

# Mobilität und Dynamik im Zellkern

CHRISTOPH CREMER

Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB), Universität  
Heidelberg

Institut für Molekulare Biologie (IMB) und Physik Department, Universität Mainz

Kirchhoff-Institut für Physik (KIP) & Interdisziplinäres Zentrum für  
Wissenschaftliches Rechnen (IWR), Universität Heidelberg

## Zusammenfassung

Vor rund 180 Jahren wurde der Zellkern entdeckt als eine abgegrenzte Einheit innerhalb der Zellen, aus denen alle Organismen dieser Erde aufgebaut sind. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurde postuliert, dass der Kern der Sitz der die Lebensvorgänge steuernden Erbinformation ist; vor rund 70 Jahren schließlich entschlüsselten James D. Watson und Francis Crick das Geheimnis der DNA-Doppelhelix. Viele Jahrzehnte hindurch erschien die im Zellkern lokalisierte DNA als ein „inertes Speichermedium“, einem linearen - von seltenen Mutationen abgesehen - unveränderlichen Programmcode entsprechend. Dieses Bild hat sich in den letzten Jahrzehnten gründlich gewandelt. Heute wird immer deutlicher, dass es sich bei dem Zellkerngenom um eine ungeheuer komplexe und hoch dynamische Organisation handelt, dessen raum-zeitliche Struktur von fundamentaler Bedeutung für die vielfältigen Aufgaben der Genregulation ist.

## 1 Einleitung

„Wo kann man ein schnelles Zebra oder einen brüllenden Löwen bestellen?“ Für Biologen ist die Antwort klar: Natürlich nur bei Nature Inc.! Die Natur allein ist fähig, dynamische Systeme mit so vielfältig verwobenen biochemischen Vorgängen und Signalsteuerungsmechanismen; kurz gesagt mit so verwickelten und

gleichzeitig robusten Strukturen zu ‚produzieren‘. Ganz einfach war dies nicht, schließlich dauerte es Milliarden von Jahren, bis nach unzähligen Rückschlägen aus fundamentalen Naturgesetzen solch unvorstellbar komplexe Gebilde ‚emergierten‘. Die „Steuerzentrale“ für die damit verbundenen vielen Tausende von biochemischen Prozessen und ihre zeitliche Abfolge liegt im Zellkern-Genom, also der Gesamtheit der dort befindlichen DNA.

Heute wissen wir, dass dieses Genom keine statische Größe im Sinne eines unveränderbaren linearen Programmcodes ist, sondern vielfältigen dynamischen „epigenetischen“ Modifikationen unterliegt: Der morgendliche Lichtstrahl, jedes Frühstück, Vitaminpillen und Arzneimittel, aber auch sportliche Betätigung, Druck und Stoß, Musik, Straßenlärm, der Duft einer Blume oder der Anblick eines schönen Bildes können zu Änderungen der Aktivität bestimmter Gene und den durch sie geregelten außerordentlich komplizierten, miteinander interagierenden biochemischen Netzwerken führen. Dabei werden Bausteine der DNA, die Basen, an bestimmten Stellen dieser langen Makromolekülketten chemisch modifiziert, z. B. methyliert oder azetyliert, oder solche Änderungen werden wieder entfernt. Auch die „Verpackungsproteine“ der DNA, die Histone, werden an ausgewählten Orten der DNA-Molekülketten chemisch verändert. Entwicklung und Altern der Organismen werden ebenfalls durch solche Prozesse entscheidend beeinflusst. Diese durch „Nicht-Histon“ Proteine bewirkten „gezielten“ Umformungen von DNA und Verpackungsproteinen – dem Chromatin – können in den tausenden Milliarden Zellen eines menschlichen Körpers in verschiedener Weise ablaufen. Auch Chemikalien, ultraviolettes Licht, Röntgenstrahlung oder Radioaktivität können zu Veränderungen in den DNA-Ketten des Zellkerns führen und wiederum ganze Folgen dynamischer Reparaturprozesse auslösen, oder die Produktion von lebenswichtigen Proteinen verändern. Unsere Körperabwehr beruht auf der vielfältigen Neukombination von Immunglobulin-Genen in Zellen des Blutbildenden Systems.

