-1123.
- Li, Y., Geyer, C.R., and Sen, D. (1996). Recognition of anionic porphyrins by DNA aptamers. *Biochemistry* 35, 6911-6922.
- Lim, K.W., Jenjaroenpun, P., Low, Z.J., Khong, Z.J., Ng, Y.S., Kuznetsov, V.A., and Phan, A.T. (2015). Duplex stem-loop-containing quadruplex motifs in the human genome: a combined genomic and structural study. *Nucleic acids research* 43, 5630-5646.

Lipps, H.J. (1980). In vitro aggregation of the gene-sized DNA molecules of the ciliate *Stylonychia mytilus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77, 4104-4107.

Lipps, H.J., Gruissem, W., and Prescott, D.M. (1982). Higher order DNA structure in macronuclear chromatin of the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 79, 2495-2499.

Lipps, H.J., and Rhodes, D. (2009). G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. Trends Cell Biol 19, 414-422.

Liu, H.Y., Zhao, Q., Zhang, T.P., Wu, Y., Xiong, Y.X., Wang, S.K., Ge, Y.L., He, J.H., Lv, P., Ou, T.M., et al. (2016). Conformation Selective Antibody Enables Genome Profiling and Leads to Discovery of Parallel G-Quadruplex in Human Telomeres. Cell chemical biology 23, 1261-1270.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25, 402-408.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., and Scott, M.P. (2013). Molecular Cell Biology - Seventh Edition.

London, T.B., Barber, L.J., Mosedale, G., Kelly, G.P., Balasubramanian, S., Hickson, I.D., Boulton, S.J., and Hiom, K. (2008). FANCD1 is a structure-specific DNA helicase associated with the maintenance of genomic G/C tracts. The Journal of biological chemistry 283, 36132-36139.

Lopes, J., Piazza, A., Bermejo, R., Kriegsman, B., Colosio, A., Teulade-Fichou, M.P., Foiani, M., and Nicolas, A. (2011). G-quadruplex-induced instability during leading-strand replication. The EMBO journal 30, 4033-4046.

Ma, D.L., Zhang, Z., Wang, M., Lu, L., Zhong, H.J., and Leung, C.H. (2015). Recent Developments in G-Quadruplex Probes. Chemistry & biology 22, 812-828.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbour Laboratory.

Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. Nature reviews. Molecular cell biology 15, 465-481.

Masuda-Sasa, T., Polaczek, P., Peng, X.P., Chen, L., and Campbell, J.L. (2008). Processing of G4 DNA by Dna2 helicase/nuclease and replication protein A (RPA) provides insights into the mechanism of Dna2/RPA substrate recognition. The Journal of biological chemistry 283, 24359-24373.

Mateyak, M.K., and Zakian, V.A. (2006). Human PIF helicase is cell cycle regulated and associates with telomerase. Cell cycle 5, 2796-2804.

McGee, J.S., Phillips, J.A., Chan, A., Sabourin, M., Paeschke, K., and Zakian, V.A. (2010). Reduced Rif2 and lack of Mec1 target short telomeres for elongation rather than double-strand break repair. Nature structural & molecular biology 17, 1438-1445.

- Mekmaysy, C.S., Petraccone, L., Garbett, N.C., Ragazzon, P.A., Gray, R., Trent, J.O., and Chaires, J.B. (2008). Effect of O6-methylguanine on the stability of G-quadruplex DNA. *Journal of the American Chemical Society* *130*, 6710-6711.
- Mendoza, O., Bourdoncle, A., Boule, J.B., Brosh, R.M., Jr., and Mergny, J.L. (2016). G-quadruplexes and helicases. *Nucleic acids research* *44*, 1989-2006.
- Millevoi, S., Moine, H., and Vagner, S. (2012). G-quadruplexes in RNA biology. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* *3*, 495-507.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* *455*, 770-774.
- Mirkin, E.V., and Mirkin, S.M. (2007). Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* *71*, 13-35.
- Mishra, S.K., Tawani, A., Mishra, A., and Kumar, A. (2016). G4IPDB: A database for G-quadruplex structure forming nucleic acid interacting proteins. *Scientific reports* *6*, 38144.
- Mohaghegh, P., Karow, J.K., Brosh, R.M., Jr., Bohr, V.A., and Hickson, I.D. (2001). The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic acids research* *29*, 2843-2849.
- Monchaud, D., Allain, C., Bertrand, H., Smargiasso, N., Rosu, F., Gabelica, V., De Cian, A., Mergny, J.L., and Teulade-Fichou, M.P. (2008). Ligands playing musical chairs with G-quadruplex DNA: a rapid and simple displacement assay for identifying selective G-quadruplex binders. *Biochimie* *90*, 1207-1223.
- Morris, M.J., Negishi, Y., Pázsint, C., Schonhoft, J.D., and Basu, S. (2010). An RNA G-quadruplex is essential for cap-independent translation initiation in human VEGF IRES. *Journal of the American Chemical Society* *132*, 17831-17839.
- Mullen, M.A., Olson, K.J., Dallaire, P., Major, F., Assmann, S.M., and Bevilacqua, P.C. (2010). RNA G-Quadruplexes in the model plant species *Arabidopsis thaliana*: prevalence and possible functional roles. *Nucleic acids research* *38*, 8149-8163.
- Nakken, S., Rognes, T., and Hovig, E. (2009). The disruptive positions in human G-quadruplex motifs are less polymorphic and more conserved than their neutral counterparts. *Nucleic acids research* *37*, 5749-5756.
- Nicoludis, J.M., Barrett, S.P., Mergny, J.L., and Yatsunyk, L.A. (2012a). Interaction of human telomeric DNA with N-methyl mesoporphyrin IX. *Nucleic acids research* *40*, 5432-5447.
- Nicoludis, J.M., Miller, S.T., Jeffrey, P.D., Barrett, S.P., Rablen, P.R., Lawton, T.J., and Yatsunyk, L.A. (2012b). Optimized end-stacking provides specificity of N-methyl mesoporphyrin IX for human telomeric G-quadruplex DNA. *Journal of the American Chemical Society* *134*, 20446-20456.
- Nishi, R., Alekseev, S., Dinant, C., Hoogstraten, D., Houtsmuller, A.B., Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W., Hanaoka, F., and Sugawara, K. (2009). UV-DDB-dependent regulation of nucleotide excision repair kinetics in living cells. *DNA repair* *8*, 767-776.

- Norseen, J., Johnson, F.B., and Lieberman, P.M. (2009). Role for G-quadruplex RNA binding by Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in DNA replication and metaphase chromosome attachment. *Journal of virology* *83*, 10336-10346.
- Oganesian, L., Graham, M.E., Robinson, P.J., and Bryan, T.M. (2007). Telomerase recognizes G-quadruplex and linear DNA as distinct substrates. *Biochemistry* *46*, 11279-11290.
- Oganesian, L., Moon, I.K., Bryan, T.M., and Jarstfer, M.B. (2006). Extension of G-quadruplex DNA by ciliate telomerase. *The EMBO journal* *25*, 1148-1159.
- Olsen, C.M., and Marky, L.A. (2009). Energetic and hydration contributions of the removal of methyl groups from thymine to form uracil in G-quadruplexes. *The journal of physical chemistry. B* *113*, 9-11.
- Ooi, S.L., Shoemaker, D.D., and Boeke, J.D. (2003). DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nature genetics* *35*, 277-286.
- Oyaghire, S.N., Cherubim, C.J., Telmer, C.A., Martinez, J.A., Bruchez, M.P., and Armitage, B.A. (2016). RNA G-Quadruplex Invasion and Translation Inhibition by Antisense gamma-Peptide Nucleic Acid Oligomers. *Biochemistry* *55*, 1977-1988.
- Paeschke, K., Bochman, M.L., Garcia, P.D., Cejka, P., Friedman, K.L., Kowalczykowski, S.C., and Zakian, V.A. (2013). Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs. *Nature* *497*, 458-462.
- Paeschke, K., Capra, J.A., and Zakian, V.A. (2011). DNA replication through G-quadruplex motifs is promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA helicase. *Cell* *145*, 678-691.
- Paeschke, K., Juranek, S., Simonsson, T., Hempel, A., Rhodes, D., and Lipps, H.J. (2008). Telomerase recruitment by the telomere end binding protein-beta facilitates G-quadruplex DNA unfolding in ciliates. *Nature structural & molecular biology* *15*, 598-604.
- Paeschke, K., Simonsson, T., Postberg, J., Rhodes, D., and Lipps, H.J. (2005). Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo. *Nature structural & molecular biology* *12*, 847-854.
- Pagano, B., Margarucci, L., Zizza, P., Amato, J., Iaccarino, N., Cassiano, C., Salvati, E., Novellino, E., Biroccio, A., Casapullo, A., *et al.* (2015). Identification of novel interactors of human telomeric G-quadruplex DNA. *Chemical communications* *51*, 2964-2967.
- Papadopoulou, C., Guilbaud, G., Schiavone, D., and Sale, J.E. (2015). Nucleotide Pool Depletion Induces G-Quadruplex-Dependent Perturbation of Gene Expression. *Cell reports* *13*, 2491-2503.
- Paramasivan, S., and Bolton, P.H. (2008). Mix and measure fluorescence screening for selective quadruplex binders. *Nucleic acids research* *36*, e106.
- Parkinson, G.N., Ghosh, R., and Neidle, S. (2007). Structural basis for binding of porphyrin to human telomeres. *Biochemistry* *46*, 2390-2397.

