

II Abstract

Four-stranded nucleic acid G-quadruplex (G4) secondary structures form in guanine-rich regions across the genome. G4s have been reported to form in nucleosome-depleted regions which are associated with high transcriptional activity and may act as binding sites for transcription factors. Altered G4 formation has been demonstrated in diseases like cancer, as well as physiological processes like ageing. Moreover, changes in the presence G4 structures within the cell-free DNA proportion of blood plasma from cancer patients has been suggested. Despite the strong evidence for G4s to play an important role in cancer, the existence and possible functions of such structures in the tumour microenvironment remains unknown. To address this, G4 chromatin immunoprecipitation and sequencing data from the tumour microenvironment compartment of breast cancer patient-derived xenograft models have been analysed and revealed striking differences in differential G4 regions across different cancer models associated with highly transcribed genes in genetically identical avatars. Utilisation of RNA sequencing data demonstrated macrophages, a phagocytotic immune cell type that has been shown to play a crucial role in establishing a pro-cancer tumour microenvironment, as the most enriched cell type in the breast cancer models. By treated macrophages *in vitro* with triple-negative breast cancer conditioned medium, an explosive proliferation phenotype has been overserved. Moreover, the treated macrophages exerted strong alterations in their G4 landscapes. Phenotypically, treated macrophages presented a strong down regulation of MHC II pathways while dramatically increasing the secretion of immune modulatory (pro)-inflammatory cytokines. Employment of *in silico* prediction based on the G4 mapping data in macrophages revealed the POU family member OCT1 as most significantly activated upon cancer stimulation. Moreover, the OCT1-interacting Glucocorticoid Receptor (GR) has been found to become activated as well in treated macrophages. In vitro knockout experiment confirmed that the phenotypical changes of macrophages upon cancer stimulation were dependent on OCT1 and GR activity. The development of DynaTag, an improved CUT&Tag technique suitable for transcription factors, allowed for the direct demonstration of the role of OCT1 and GR in regulating cytokine and MHC II genes. Lastly, analysis of the cell-free DNA fraction of breast cancer models has elucidated triple-negative breast cancer to release increased amounts of cell-free DNA G4s and data suggests cell-free G4s as messenger molecules to activate OCT1 and GR in tumour-associated macrophages. Thereby, the data generated in this thesis, for the first time, experimentally confirmed the presence of cell-free G4s and proposed a biological function of such cell-free structures.

III Zusammenfassung

Viersträngige Nukleinsäure G-Quadruplex (G4) Sekundärstrukturen bilden sich in guaninreichen Regionen des Genoms. Es wurde berichtet, dass G4s in nukleosom-depletierten Regionen, die mit hoher Transkriptionsaktivität assoziiert sind, vorkommen und als Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren fungieren können. Veränderungen in der G4-Bildung wurden bei Krankheiten, wie Krebs, sowie bei physiologischen Prozessen, wie dem Altern, nachgewiesen. Darüber hinaus wurden Veränderungen der G4-Prävalenz in der zellfreien DNA im Blutplasma von Krebspatient*Innen prognostiziert. Trotz der starken Hinweise auf die wichtige Rolle von G4s im Krebs, bleibt die Existenz und mögliche Funktionen solcher Strukturen in der Tumormikroumgebung unbekannt. Um dies zu adressieren, wurden G4-Chromatinimmunpräzipitationssequenzierungsdaten aus der Tumormikroumgebung von brustkrebspatient*Innenabgeleiteten Xenograftmodellen analysiert, was substanzielle Unterschiede in den differentiellen G4-Regionen zwischen verschiedenen Krebsmodellen aufdeckte, die mit hoch transkribierten Genen in genetisch identischen Avataren assoziiert sind. Die Nutzung von RNA-Sequenzierungsdaten zeigte Makrophagen, eine phagozytierende Immunzellart, die eine entscheidende Rolle bei der Etablierung einer protumoralen Mikroumgebung spielt, als die am stärksten angereicherte Zellart in den Brustkrebsmodellen. Durch die Behandlung von Makrophagen *in vitro* mit konditioniertem Medium von dreifach-negativen Brustkrebszellen wurde ein explosiver Proliferationsphänotyp beobachtet. Darüber hinaus zeigten die behandelten Makrophagen starke Veränderungen in ihrer G4-Landschaft. Phänotypisch präsentierten die behandelten Makrophagen eine starke Herunterregulierung der MHC-II-Wege, während die Sekretion von immunmodulatorischen, (pro)-inflammatorischen Zytokinen dramatisch zunahm. Der Einsatz von *in silico* Vorhersagen, basierend auf den G4-Kartierungsdaten in Makrophagen, ergab, dass das POU-Familienmitglied OCT1 am signifikantesten durch die Krebsstimulation aktiviert wurde. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass der OCT1-interagierende Glukokortikoidrezeptor (GR) ebenfalls in behandelten Makrophagen aktiviert wurde. *In vitro* Knockoutexperimente bestätigten, dass die phänotypischen Veränderungen der Makrophagen nach Krebsstimulation von der Aktivität von OCT1 und GR abhängen. Die Entwicklung von DynaTag, einer verbesserten CUT&Tag-Technik für Transkriptionsfaktoren, ermöglichte den direkten Nachweis einer Rolle von OCT1 und GR bei der Regulierung von Zytokin- und MHC-II-Genen. Letztlich zeigte die Analyse der zellfreien DNA-Fraktion von *in vitro* Brustkrebsmodellen, dass dreifach-negativer Brustkrebs erhöhte Mengen zellfreier DNA-G4

freisetzt, und die Daten deuten darauf hin, dass zellfreie G4s als Botenmoleküle zur Aktivierung von OCT1 und GR in tumorassoziierten Makrophagen dienen können. Damit haben die, in dieser Arbeit generierten, Daten zum ersten Mal experimentell die Existenz von zellfreien G4s bestätigt und diesen eine potenzielle, biologische Funktion zugeordnet.