Kurz gesagt: Alle Lebensprozesse, von der Eizelle bis zum Erwachsenenendesein und darüber hinaus bis zum Altern hängen in entscheidender Weise von der Dynamik des in den Zellkernen lokalisierten Genoms ab. Die vielfältigen oben beschriebenen „epigenetischen“ und reparaturbedingten Modifikationen der DNA werden dank moderner Analyseverfahren jetzt allmählich entschlüsselt und in die „Weltkarte“ des Zellkerns eingetragen.

Lange Zeit wurde dabei nicht berücksichtigt, dass diese große Dynamik chemischer Prozesse eng auch mit ebenso dynamischen Veränderungen der raumzeitlichen Struktur des Zellkern-Genoms verknüpft ist: Epigenetische Modifi-

kationen - d.h. chemische Änderungen an den Basen der DNA bzw. an ihren Verpackungsproteinen ohne Eingriff in die lineare Abfolge der Basen – wirken auf die räumliche Struktur des Chromatins. Umgekehrt können dynamische Änderungen der räumlichen Struktur des Chromatins Änderungen der Genaktivität bewirken, also der Bildung von bestimmten Proteinen; die von ihnen katalysierten biochemischen Prozesse können dann ihrerseits wieder epigenetische Modifikationen hervorrufen. Biochemische Prozesse und räumliche Strukturänderungen des Genoms bedingen also einander; das sollte möglicherweise sogar für unser Denken gelten: Das Gedächtnis ist mit epigenetischen Veränderungen im Zellkern von Neuronen verknüpft, die ihrerseits die Zellkernarchitektur verändern können: Sogar Worte verändern demnach die Genomstruktur in bestimmten Neuronen. Der hier postulierte enge Zusammenhang zwischen molekularen epigenetischen Modifikationen des Chromatins und der raum-zeitlichen Genomstruktur ist Gegenstand aktueller Forschung (Kosak & Groudine 2004; Pederson 2014; Wendt & Grosfeld 2014; Woringer et al. 2014; Sexton & Cavalli 2015; Cremer T et al. 2015, 2016, 2018; Cremer C et al. 2018).

In diesem Beitrag wollen wir einem der vielfältigen Aspekte der raum-zeitlichen Dynamik des Zellkerngenoms nachgehen, der Bedeutung seiner funktionellen räumlichen Struktur. Wir werden sehen, dass entgegen einem Jahrzehnte lang gehegten Glauben der Zellkern nicht einfach ein Sack mit DNA, RNA und Proteinen ist, der mit einem chemischen Reagenzglas verglichen werden kann; sondern dass er bei aller Variabilität im Einzelnen von fundamentalen Strukturprinzipien beherrscht wird, die für seine Funktion von wesentlicher Bedeutung sind. Die Gesamtheit der Korrelationen zwischen der raum-zeitlichen Struktur des Genoms und den von der Molekularbiologie untersuchten biochemischen Prozessen ist kürzlich unter dem Namen „4D Nucleome“ zusammengefasst worden (Tashiro & Lanctot 2015). Dies ist auch der Titel eines im Jahre 2014 von den National Institutes of Health (NIH) der USA bewilligten großen Forschungsprogramms (<https://commonfund.nih.gov/4Dnucleome>). Untersucht werden sollen in diesem viele wissenschaftliche Arbeitsgruppen umfassenden Vorhaben „die Prinzipien hinter der drei-dimensionen Organisation des Zellkerns in Raum und Zeit; die Rolle der Kernorganisation in Genexpression und zellulären Funktionen; und Änderungen in der Kernorganisation, die Entwicklung und Krankheit beeinflussen“. In der kürzlich etablierten „European Flagship“ Initiative (<https://lifetime-fetflagship.eu/index.php/the-initiative/>) sowie in einem neuen Schwerpunktprogramm (ab 2019) der deutschen Forschungsgemeinschaft zum Thema „3-D-Genomarchitektur in Entwicklung und Krankheit“ werden ähnliche

Zielsetzungen verfolgt ([https://www.dfg.de/service/presse/pressemitteilungen/2018/pressemitteilung\\_nr\\_07/index.html](https://www.dfg.de/service/presse/pressemitteilungen/2018/pressemitteilung_nr_07/index.html)).