- Patel, D.J., Phan, A.T., and Kuryavyi, V. (2007). Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic acids research* *35*, 7429-7455.
- Phan, A.T., and Mergny, J.L. (2002). Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix. *Nucleic acids research* *30*, 4618-4625.
- Piazza, A., Adrian, M., Samazan, F., Heddi, B., Hamon, F., Serero, A., Lopes, J., Teulade-Fichou, M.P., Phan, A.T., and Nicolas, A. (2015). Short loop length and high thermal stability determine genomic instability induced by G-quadruplex-forming minisatellites. *The EMBO journal* *34*, 1718-1734.
- Piazza, A., Boule, J.B., Lopes, J., Mingo, K., Largy, E., Teulade-Fichou, M.P., and Nicolas, A. (2010). Genetic instability triggered by G-quadruplex interacting Phen-DC compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* *38*, 4337-4348.
- Piazza, A., Serero, A., Boule, J.B., Legoix-Ne, P., Lopes, J., and Nicolas, A. (2012). Stimulation of gross chromosomal rearrangements by the human CEB1 and CEB25 minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* depends on G-quadruplexes or Cdc13. *PLoS genetics* *8*, e1003033.
- Postberg, J., Tsytlonok, M., Sparvoli, D., Rhodes, D., and Lipps, H.J. (2012). A telomerase-associated RecQ protein-like helicase resolves telomeric G-quadruplex structures during replication. *Gene* *497*, 147-154.
- Postel, E.H., Berberich, S.J., Flint, S.J., and Ferrone, C.A. (1993). Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* *261*, 478-480.
- Prakash, S., and Prakash, L. (2000). Nucleotide excision repair in yeast. *Mutation research* *451*, 13-24.
- Prunuske, A.J., Waltner, J.K., Kuhn, P., Gu, B., and Craig, E.A. (2012). Role for the molecular chaperones Zuo1 and Ssz1 in quorum sensing via activation of the transcription factor Pdr1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 472-477.
- Putnam, C.D., and Kolodner, R.D. (2010). Determination of gross chromosomal rearrangement rates. *Cold Spring Harb Protoc* *2010*, pdb prot5492.
- Qin, Y., and Hurley, L.H. (2008). Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions. *Biochimie* *90*, 1149-1171.
- Rachwal, P.A., Brown, T., and Fox, K.R. (2007a). Effect of G-tract length on the topology and stability of intramolecular DNA quadruplexes. *Biochemistry* *46*, 3036-3044.
- Rachwal, P.A., Brown, T., and Fox, K.R. (2007b). Sequence effects of single base loops in intramolecular quadruplex DNA. *FEBS letters* *581*, 1657-1660.
- Rahmouni, A.R., and Wells, R.D. (1989). Stabilization of Z DNA in vivo by localized supercoiling. *Science* *246*, 358-363.

Rawal, P., Kummarasetti, V.B., Ravindran, J., Kumar, N., Halder, K., Sharma, R., Mukerji, M., Das, S.K., and Chowdhury, S. (2006). Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: role in *Escherichia coli* global regulation. *Genome Res* *16*, 644-655.

Raychaudhuri, S., Fontanes, V., Banerjee, R., Bernavichute, Y., and Dasgupta, A. (2006). Zuo1in, a DnaJ molecular chaperone, stimulates cap-independent translation in yeast. *Biochemical and biophysical research communications* *350*, 788-795.

Reardon, J.T., and Sancar, A. (2003). Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease. *Genes & development* *17*, 2539-2551.

Ren, J., and Chaires, J.B. (1999). Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *Biochemistry* *38*, 16067-16075.

Rezler, E.M., Seenisamy, J., Bashyam, S., Kim, M.Y., White, E., Wilson, W.D., and Hurley, L.H. (2005). Telomestatin and diseleno saphyrin bind selectively to two different forms of the human telomeric G-quadruplex structure. *Journal of the American Chemical Society* *127*, 9439-9447.

Rhodes, D., and Lipps, H.J. (2015). G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic acids research* *43*, 8627-8637.

Ribeyre, C., Lopes, J., Boule, J.B., Piazza, A., Guedin, A., Zakian, V.A., Mergny, J.L., and Nicolas, A. (2009). The yeast Pif1 helicase prevents genomic instability caused by G-quadruplex-forming CEB1 sequences in vivo. *PLoS genetics* *5*, e1000475.

Richly, H., and Di Croce, L. (2011). The flip side of the coin: role of ZRF1 and histone H2A ubiquitination in transcriptional activation. *Cell cycle* *10*, 745-750.

Richly, H., Rocha-Viegas, L., Ribeiro, J.D., Demajo, S., Gundem, G., Lopez-Bigas, N., Nakagawa, T., Rospert, S., Ito, T., and Di Croce, L. (2010). Transcriptional activation of polycomb-repressed genes by ZRF1. *Nature* *468*, 1124-1128.

Ringvoll, J., Uldal, L., Roed, M.A., Reite, K., Baynton, K., Klungland, A., and Eide, L. (2007). Mutations in the RAD27 and SGS1 genes differentially affect the chronological and replicative lifespan of yeast cells growing on glucose and glycerol. *FEMS yeast research* *7*, 848-859.

Risitano, A., and Fox, K.R. (2005). Inosine substitutions demonstrate that intramolecular DNA quadruplexes adopt different conformations in the presence of sodium and potassium. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *15*, 2047-2050.

Rodriguez, R., Miller, K.M., Forment, J.V., Bradshaw, C.R., Nikan, M., Britton, S., Oelschlaegel, T., Xhemalce, B., Balasubramanian, S., and Jackson, S.P. (2012). Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. *Nature chemical biology* *8*, 301-310.

Rothstein, R.J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods in enzymology* *101*, 202-211.

Sabharwal, N.C., Savikhin, V., Turek-Herman, J.R., Nicoludis, J.M., Szalai, V.A., and Yatsunyk, L.A. (2014). N-methylmesoporphyrin IX fluorescence as a reporter of strand orientation in guanine quadruplexes. *The FEBS journal* *281*, 1726-1737.

Sabouri, N., Capra, J.A., and Zakian, V.A. (2014). The essential *Schizosaccharomyces pombe* Pfh1 DNA helicase promotes fork movement past G-quadruplex motifs to prevent DNA damage. *BMC biology* *12*, 101.

Sacca, B., Lacroix, L., and Mergny, J.L. (2005). The effect of chemical modifications on the thermal stability of different G-quadruplex-forming oligonucleotides. *Nucleic acids research* *33*, 1182-1192.

Saffi, J., Pereira, V.R., and Henriques, J.A. (2000). Importance of the Sgs1 helicase activity in DNA repair of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* *37*, 75-78.

Sagi, J., Renciuik, D., Tomasko, M., and Vorlickova, M. (2010). Quadruplexes of human telomere DNA analogs designed to contain G:A:G:A, G:G:A:A, and A:A:A:A tetrads. *Biopolymers* *93*, 880-886.

Saintome, C., Amrane, S., Mergny, J.L., and Alberti, P. (2016). The exception that confirms the rule: a higher-order telomeric G-quadruplex structure more stable in sodium than in potassium. *Nucleic acids research* *44*, 2926-2935.

Salazar, M., Thompson, B.D., Kerwin, S.M., and Hurley, L.H. (1996). Thermally induced DNA:RNA hybrid to G-quadruplex transitions: possible implications for telomere synthesis by telomerase. *Biochemistry* *35*, 16110-16115.

Sanders, C.M. (2010). Human Pif1 helicase is a G-quadruplex DNA-binding protein with G-quadruplex DNA-unwinding activity. *The Biochemical journal* *430*, 119-128.

SantaLucia, J., Jr. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 1460-1465.

Sarkies, P., Reams, C., Simpson, L.J., and Sale, J.E. (2010). Epigenetic instability due to defective replication of structured DNA. *Molecular cell* *40*, 703-713.

Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H.J., and Pluckthun, A. (2001). In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 8572-8577.

Scharer, O.D. (2013). Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *5*, a012609.

Scherer, S., and Davis, R.W. (1979). Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *76*, 4951-4955.

Schiestl, R.H., and Gietz, R.D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current genetics* *16*, 339-346.

Schmidt, K.H., Pennaneach, V., Putnam, C.D., and Kolodner, R.D. (2006). Analysis of gross-chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in enzymology* 409, 462-476.

Schroth, G.P., Chou, P.J., and Ho, P.S. (1992). Mapping Z-DNA in the human genome. Computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA-forming sequences in human genes. *The Journal of biological chemistry* 267, 11846-11855.

Schultze, P., Macaya, R.F., and Feigon, J. (1994). Three-dimensional solution structure of the thrombin-binding DNA aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *Journal of molecular biology* 235, 1532-1547.

Schulz, V.P., and Zakian, V.A. (1994). The *saccharomyces* PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* 76, 145-155.

Sen, D., and Gilbert, W. (1988). Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334, 364-366.

Shammas, M.A., Shmookler Reis, R.J., Li, C., Koley, H., Hurley, L.H., Anderson, K.C., and Munshi, N.C. (2004). Telomerase inhibition and cell growth arrest after telomestatin treatment in multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 770-776.

Shay, J.W., and Wright, W.E. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Seminars in cancer biology* 21, 349-353.

Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods in enzymology* 350, 3-41.

Shin, W.-H., Lee, G.R., Heo, L., Lee, H., and Seok, C. (2014). Prediction of Protein Structure and Interaction by GALAXY protein modeling programs. *Bio Design* 2, 1-11.

Shirude, P.S., Okumus, B., Ying, L., Ha, T., and Balasubramanian, S. (2007). Single-molecule conformational analysis of G-quadruplex formation in the promoter DNA duplex of the proto-oncogene *c-kit*. *Journal of the American Chemical Society* 129, 7484-7485.

Shivalingam, A., Izquierdo, M.A., Le Marois, A., Vysniauskas, A., Suhling, K., Kuimova, M.K., and Vilar, R. (2015). The interactions between a small molecule and G-quadruplexes are visualized by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature communications* 6, 8178.

Shulga, N., James, P., Craig, E.A., and Goldfarb, D.S. (1999). A nuclear export signal prevents *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 Ssb1p from stimulating nuclear localization signal-directed nuclear transport. *The Journal of biological chemistry* 274, 16501-16507.

Siddiqui-Jain, A., Grand, C.L., Bearss, D.J., and Hurley, L.H. (2002). Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress *c-MYC* transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11593-11598.

Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

- Simonsson, T., Pecinka, P., and Kubista, M. (1998). DNA tetraplex formation in the control region of c-myc. *Nucleic acids research* 26, 1167-1172.
- Skolakova, P., Bednarova, K., Vorlickova, M., and Sagi, J. (2010). Quadruplexes of human telomere dG(3)(TTAG(3))(3) sequences containing guanine abasic sites. *Biochemical and biophysical research communications* 399, 203-208.
- Skourti-Stathaki, K., and Proudfoot, N.J. (2014). A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes & development* 28, 1384-1396.
- Smirnov, I., and Shafer, R.H. (2000). Effect of loop sequence and size on DNA aptamer stability. *Biochemistry* 39, 1462-1468.
- Smith, F.W., and Feigon, J. (1993). Strand orientation in the DNA quadruplex formed from the *Oxytricha* telomere repeat oligonucleotide d(G4T4G4) in solution. *Biochemistry* 32, 8682-8692.
- Smith, J.S., Chen, Q., Yatsunyk, L.A., Nicoludis, J.M., Garcia, M.S., Kranaster, R., Balasubramanian, S., Monchard, D., Teulade-Fichou, M.P., Abramowitz, L., *et al.* (2011). Rudimentary G-quadruplex-based telomere capping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature structural & molecular biology* 18, 478-485.
- Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2001). A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes & development* 15, 507-521.
- Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., Tanaka, K., *et al.* (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121, 387-400.
- Sun, D., and Hurley, L.H. (2009). The importance of negative superhelicity in inducing the formation of G-quadruplex and i-motif structures in the c-Myc promoter: implications for drug targeting and control of gene expression. *Journal of medicinal chemistry* 52, 2863-2874.
- Sun, H., Bennett, R.J., and Maizels, N. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs. *Nucleic acids research* 27, 1978-1984.
- Sun, H., Karow, J.K., Hickson, I.D., and Maizels, N. (1998). The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA. *The Journal of biological chemistry* 273, 27587-27592.
- Sundquist, W.I., and Heaphy, S. (1993). Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3393-3397.
- Sundquist, W.I., and Klug, A. (1989). Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* 342, 825-829.
- Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F.U., and Flanagan, J. (1996). A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *The EMBO journal* 15, 408-417.

Tahara, H., Shin-Ya, K., Seimiya, H., Yamada, H., Tsuruo, T., and Ide, T. (2006). G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. *Oncogene* 25, 1955-1966.

Tang, C.F., and Shafer, R.H. (2006). Engineering the quadruplex fold: nucleoside conformation determines both folding topology and molecularity in guanine quadruplexes. *Journal of the American Chemical Society* 128, 5966-5973.

Tapias, A., Auriol, J., Forget, D., Enzlin, J.H., Scharer, O.D., Coin, F., Coulombe, B., and Egly, J.M. (2004). Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. *The Journal of biological chemistry* 279, 19074-19083.

Tauchi, T., Shin-Ya, K., Sashida, G., Sumi, M., Nakajima, A., Shimamoto, T., Ohyashiki, J.H., and Ohyashiki, K. (2003). Activity of a novel G-quadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin (SOT-095), against human leukemia cells: involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways. *Oncogene* 22, 5338-5347.

Tauchi, T., Shin-ya, K., Sashida, G., Sumi, M., Okabe, S., Ohyashiki, J.H., and Ohyashiki, K. (2006). Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia. *Oncogene* 25, 5719-5725.

Thakur, R.K., Kumar, P., Halder, K., Verma, A., Kar, A., Parent, J.L., Basundra, R., Kumar, A., and Chowdhury, S. (2009). Metastases suppressor NM23-H2 interaction with G-quadruplex DNA within c-MYC promoter nuclease hypersensitive element induces c-MYC expression. *Nucleic acids research* 37, 172-183.

Thandapani, P., Song, J., Gandin, V., Cai, Y., Rouleau, S.G., Garant, J.M., Boisvert, F.M., Yu, Z., Perreault, J.P., Topisirovic, I., *et al.* (2015). Aven recognition of RNA G-quadruplexes regulates translation of the mixed lineage leukemia protooncogenes. *eLife* 4.

Thomas, M., White, R.L., and Davis, R.W. (1976). Hybridization of RNA to double-stranded DNA: formation of R-loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 2294-2298.

Todd, A.K., Johnston, M., and Neidle, S. (2005). Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. *Nucleic acids research* 33, 2901-2907.

Tuesuwan, B., Kern, J.T., Thomas, P.W., Rodriguez, M., Li, J., David, W.M., and Kerwin, S.M. (2008). Simian virus 40 large T-antigen G-quadruplex DNA helicase inhibition by G-quadruplex DNA-interactive agents. *Biochemistry* 47, 1896-1909.

Van Driessche, B., Tafforeau, L., Hentges, P., Carr, A.M., and Vandenhoute, J. (2005). Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast* 22, 1061-1068.

Vannier, J.B., Sandhu, S., Petalcorin, M.I., Wu, X., Nabi, Z., Ding, H., and Boulton, S.J. (2013). RTEL1 is a replisome-associated helicase that promotes telomere and genome-wide replication. *Science* 342, 239-242.

Verma, A., Halder, K., Halder, R., Yadav, V.K., Rawal, P., Thakur, R.K., Mohd, F., Sharma, A., and Chowdhury, S. (2008). Genome-wide computational and expression analyses reveal G-

quadruplex DNA motifs as conserved cis-regulatory elements in human and related species. *Journal of medicinal chemistry* *51*, 5641-5649.

Vessey, C.J., Norbury, C.J., and Hickson, I.D. (1999). Genetic disorders associated with cancer predisposition and genomic instability. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* *63*, 189-221.

von Hacht, A., Seifert, O., Menger, M., Schutze, T., Arora, A., Konthur, Z., Neubauer, P., Wagner, A., Weise, C., and Kurreck, J. (2014). Identification and characterization of RNA guanine-quadruplex binding proteins. *Nucleic acids research* *42*, 6630-6644.

Vummidi, B.R., Alzeer, J., and Luedtke, N.W. (2013). Fluorescent probes for G-quadruplex structures. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* *14*, 540-558.

Wakasugi, M., and Sancar, A. (1998). Assembly, subunit composition, and footprint of human DNA repair excision nuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 6669-6674.

Wallgren, M., Mohammad, J.B., Yan, K.P., Pourbozorgi-Langroudi, P., Ebrahimi, M., and Sabouri, N. (2016). G-rich telomeric and ribosomal DNA sequences from the fission yeast genome form stable G-quadruplex DNA structures in vitro and are unwound by the Pfh1 DNA helicase. *Nucleic acids research* *44*, 6213-6231.

Wang, H., Nora, G.J., Ghodke, H., and Opresko, P.L. (2011). Single molecule studies of physiologically relevant telomeric tails reveal POT1 mechanism for promoting G-quadruplex unfolding. *The Journal of biological chemistry* *286*, 7479-7489.

Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006a). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Molecular cell* *22*, 383-394.

Wang, P., Ren, L., He, H., Liang, F., Zhou, X., and Tan, Z. (2006b). A phenol quaternary ammonium porphyrin as a potent telomerase inhibitor by selective interaction with quadruplex DNA. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* *7*, 1155-1159.

Wanzek, K., Schwindt, E., Capra, J., and Paeschke, K. (2017). Mms1 binds to G-rich regions in *Saccharomyces cerevisiae* and influences replication and genome stability. *Nucleic acids research*.

Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* *171*, 737-738.

White, M.F. (2009). Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfur-containing 5'→3' DNA helicases. *Biochemical Society transactions* *37*, 547-551.

Wickramasinghe, C.M., Arzouk, H., Frey, A., Maiter, A., and Sale, J.E. (2015). Contributions of the specialised DNA polymerases to replication of structured DNA. *DNA repair* *29*, 83-90.

Wilhelm, M.L., Reinbolt, J., Gangloff, J., Dirheimer, G., and Wilhelm, F.X. (1994). Transfer RNA binding protein in the nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* *349*, 260-264.

- Wilkins, M.H., Stokes, A.R., and Wilson, H.R. (1953). Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* *171*, 738-740.
- Williamson, J.R., Raghuraman, M.K., and Cech, T.R. (1989). Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell* *59*, 871-880.
- Winkler, G.S., Araujo, S.J., Fiedler, U., Vermeulen, W., Coin, F., Egly, J.M., Hoeijmakers, J.H., Wood, R.D., Timmers, H.T., and Weeda, G. (2000). TFIIH with inactive XPD helicase functions in transcription initiation but is defective in DNA repair. *The Journal of biological chemistry* *275*, 4258-4266.
- Wittschieben, B.O., Iwai, S., and Wood, R.D. (2005). DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. *The Journal of biological chemistry* *280*, 39982-39989.
- Wolfe, A.L., Singh, K., Zhong, Y., Drewe, P., Rajasekhar, V.K., Sanghvi, V.R., Mavrakis, K.J., Jiang, M., Roderick, J.E., Van der Meulen, J., *et al.* (2014). RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature* *513*, 65-70.
- Wong, I., and Lohman, T.M. (1993). A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 5428-5432.
- Woolford, J.L., Jr., and Baserga, S.J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *195*, 643-681.
- Wu, X., and Maizels, N. (2001). Substrate-specific inhibition of RecQ helicase. *Nucleic acids research* *29*, 1765-1771.
- Wu, Y., Shin-ya, K., and Brosh, R.M., Jr. (2008). FANCD1 helicase defective in Fanconi anemia and breast cancer unwinds G-quadruplex DNA to defend genomic stability. *Molecular and cellular biology* *28*, 4116-4128.
- Yadav, V.K., Abraham, J.K., Mani, P., Kulshrestha, R., and Chowdhury, S. (2008). QuadBase: genome-wide database of G4 DNA--occurrence and conservation in human, chimpanzee, mouse and rat promoters and 146 microbes. *Nucleic acids research* *36*, D381-385.
- Yam, A.Y., Albanese, V., Lin, H.T., and Frydman, J. (2005). Hsp110 cooperates with different cytosolic HSP70 systems in a pathway for de novo folding. *The Journal of biological chemistry* *280*, 41252-41261.
- Yan, W., Schilke, B., Pfund, C., Walter, W., Kim, S., and Craig, E.A. (1998). Zuo1, a ribosome-associated DnaJ molecular chaperone. *The EMBO journal* *17*, 4809-4817.
- Zahler, A.M., Williamson, J.R., Cech, T.R., and Prescott, D.M. (1991). Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* *350*, 718-720.
- Zaidi, I.W., Rabut, G., Poveda, A., Scheel, H., Malmstrom, J., Ulrich, H., Hofmann, K., Pasero, P., Peter, M., and Luke, B. (2008). Rtt101 and Mms1 in budding yeast form a CUL4(DDB1)-like ubiquitin ligase that promotes replication through damaged DNA. *EMBO reports* *9*, 1034-1040.

Zakian, V.A. (2012). Telomeres: the beginnings and ends of eukaryotic chromosomes. *Experimental cell research* 318, 1456-1460.

Zaug, A.J., Podell, E.R., and Cech, T.R. (2005). Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10864-10869.

Zhang, S., Lockshin, C., Herbert, A., Winter, E., and Rich, A. (1992). Zuo1p, a putative Z-DNA binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 11, 3787-3796.

Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., *et al.* (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology* 9, R137.

Zheng, K.W., Xiao, S., Liu, J.Q., Zhang, J.Y., Hao, Y.H., and Tan, Z. (2013). Co-transcriptional formation of DNA:RNA hybrid G-quadruplex and potential function as constitutional cis element for transcription control. *Nucleic acids research* 41, 5533-5541.

7. Anhang

7.1 Tabellen

Tab. 7.1: In dieser Arbeit hergestellte Y1H-Screening-Stämme. Angegeben sind die *bait*-Sequenz und die minimale inhibitorische Aureobasidin A-Konzentration, die beim Screening und bei den Retransformationen eingesetzt wurde. G-Tracts oder C-Tracts sind fett gedruckt, Mutationen rot markiert.