## 2 Frühe Modelle der Kerngenomorganisation

Viele Jahrzehnte lang wurde der Zellkern von den meisten Biologen als ein weitgehend strukturloser Behälter angesehen, in dem die DNA-Stränge der einzelnen Chromosomen (bei menschlichen Zellen insgesamt etwa 2 Meter in einem Kern mit einem typischen Durchmesser von  $10\ \mu\text{m}$ ,  $1\ \mu\text{m} = 1/1000$  Millimeter) regellos herumlagen. Dieses „Spaghetti“-Modell des Zellkerns (Comings 1968; Vogel & Schroder 1974) wurde durch lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Aufnahmen gestützt, die mit Ausnahme einiger stärker kondensierter Regionen (dem „Heterochromatin“) eine weitgehend strukturlose „Landschaft“ zeigten (Wischnitzer 1973). Das Gesamtbild änderte sich auch nicht, als in den 1970er Jahren entdeckt wurde, dass die DNA zum größten Teil auf Proteinkerne (Histone) aufgewickelt ist, den Nukleosomen (Olins & Olins 1974), mit einem Durchmesser von ca.  $10\ \text{nm}$  ( $1\ \text{nm} = 1$  Millionstel Millimeter =  $1$  Tausendstel Mikrometer). Sogar heute noch erfreuen sich „Spaghetti“-Modelle großer Beliebtheit (siehe z. B. die Bilder beim Stichwort „Nuclear Organization“ in <https://www.google.com/search>), trotz vielfältiger gegenteiliger experimenteller Evidenz (s. u.).

## 3 Chromosomenterritorien

Bereits um 1900 haben Theodor Boveri (Boveri 1909) und Emil Strassburger erste Modelle vorgeschlagen, die eine wesentlich komplexere Struktur der Genomorganisation im Zellkern annahmen als in dem o.g. „Spaghetti-Modell“ (Cremer T, 1985): Ihrer Auffassung nach lösten sich die während der Zellteilung beobachteten scharf umrissenen mitotischen Chromosomen im Interphasekern (in der Zeit zwischen zwei Zellteilungen) nicht einfach auf, sondern blieben (ein Ausdruck von Boveri) als „Chromosomenterritorien“ bestehen: D.h. die einhüllenden Volumina jedes Chromosoms füllten jeweils nur einen relativ kleinen Teil des Zellkerns aus und waren voneinander abgegrenzt, so wie einzelne Provinzen in einem Staatsgebilde (Cremer T & Cremer M 2010).

Die experimentellen Belege Boveris für die Existenz von Chromosomenterritorien waren jedoch ziemlich indirekt und zudem an Pferdespulwürmern erhoben. Mit konventionellen Licht- und elektronenmikroskopischen Methoden konnten

diese Chromosomenterritorien in Zellen „höherer Organismen“ jahrzehntelang nicht beobachtet werden; ihre Existenz wurde daher so stark bezweifelt, dass sie aus den Lehrbüchern und damit aus dem allgemeinen Bewusstsein der Biologen verschwanden. Dies änderte sich erst, als neue optische und molekularbiologische Methoden es erlaubten, einen schärferen Blick auf den Zellkern zu richten (Cremer T & Cremer C 2006a,b).

Erste Hinweise auf die Existenz von Chromosomenterritorien in lebenden Säugerzellen ergaben sich aus Untersuchungen mit fokussierten Laserstrahlen in den 1970er Jahren. In diesen Versuchen wurde ein ultravioletter Laserstrahl so fein gebündelt, dass nur ein sehr kleiner Teil der Zellkernfläche bestrahlt und dort lokale DNA-Schäden erzeugt wurden; die Zellen wurden bis zur folgenden Zellteilung (Mitose) kultiviert und dann fixiert; mit verschiedenen Methoden (Einbau von radioaktiv markierten DNA-Basen; Immunfärbung gegen UV-induzierte DNA-Läsionen; Störung der Chromosomenkondensation an den mikrobestrahlten Stellen) wurden die Orte der geschädigten DNA in den Chromosomen sichtbar gemacht. Das Ergebnis war sehr überraschend: Die Schäden waren auf einige wenige kleine Abschnitte der Mitosechromosomen beschränkt. Das war nur möglich, wenn diese Chromosomen auch im Zellkern sehr viel kompakter geblieben waren, als es die gängige Lehrmeinung annahm, also Chromosomenterritorien bildeten (Zorn et al. 1979).