Stamm	<i>bait</i> -Sequenz (5'-3')	AbA [ng/ml]
SG46 <i>bait</i> -G4	G4 IX (G4 _{ix}): TCCGAAATTTTGATTGGAGACTGATTGGAGGGTACGGTGGGTAATAA GGGAAGGTATCGGGATTGGGGTAGGCCATTAAGGGATAATTCCATTGCC ATTG	100
SG101 <i>bait</i> -mutG4	Mutiertes G4 IX (G4 _{mut}): TCCGAAATTTTGATTGGAGACTGATTGGAGCGGTACGGTGGGTAATAA CGCAAGCTATCGCGATTGCCGTAGCCATTAAGGGATAATTCCATTGCC ATTG	400
SG948 <i>bait</i> -C4	Komplementäres G4 IX: CAATGGCAATGGAATTATCCCTTAATGGCCTACCCCAATCCCGATACCT TCCCTTATTACCCACCGTACCCCTCCAAATCAGTCTCCAAATCAAATTT CGGA	100

Tab. 7.2: Proteine, die in Screening I mit G4_{ix} interagiert haben. Analyse mit BLAST identifizierte die dargestellten Gen-Fragmente als interagierende Proteine mit G4_{ix}.

BLAST	Vorkommen
NKP2, TAD3	1x
RPN6, SNU23	1x
ZUO1	5x
ZUO1, ERV29	18x

Tab. 7.3: Proteine der cDNA Bibliothek, die in den Y1H-Screenings II + III mit G4_{ix} interagiert haben. Analyse mit BLAST identifizierte das codierende Gen (Spalte 1). Durch Auswertung der Sequenzierungen wurde deutlich, welche Gene in frame mit der GAL4 AD enthalten waren (Spalte 5) und ob das komplette Gen oder nur Fragmente codiert wurden (Spalte 6). + bedeutet „ja“, - bedeutet „nein“, +/- bedeutet, dass abhängig vom Klon ja oder nein zutrifft. Ribosomale oder mit der Translation in Verbindung stehende Kandidaten sind grau markiert.

BLAST	Screen II	Screen III	Verwandte Proteine	in frame mit GAL4 AD?	Insert: komplettes Gen?
AAH1	3x	-		-	-
ACP1	1x	-		-	+
ACT1	-	1x		-	-
ADE5,7	1x	-		+	-
ADH1	2x	-		-	-
AGA1	1x	-		-	-
AHP1	1x	-		+	+
ARF1	1x	-		-	-
ARF2	1x	-	Screen II: ARF1	-	-

ARG1	2x	-		-	-
ARP3	-	1x		+	-
ATP4	1x	-		-	+
AVT7	1x	-		-	-
AYR1	1x	-		-	-
BUD22	-	1x		-	-
CBK1	1x	-		+	-
CCW12	5x	-		-	+
CDC19	2x	2x		+, -	-
CEG1	1x	-		-	-
CKA1	-	1x		-	-
COQ2	1x	-		+	-
CWP2	1x	1x		-	-
CYS4	1x	1x		-	-
DMA2	1x	-		-	-
DST1	-	1x		+	-
ENO2	-	1x		-	-
ERG26	-	1x		-	-
ERG3	1x	-		-	-
ERV46	1x	-		-	-
FBA1	2x	-		-	-
GAS3	-	1x		+	-
GLK1	1x	-		-	-
GPI16	1x	-		-	-
GSP2	1x	-		-	-
HOM2	1x	-		+	-
HSP104	2x	-		-	-
HSP150	3x	-		+, -	-
HST2	-	1x		-	-
HTA2	1x	-		-	+
HTB1	-	1x		-	-
HXK1	-	2x		-	-
HXT1	1x	-		+	-
ILV5	1x	-	Screen II: ILV6	-	-
ILV6	1x	-	Screen II: ILV5	-	+
KRE2	1x	-		+	-
KRR1	1x	-		-	+
LAP2	1x	-		+	-
LEO1	-	1x		+	-
LEU3	-	1x		-	-
LIF1	1x	-		+	-
LSM3	1x	-		-	+
MIG2	-	1x		+	-
MPP6	1x	-		-	-
NAM8	-	1x		-	-

NAT2	1x	-		-	-
NDE1	1x	-		+	-
NNT1	-	1x		-	-
NOP2	1x	-		+	-
NPL3	-	1x		-	-
NPP2	1x	-		-	-
NPY1	-	3x		-	-
NSG2	1x	-		+	-
NUD1	-	1x		+	-
PDA1	1x	-		-	-
PDB1	1x	1x		-	-
PDC1	1x	1x		-	-
PET9	1x	-		-	-
PFK2	1x	-		-	-
PGI1	-	1x		-	-
PGK1	7x	1x		-	-
PIL1	-	1x		+	-
PMA1	2x	1x		-	-
PSA1	-	1x		-	-
PWP2	-	1x		+	-
RAD23	-	1x		+	-
RAS1	1x	-		+	-
RBS1	1x	-		-	-
RDI1	-	1x		-	-
RFC5	1x	-		-	-
RIB5	-	1x		-	-
RPA12	-	1x		-	+
RPB24B	-	1x		-	+
RPL10	-	1x		-	-
RPL11A	2x	1x		+	+
RPL12A	1x	1x		-	+, -
RPL13A	-	1x		+	-
RPL14A	-	1x		+	+
RPL21B	2x	-		+	-
RPL22B	1x	-		-	-
RPL23B	-	4x		+	+, -
RPL27A	1x	-		-	-
RPL28	1x	-		-	-
RPL3	-	1x		-	-
RPL30	-	2x		-	-
RPL34B	1x	3x		-	+, -
RPL37A	1x	1x	Screen II: RPL37B	+, -	-
RPL37B	1x	-	Screen II + III: RPL37A	-	-

RPL38	1x	-		-	+
RPL40A	-	1x		-	-
RPL42B	1x	-		+	-
RPL43A	-	1x		-	-
RPL5	1x	-		-	-
RPN14	1x	-		+	-
RPN4	-	1x		+	-
RPN5	1x	-		-	-
RPP2A	2x	-		-	+
RPP2B	-	1x		-	-
RPS10A	1x	-	Screen III: RPS10B	-	-
RPS10B	-	1x	Screen II: RPS10A	+	-
RPS11A	1x	-		+	-
RPS12	1x	-		-	-
RPS17A	1x	-		-	-
RPS1A	1x	-		-	+
RPS22B	1x	-		-	-
RPS23B	4x	-		+, -	+, -
RPS24B	1x	1x		-	-
RPS3	2x	-		-	+
RPS6A	1x	1x		+	-
RPS7A	1x	-		+	-
RRP40	-	2x		+, -	+
RSM28	1x	-		-	-
SCS2	-	1x		-	-
SCS7	-	1x		+	-
SCW4	1x	-		+	-
SDH2	-	1x		+	-
SEC61	1x	-		-	-
SED1	7x	1x		+, -	-
SEH1	1x	-		-	-
SLX9	1x	1x		+	+
SPB1	1x	-		-	-
SSA2	-	1x		-	-
SUP45	1x	-		-	-
SUR4	-	1x		-	-
SYH1	1x	-		+	-
TAF9	1x	-		-	+
TCD2	1x	-		-	-
TDH2	-	1x	Screen I: TDH3	-	-
TDH3	1x	-	Screen III: TDH2	+	-

TEF1	1x	-	Screen II: TEF2	-	-
TEF2	1x	1x	Screen II: TEF1 Screen III: TEF1,4, YEF3	-	-
TEF4	-	1x	Screen II: TEF1,2 Screen III: TEF1,2, YEF3	-	-
TIM10	1x	-		-	-
TSA1	1x	-		-	+
UBP6	1x	-		-	-
UGA1	1x	-		-	-
URB1	-	1x		-	-
YCP4	-	1x		-	-
YDL129W	-	1x		-	-
YEF3	-	1x	Screen II: TEF1,2 Screen III: TEF1,2, TEF4	+	-
YKL063C	-	1x		-	-
YLR287C	1x	-		-	-
YNL165W	-	1x		-	-
YNL190W	2x	-		+	-
YOL036W	-	1x		-	-
YSC83	-	1x		+	-
YVH1	1x	-		-	-

Tab. 7.4: Interessante Kandidaten. Proteine, die in den Y1H-Screenings mit G₄_{ix} interagiert haben und aufgrund ihrer Beschreibung in der Literatur interessant als neue G₄-bindende Proteine waren. Zuo1 und Slx9 (fett) wurden in dieser Arbeit weiter untersucht. Der Spalte MS (Massenspektrometrie) kann entnommen werden, ob die Proteine durch Pull-Down ebenfalls als G₄-bindendes Protein identifiziert wurde (siehe Doktorarbeit Katharina Wanzek).

Protein	Beschreibung	MS	Deletion möglich?
Zuo1	Co-Chaperon im Cytoplasma; Funktionen im Nukleus bei der Transkription		✓
Slx9	Notwendig bei Prozessierung der prä-rRNA; hefe-spezifisch; synthetischer Fitness-Defekt $\Delta slx9 \Delta sgs1$		✓
Ras1	Homolog zum RAS Protooncogen		✓
Mig2	Zink-Finger-Transkriptions-Repressorprotein; bindet an GC-reiche Sequenzen		✓
Rpn4	Transkriptions-Faktor; Verteilung im Nukleus steigt bei DNA Replikationsstress an	✓ family	✓

Rpa12	Untereinheit der RNA Polymerase I	✓	✓
Taf9	Untereinheit von TFIID und SAGA; Involviert bei RNA Pol II Transkriptions-Initiation und Chromatin-Modifizierung	✓ family	<i>taf9-ts2</i>
Arp3	<i>Actin-related protein</i> ; Komponente des Arp2/3-Komplex; ARPC2-Untereinheit von Arp2/3 hat G4 in 5'UTR	✓ family	-
Act1	Actin; Transkriptions-Faktor; G4-Motiv im Promotor	✓	-

Tab. 7.5: Auswertung der CHIP-Seq-Daten von Zuo1-Myc Δ sgs1.

Überlappung mit	Zuo1-Myc Δ sgs1	
G4-Motiv (tract3)	enriched	p = 0,0391
Promotor	enriched	p = 0,054
Replikationsursprung	enriched	p = 0,0865
DNA Pol2 WT	enriched	p < 0,0001
DNA Pol2 <i>pif1-m2</i>	enriched	p < 0,0001
Pif1	depleted	p = 0,1677
Pif1 KA	depleted	p = 0,087

Tab. 7.6: Sequenzen der GCR-Insertionen am *PRB1*-Locus der GCR-Stämme. Angegeben ist nur der relevante Teil der Sequenzen.

Insertion	Sequenz (5'-3')
G4 _I	GGGGTGGGGTGTACTGATGAGAATTGGGGGAATTTTGAGATAATTGTTGGG
G4 _{IV}	GGGGAGGGGAAGGGGAGGGG
Kontroll-Sequenz	CTAATCTTTTCAGCGTTGTAAATGTTGGTACCCAAACCCAATTGTCTACAAGTTT CCTTAGC
G-reiche Kontroll-Sequenz	ATGGTGGTCATCTCAGTAGATGTAGAGGTGAAAGTACCGGTCCATGGCTCGGT

Tab. 7.7: Korrelation der Microarray-Daten mit weiteren annotierten genomischen Regionen. NMM-S sind Gene, deren Deletion zu höherer Sensitivität gegenüber NMM führt, NMM-R sind Gene, deren Deletion zu höherer Resistenz gegenüber NMM führt (Hershman et al., 2008).

Überlappung mit	Δ zuo1		Δ sgs1		Δ zuo1 Δ sgs1	
DNA Pol2 <i>pif1-m2</i>	enriched	p < 0,0001	enriched	p = 0,3429	enriched	p = 0,0013
γ H2A <i>pif1-m2</i>	enriched	p < 0,0001	enriched	p < 0,0001	enriched	p < 0,0001
Pif1 KA	enriched	p < 0,0001	enriched	p = 0,2462	enriched	p = 0,0003
NMM-S	depleted	p = 0,1525	depleted	p = 0,1243	depleted	p = 0,0489
NMM-R	enriched	p = 0,4314	depleted	p = 0,1724	depleted	p = 0,036

Tab. 7.8: Auswahl regulierter Gene im Microarray. Gene, deren Expression in $\Delta zuo1$, $\Delta sgs1$ oder $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert waren, sind rot markiert. Gene mit geringerer Expression im Vergleich zum Wildtyp sind grün markiert. Aufgelistet sind Kandidaten, die ein G4-Motiv im Promotor aufweisen oder in DNA Replikation und Reparatur involviert sind.

Gen	Systematischer Name	$\Delta zuo1$	$\Delta sgs1$	$\Delta zuo1 \Delta sgs1$	Beschreibung
RAD34	YDR314C	1	-1	0	NER, Homolog zu RAD4
YJL107C	YJL107C	1	0	1	unbekannte Funktion; Promotor-G4
IMP2'	YIL154C	1	0	1	Involviert in Schutz der DNA gegen Schäden durch Bleomycin und andere Oxidantien
SPC24	YMR117C	1	0	0	Involviert in Chromosomen-Segregation und Spindel-Checkpoint-Aktivitaet
BFA1	YJR053W	1	0	0	Involviert in mehrere Zellzyklus-Checkpoint-Pathways, die den Austritt aus der Mitose kontrollieren; speziell benötigt bei Schädigung der Telomere
RAD28	YDR030C	1	0	0	Verwandt mit humanen CSA, das in TC-NER involviert ist
GSY1	YFR015C	-1	0	0	Glycogen Synthase; Promotor-G4
MAG1	YER142C	-1	0	0	DNA Glycosylase; involviert in den Schutz der DNA gegen alkylierende Agenzien; Initiation der BER
RGI1	YER067W	-1	0	0	unbekannte Funktion; Anreicherung in Folge der DNA Replikation
TMA10	YLR327C	0	1	1	unbekannte Funktion; Ribosomen-assoziiert; Anreicherung in Folge von Replikationsstress; Promotor-G4
PAI3	YMR174C	0	1	1	Proteinase A Inhibitor; Promotor-G4
ATG39	YLR312C	0	1	1	unbekannte Funktion; Promotor-G4
PRB1	YEL060C	0	1	1	Proteinase; Promotor-G4
SOL4	YGR248W	0	1	1	Anreicherung in Folge von Replikationsstress
RNR3	YIL066C	0	1	0	Involviert in dNTP Synthese
ABF1	YKL112W	0	-1	0	DNA bindendes Protein; involviert u.a. in DNA Replikation und Reparatur
CLB6	YGR109C	0	-1	-1	involviert in Replikation
MSC1	YML128C	0	0	1	unbekannte Funktion; Promotor-G4
DDI2	YFL061W	0	0	1	unbekannte Funktion; Expression durch DNA Schaden 100-fach induziert
DDI3	YNL335W	0	0	1	unbekannte Funktion; Expression durch DNA Schaden 100-fach induziert
HXT5	YHR096C	0	0	1	Hexose Transporter; Promotor-G4
DLD1	YDL174C	0	0	1	D-Lactat Dehydrogenase; Promotor-G4
FMP46	YKR049C	0	0	1	Redox Protein; Promotor-G4
YCL049C	YCL049C	0	0	1	unbekannte Funktion
MIX17	YMR002W	0	0	1	Mitochondriales Protein; Anreicherung in Folge der Replikation
IZH3	YLR023C	0	0	1	Membran-Protein; Promotor-G4

MHR1	YDR296W	0	0	1	Ribosomales Protein in Mitochondrien; involviert in HR und Stimulation der Replikation in Folge von oxidativen Stress in Mitochondrien
RAD16	YBR114W	0	0	1	GG-NER
YPK2	YMR104C	0	0	1	Protein Kinase; Promotor-G4
YGR117C	YGR117C	0	0	-1	unbekannte Funktion; Promotor-G4
SHU2	YDR078C	0	0	-1	Komponente des Shu-Komplex fuer fehlerfreie DNA Reparatur
CSM2	YIL132C	0	0	-1	Komponente des Shu-Komplex fuer fehlerfreie DNA Reparatur

Tab. 7.9: G4-Motive und Mutationen in Hefestämmen für Messung der Expression durch qPCR. Zur Messung der Expression von *SOL4*, *QNQ1* und *OM14* wurden die angegebenen Stämme verwendet, die ein G4-Motiv (grau, G-Tracts fett) im Promotor oder auf dem komplementären Strang haben. Mutationen sind rot markiert, **ATG** ist der Start des ORF des jeweiligen Genes.

Stamm	Wichtiges Merkmal	Sequenz
SG952 SG1073 SG1097 SG1128	G4 <i>SOL4</i> Promotor	CCCAGGAACGTTTTAAAGTGGTCAACTGTGTGGGGCCCGTTCAAG AATGGGAGGTATTGGGACGGGTGGACGTTTTAAGCATAACATTTAT GTGCACTGTAAGTAATTATATAGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTCATATCTGTCAATACTTGAAAATGTTCTAGTTAGAGATTTA CGTATACTGATCGCTTGCCTTCGCAAGGGATGGAAATCCCTTGA AAATTAATAAATCCCCCCCTAAGCAGCGAAAATTGTAAGATCC ATAATATTTAAGAAATGACGAAGAACGTAGTCTTATCGCAGCAG TTTTCCAACAAGAATGCCATTCATCAAATAATCCACAACCAC CTCAAGAAAA ATG
SG960 SG1074 SG1114 SG1124	G4 _{mut} <i>SOL4</i> Promotor	GGGGCCCGTTCAAGAATGGGAGGTATTGAAACGGG
SG951 SG1063 SG1104 SG1102	G4 <i>QNQ1</i> Promotor	TTGACAGTTAA CCCTCCGGACCCCC TAC CCCC GGTGTG CCCC GG TCCATCTATCCATTTTTCGGTAACCCCTTTGCGCGACAGCTGCT TATCAAGGTACCTGGATCGAGCCATAAAAATTGATCTACACAGA TGAGATGGGGCATTGGGATATATTATTAGTCGGAGTATCATTAT AGTTATTCAGTTTTATGCAGGTTACTGGCCAAACGTTTTTCTTC ATTTGGAATAATCGTTTAGGAGCTACTGTTCCGGTATAAAGTAA CAAGCACAGTAGCAGAGTAATACGCAGTGACGATAATAGAGACT AGTAAAACAGTCGAGTTGTCCGGACCTAAA ATG
SG955 SG1060 SG1117 SG1121	G4 _{mut} <i>QNQ1</i> Promotor	CCCTCCGGACCCCC TAC TT CGGTGTG CCCC
SG952 SG1073 SG1097 SG1128	G4 <i>OM14</i> Promotor	ACTTACGTTTTATTTTTTACCAGT CCCC TTT CCCTG CCCTACTA CCCC GGGCCAGCGCCAATGACGCCGCCGCTACCTCCTCTCCCG TTAATCGTCCCTGCGTATATAAAGTGTGCGATCAATGTGCCCACT TCAACCGAAACCGCCGACGTAACCCTATTCCAACAATTAGAAAC ATAACATCTACCTCCAGCATCTCATAAT ATG
SG958 SG1108 SG1110 SG1127	G4 _{mut} <i>OM14</i> Promotor	CTTCTTTCTCTGCTCTACTACTTC

7.2 Abbildungen

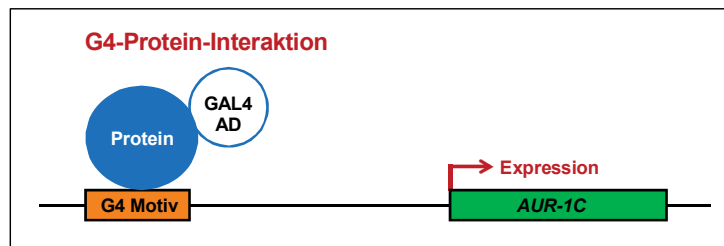


Abb. 7.1: Schema des Hefe-Ein-Hybrid-Systems. Ein G4-Motiv von Chromosom IX wurde als *bait*-Sequenz in das Genom von Y1HGold integriert. Proteine der Hefe cDNA Bibliothek werden als Fusion mit der GAL4AD exprimiert. Kommt es zu einer Interaktion eines Proteins mit der G4-Struktur, wird das Reportergen (*AUR-1C*) exprimiert.