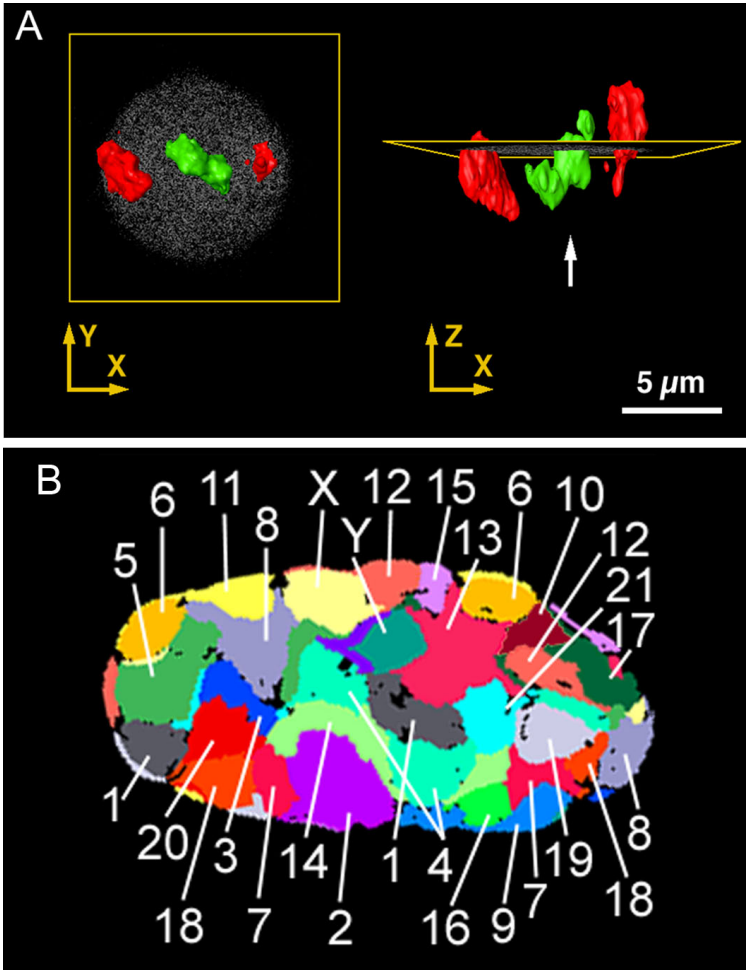
Diese Lasermikrobeustrahlungsexperimente erlaubten auch eine erste Untersuchung der Mobilität der Chromosomenterritorien in lebenden Zellen: Dazu wurden Zellkerne an bestimmten Stellen bestrahlt und mit radioaktiv markierten DNA-Basen inkubiert. Dies ermöglichte es, Ort und Größe der bestrahlten Chromatinareale als Funktion der Zeit zu verfolgen. Es ergab sich, dass während der sogenannten Interphase, also während der Zeit zwischen zwei Zellteilungen, das Chromatin relativ wenig Dynamik zeigt, im Gegensatz zu der Phase der Zellteilung, in der in wenigen Minuten tiefgreifende Strukturänderungen erfolgen.

Während die Lasermikrobeustrahlungsexperimente die Existenz von Chromosomenterritorien in (lebenden) Säugerzellen zeigten, erlaubten sie immer noch nicht, diese direkt sichtbar zu machen. Dies gelang in den 1980er Jahren durch die Einführung einer molekularzytogenetischen Methode, dem „Chromosome Painting“, einer Variante der Fluoreszenz-in situ Hybridisierung (FISH) (Cremer T et al. 1988, 2014). Abb. 1A zeigt einen menschlichen Lymphozytenkern, in dem die Chromosomenterritorien von #18 (rot) und #19 (grün) durch Zweifarben Chromosomen Painting markiert wurden (Cremer & Cremer 2001). Das dreidimensionale Bild wurde mithilfe der „konfokalen Laserscanning Fluoreszenz-