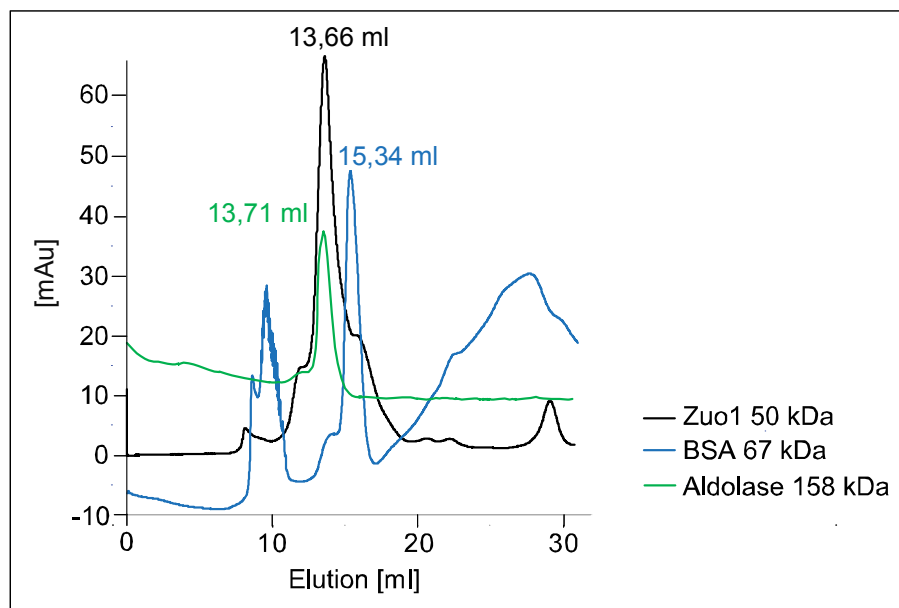


Abb. 7.2: Ergebnis der Gelfiltration mit aufgereinigtem Zuo1. Zuo1 wurde bei 13,66 ml von der Superdex 200-Säule eluiert. Die Standardproteine BSA und Aldolase wurden bei 15,34 ml und 13,71 ml eluiert. Somit könnte Zuo1 als Trimer vorliegen.

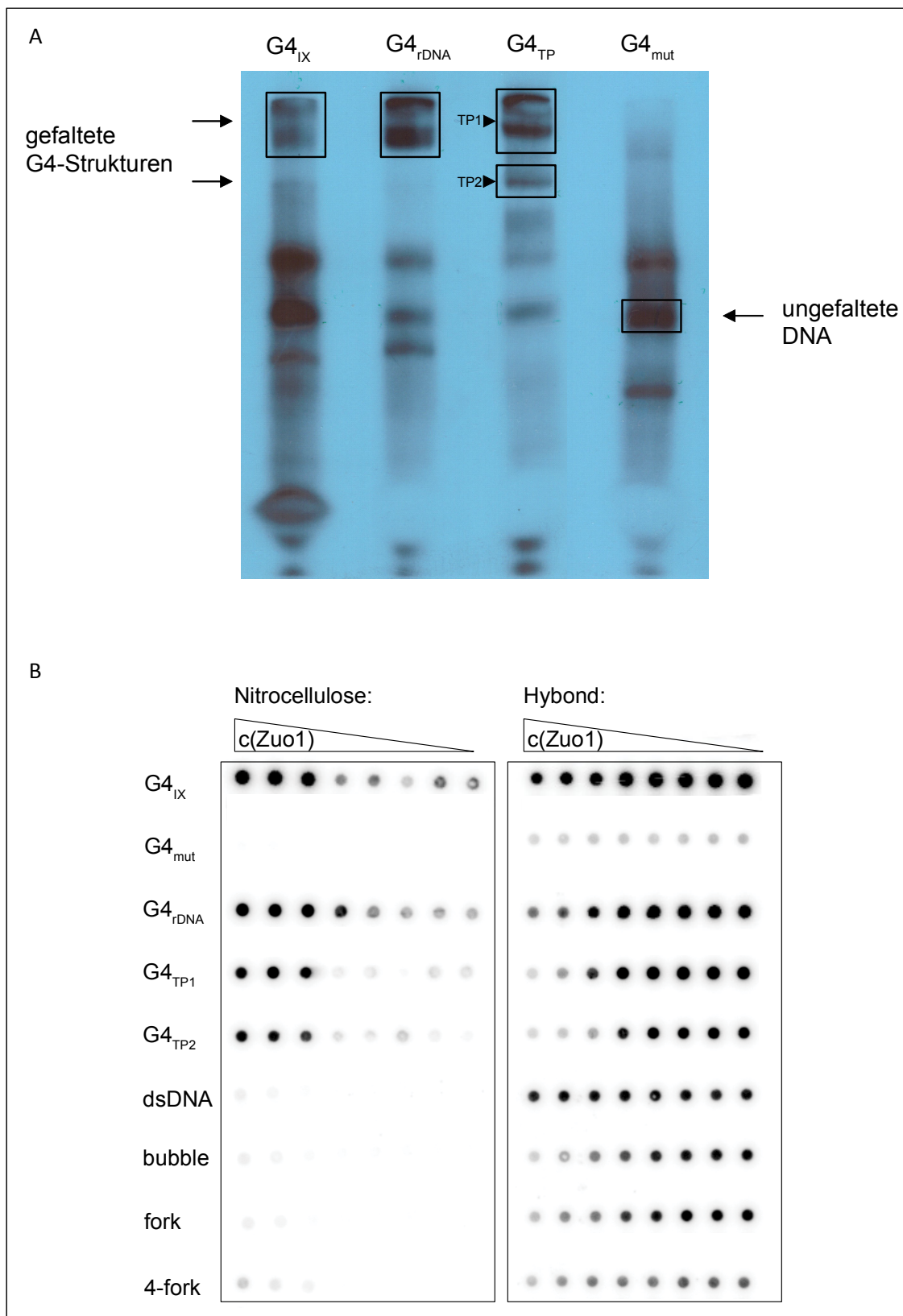


Abb. 7.3: Doppel-Filterbindungsassay mit aufgereinigtem Zuo1. Kontrolle der gefalteten und radioaktiv markierten G4-Strukturen durch A) Auftrennung auf einem nativen 7% PAA-Gel mit anschließender Belichtung eines Films (60 sec) B) Autoradiographie der Nitrocellulose- und Hybond-Membranen. Für den Doppel-Filterbindungsassay wurden 0 bis 20 μ M Zuo1 und 20 pmol DNA eingesetzt. n=3.

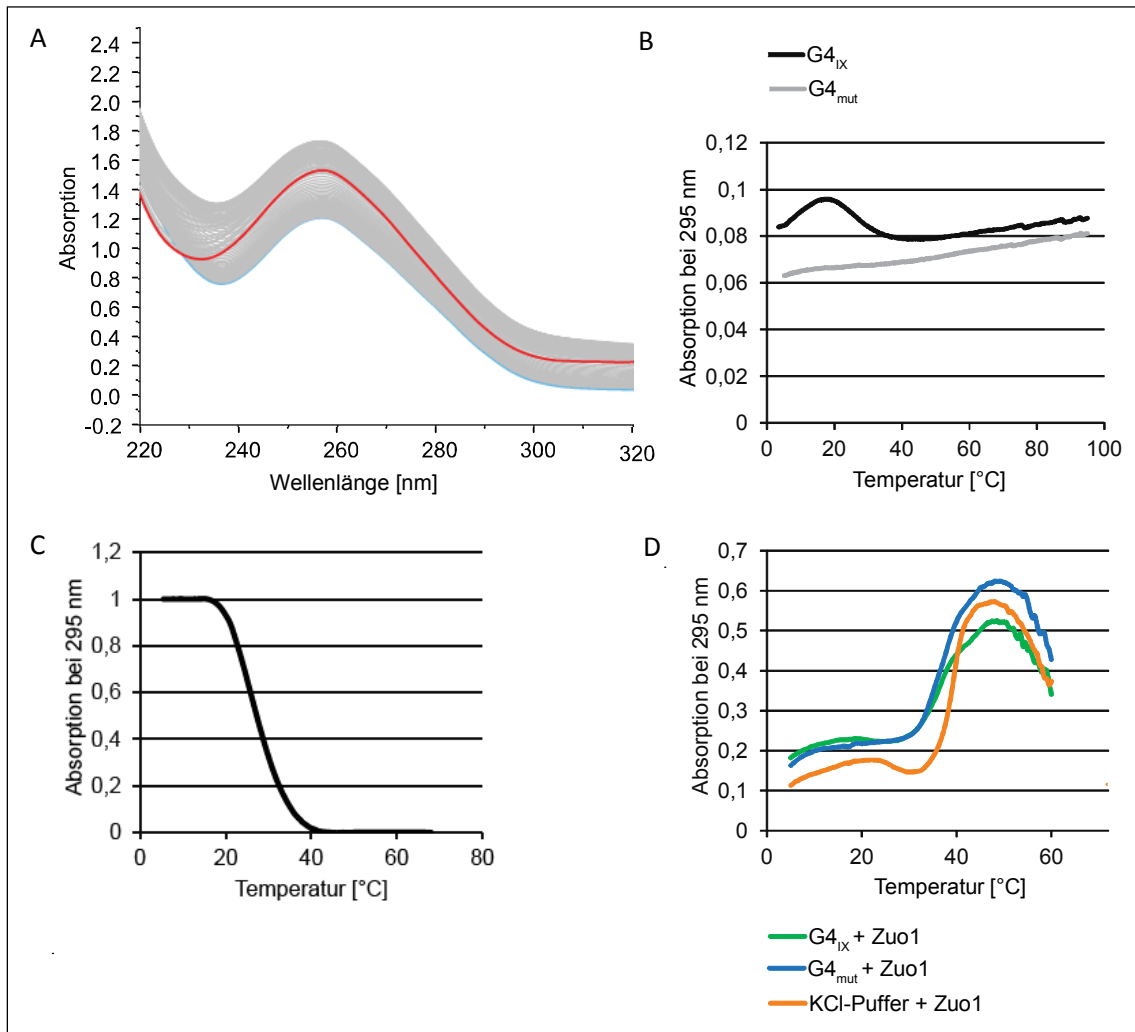


Abb. 7.4: Ergebnisse der Schmelztemperatur-Messungen. A) Kontrolle des Temperaturgradienten von 5°C (blau) bis 95°C (rot) im Spektrum von 220 nm bis 320 nm. B) Die Messung der Absorption von $G4_{IX}$ und $G4_{mut}$ bei 295 nm im Temperaturgradient von 5°C bis 95°C zeigte, dass $G4_{IX}$ gefaltet war und $G4_{mut}$ nicht. C) Normalisierte Auftragung der Absorption von $G4_{IX}$ bei 295 nm. Der Schmelzpunkt von $G4_{IX}$ lag bei 30°C. D) Zugabe von Zuo1 im molaren Verhältnis 1:1 zu $G4_{IX}$, $G4_{mut}$ sowie dasselbe Volumen in KCl-Puffer. Der Temperaturgradient ging von 5°C bis 60°C. Zuo1 denaturierte bei 30°C.

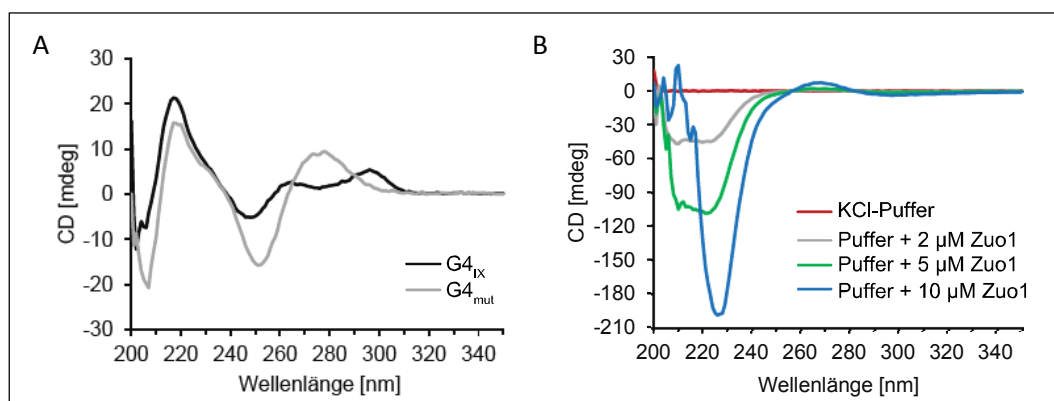


Abb. 7.5: Kontrollen zur CD Titration. A) CD Spektren nach Faltung der Oligonukleotide in 10 mM Tris + 100 mM KCl. $G4_{IX}$ lag als Mischung von parallelen und antiparallelen G4-Konformationen vor. $G4_{mut}$ war ungefaltet. B) CD Spektrum von KCl-Puffer sowie nach Zugabe steigender Zuo1-Konzentrationen. Zuo1 hat ein Minimum zwischen 220 und 230 nm, der Graph überlappt mit dem charakteristischen G4-Minimum. Nur bei 10 μ M Zuo1 ist ein kleiner Anstieg im Bereich des G4-Maximums sichtbar.

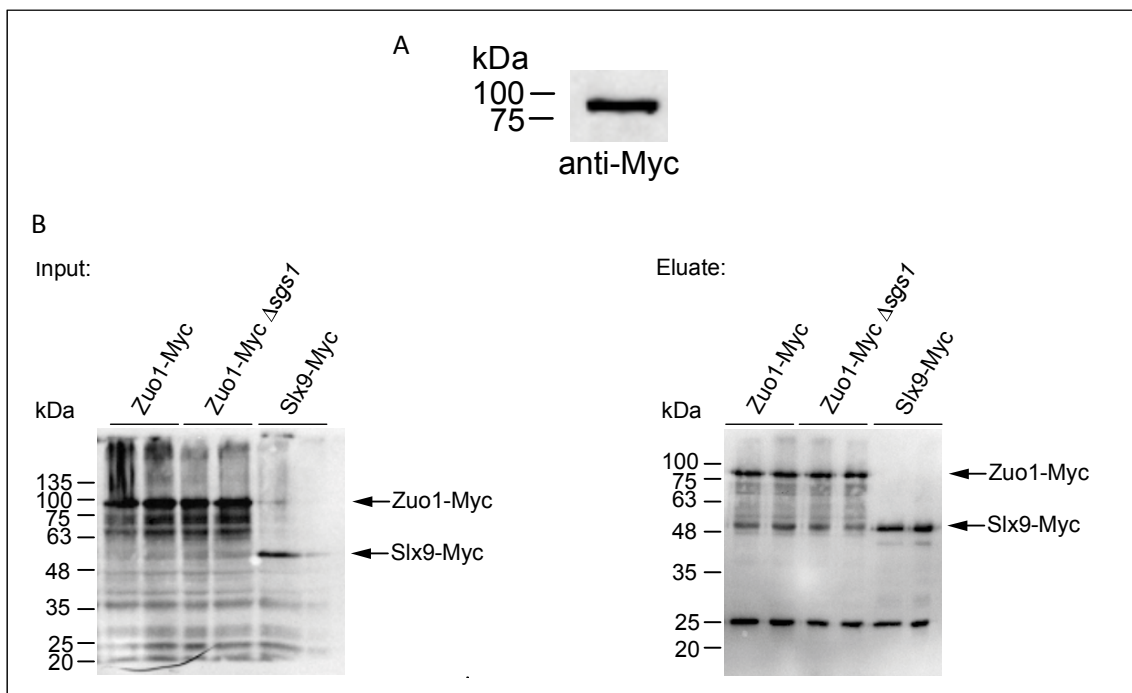


Abb. 7.6: Kontrolle von Zuo1-Myc. A) Kontrolle des Hefestammes. Im Western Blot mit anti-Myc Antikörper ist die erwartete Bande von Zuo1-Myc bei 80 kDa sichtbar. B) Kontrolle der ChIP-Seq Input- und Eluat-Proben. Im Western Blot mit anti-Myc Antikörper sind die erwarteten Banden sichtbar: Zuo1-Myc 80 kDa, Slx9-Myc 54 kDa.

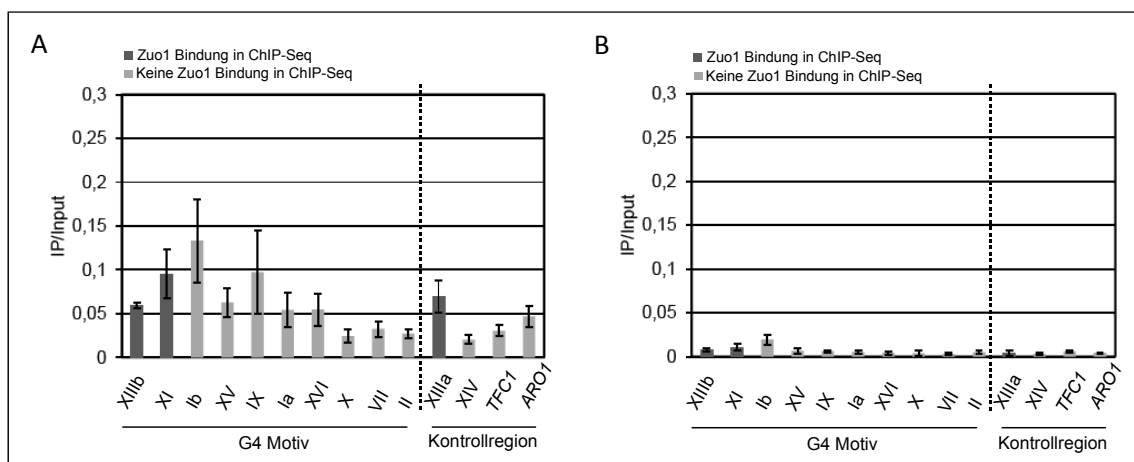


Abb. 7.7: ChIP Zuo1-Myc. A) ChIP Zuo1-Myc Δ sgs1. B) ChIP Wildtyp ohne Myc-Tag.

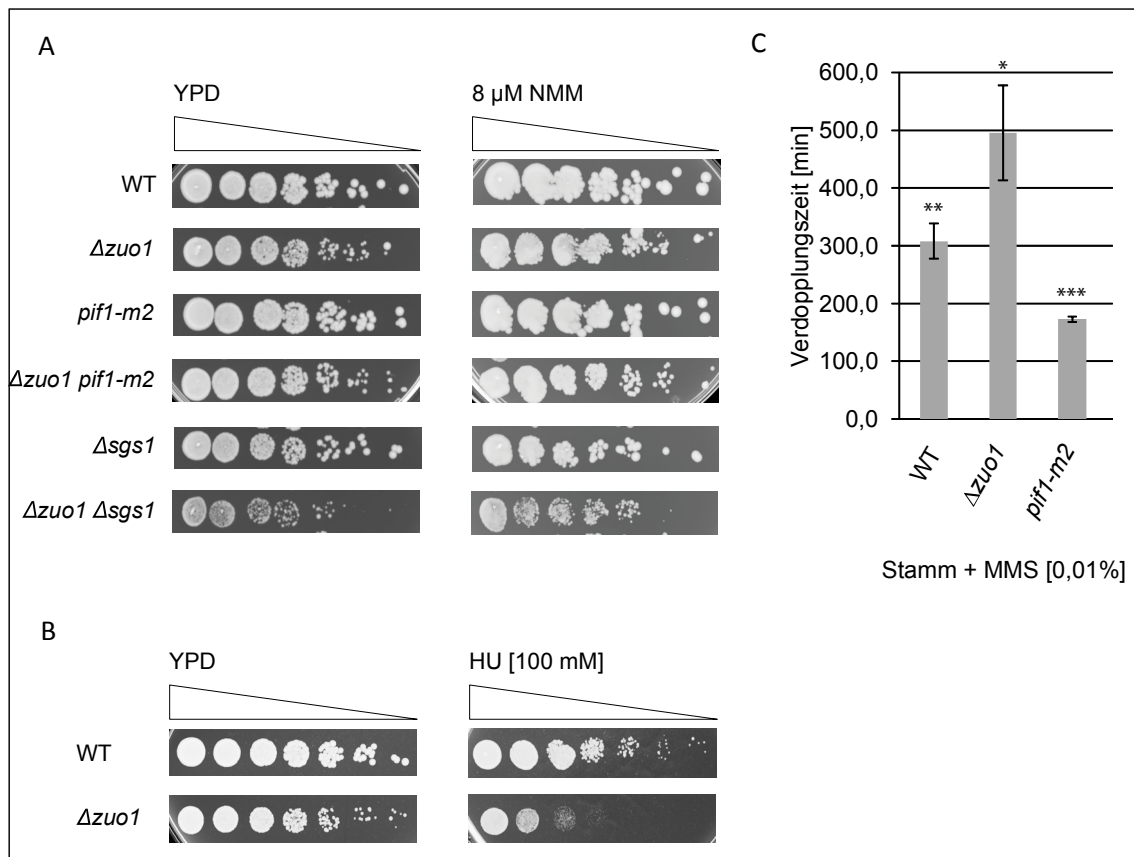


Abb. 7.8: Weitere Wachstumsanalysen. A) Spotttests der verschiedenen Mutanten auf YPD und YPD + 8 μ M NMM. B) Spotttest von WT und $\Delta zuo1$ auf YPD und YPD + 100 mM HU. C) Verdopplungszeiten der angegebenen Stämme in Medium mit 0,01% MMS. Für $\Delta zuo1 pif1-m2$, $\Delta sgs1$ und $\Delta zuo1 \Delta sgs1$ konnten aufgrund des starken Wachstumsdefekts keine Verdopplungszeiten berechnet werden. n=3, Signifikanz berechnet mit Student's Ttest: * \leq 0,05, ** \leq 0,01, *** \leq 0,001.

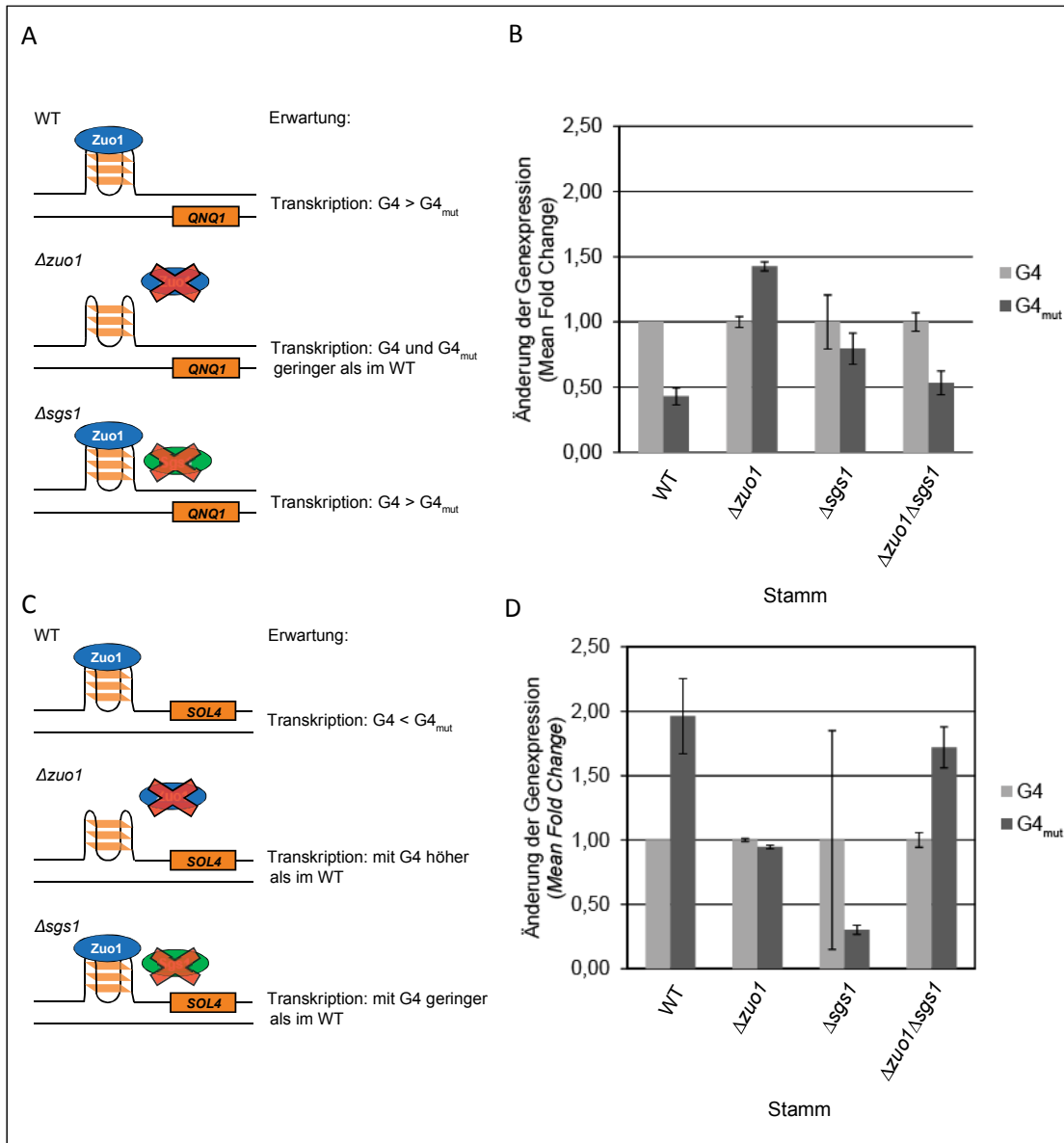


Abb. 7.9: Quantifizierung der Expression von *QNQ1* und *SOL4*. A+C) Eine G4-Struktur auf dem komplementären Strang begünstigt nach dem Modell (Bochman et al., 2012) die Transkription von *QNQ1* (A), wohingegen die G4-Struktur im Promotor die *SOL4* Expression inhibiert (C). Durch die Deletion von *ZUO1* und *SGS1* ergeben sich verschiedene Erwartungen für die Genexpression mit $G4$ oder mutiertem $G4$. B+D) Quantifizierung der Expression von *QNQ1* (B) und *SOL4* (D) durch qPCR. n=3.

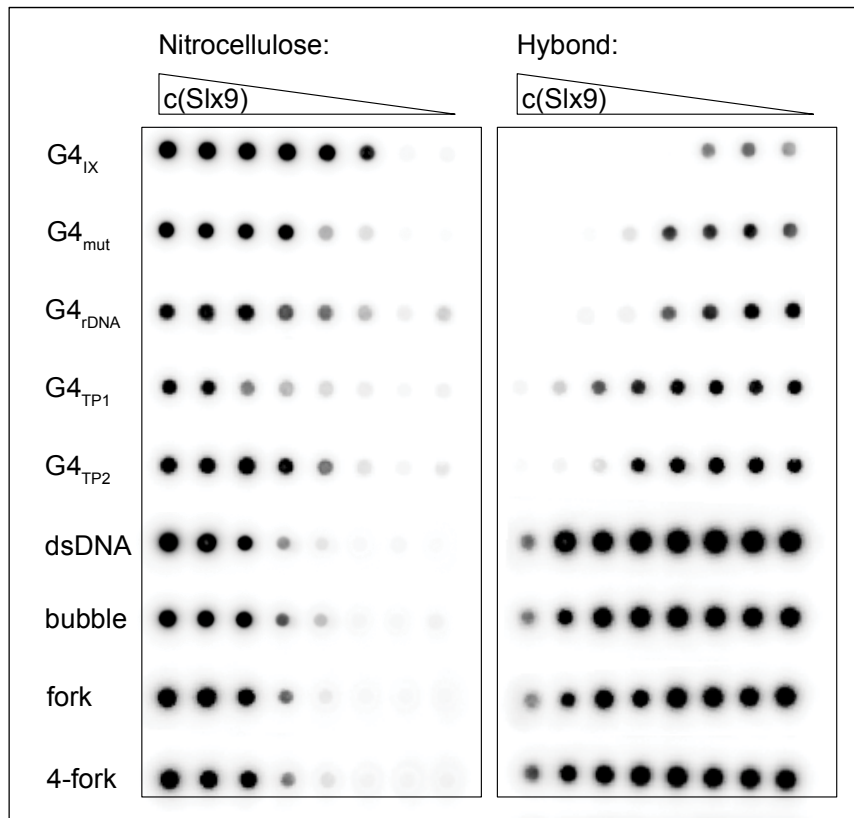


Abb. 7.10: Doppel-Filterbindungsassay mit aufgereinigtem Slx9. Autoradiographie der Nitrocellulose- und Hybond-Membranen. Für den Doppel-Filterbindungsassay wurden 0 bis 65 µM Slx9 und 20 pmol DNA eingesetzt. n=3.

Publikationen

Goetz, S., Kazemier, H.G., Paeschke, K. (2017). Zuo1, a novel G4-binding protein. In preparation.

Pandey, S.*, Goetz, S.*, Bartsch, S., Paeschke, K. (2017). Slx9. In preparation. * equal contribution

Curriculum Vitae

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Dr. Katrin Paeschke für die Betreuung meiner Promotion und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Dankbar bin ich ihr außerdem für die Möglichkeit, an internationalen Konferenzen teilzunehmen sowie sechs Monate am ERIBA in Groningen, NL, verbringen zu dürfen.

Meinen Betreuern Prof. Dr. Hans-Joachim Lipps und Prof. Dr. Stefan Gaubatz danke für ihr Engagement und ihre Unterstützung während der letzten Jahre, sowie Prof. Lipps für die Übernahme des Zweitgutachtens. Bei Prof. Dr. Alexander Buchberger möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Für die Unterstützung während der letzten Jahre in Würzburg und in Groningen möchte ich mich herzlich bei Dr. Stefan Juranek bedanken, speziell für die Auswertung der ChIP-Seq Daten und jegliche bioinformatische Hilfe.

Mein Dank geht ebenso an die gesamte Arbeitsgruppe von Dr. Paeschke, speziell an Inge Kazemier und Sabrina Bartsch, die in dieses Projekt involviert waren. Dr. Satya Pandey danke ich für die Hilfe bei CD Titrationsexperimenten und die große Diskussionsbereitschaft. Dr. Katharina Wanzek, meine jahrelange Kollegin vom ersten Tag an, möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit und für die Bereitstellung einiger Hefestämme und Oligonukleotide für diese Arbeit. Bei Eike Schwindt bedanke ich mich für jegliche Hilfe im Laboralltag. Claudia Grasso danke ich für die Durchführung einiger Wachstumskurven.

Mein Dank geht ebenso an den Lehrstuhl für Biochemie in Würzburg für die Kollegialität, an die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Alexander Buchberger für die Hilfe beim Benutzen des Zell-Homogenisators, von Prof. Dr. Martin Eilers für Hilfe bei FACS-Experimenten, von Prof. Dr. Stefan Gaubatz für Hilfe beim Sonifizieren, von Prof. Dr. Frank Würthner für Hilfe bei CD und UV Spektroskopie.

Am ERIBA in Groningen danke ich besonders Inge Kazemier sowie den Arbeitsgruppen von Dr. Michael Chang und Dr. Liesbeth Veenhoff für ihre Unterstützung bei meinem Projekt und ihre Hilfsbereitschaft. Sie haben es mir leicht gemacht, mich dort sehr wohl zu fühlen. Bei Dr. Diana Spierings, Nancy Halsema und Jorn Staal möchte ich mich für die Hilfe beim ChIP-Seq

bedanken, ebenso Dr. Victor Guryev für bioinformatische Unterstützung sowie Dr. Wesley Browne von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ben Feringa für Hilfe bei CD Messungen.

Prof. Dr. F. Brad Johnson danke ich, dass er einige Hefestäme zu Verfügung gestellt hat. Bei Dr. Michael Walter von der Firma Agilent Technologies bedanke ich mich für die Durchführung des Microarray.

Auch bei der Graduate School of Life Sciences, die mir die Teilnahme an vielen interessanten Workshops ermöglicht und mich bei meinem Aufenthalt in Groningen finanziell unterstützt hat, möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Insbesondere das Mentoring-Programm der GSLS behalte ich in sehr guter Erinnerung. Mein besonderer Dank geht ebenfalls an meine Mentorin Dr. Petra Arndt, die mich auch über das Programm hinaus sehr unterstützt.

Besonders danke ich meiner Familie, auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen kann.

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "Zuo1 - ein neues G-Quadruplex-bindendes Protein" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 09.06.2017
Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation "Zuo1 - a novel G-quadruplex binding protein" eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 09.06.2017
Ort, Datum

Unterschrift