mikroskopie“ (CLSM) gewonnen (Cremer & Cremer 1978; Laurent et al. 1992; Cremer & Masters 2013). Bei dieser hochauflösenden Lichtmikroskopiemethode wird ein Laserstrahl durch ein Hochleistungsobjektiv sehr fein gebündelt (einige hundert nm Durchmesser); damit wird der Zellkern Punkt für Punkt abgetastet („gescannt“); das an jedem Objektpunkt angeregte Fluoreszenzsignal wird mit einem hochempfindlichen Detektor aufgenommen; durch eine kleine Lochblende vor dem Detektor wird dafür gesorgt, dass jeweils nur Licht aus einer bestimmten Ebene des Zellkerns in den Detektor gelangen kann („optischer Schnitt“); das „Punkt-für-Punkt“ in drei Dimensionen (räumlich) aufgenommene Bild der Fluoreszenzverteilung wird mithilfe eines Computers dargestellt.

In der Abbildung 1A ist klar erkennbar, dass diese beiden Chromosomen tatsächlich im Zellkern gut abgegrenzte „Territorien“ bilden. Man sieht auch, dass die beiden „rot“ markierten Territorien #18 in der Nähe der Zellkernperipherie liegen, während die beiden „grün“ markierten Territorien #19 mehr in der Mitte des Zellkerns plaziert sind, so nahe, dass sie bereits zusammenhängend erscheinen. Dies ist kein Zufall: Umfangreiche Untersuchungen haben ergeben, dass sich in Lymphozytenzellkernen die Chromosomenterritorien #18 (sehr geringe Dichte von Genen) in der Peripherie des Kerns befinden, während sich die beiden Territorien #19 (sehr hohe Dichte) mehr im Inneren aufhalten; es muss also Kräfte geben, die für diese Verteilung sorgen. Noch spannender wird es durch die Entdeckung, dass die Verteilung der auf #18 und #19 befindlichen Gene nicht nur beim Menschen so unterschiedlich ist, sondern bei allen Primaten, z. B. Schimpansen, Orang-Utans, Gibbons etc (Tanabe et al. 2002); sogar noch bei Vögeln sind in den entsprechenden Zellen die #18 und #19 entsprechenden Gene räumlich ähnlich verteilt wie in menschlichen Zellkernen (Habermann et al. 2002). Damit hat sich diese ungleiche räumliche Genverteilung seit mehreren hundert Millionen Jahren erhalten. Das ist natürlich noch kein Beweis für eine unmittelbare funktionelle Bedeutung; aber es ist ein klarer Hinweis auf zumindest eine enge Korrelation mit einer wichtigen zellulären Funktion.

Bei diesen Zellen scheint die Dynamik der Chromosomenterritorien anscheinend so stark eingeschränkt, dass sie über Millionen Jahre in Zellen desselben Status erhalten geblieben ist. Sogar in verschiedenen Typen von Krebszellen wurden sehr ähnliche Anordnungen beobachtet (Cremer M et al., 2003). Allerdings war auch hier eine erhebliche Dynamik zu beobachten: Die ungleiche räumliche Verteilung ist zwar hoch signifikant aber nicht statisch. In Hautzellen (Fibroblasten) sah die Anordnung der Chromosomenterritorien dagegen ganz anders aus: Die räumliche Verteilung bestimmter Chromosomen im Zellkern ist also vom



**Abbildung 1:** Visualisierung einzelner Chromosomenterritorien in menschlichen Zellkernen durch Chromosomen Painting und konfokale Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie

A) Territorien #18 (sehr geringe Dichte, rot) und #19 (sehr hohe Dichte, grün) im Kern einer menschlichen Lymphozytenzelle [aus Cremer T & Cremer C, 2001].

B) Zellkern einer menschlichen Fibroblastenzelle, in dem alle Chromosomenterritorien durch Vielfarbenmarkierung (FISH) in einem konfokalen Laserscanning Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht wurden [aus Bolzer et al. 2005].

Gewebetyp abhängig und zeigt damit eine programmierte Dynamik, der molekulare Prozesse zugrunde liegen; aber auch die Form des Zellkerns kann eine Rolle spielen. Die Dynamik der räumlichen Verteilung von Chromatin hat sich als besonders hoch in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung erwiesen, wie Untersuchungen bei Rindern zeigten (Popken et al. 2015).

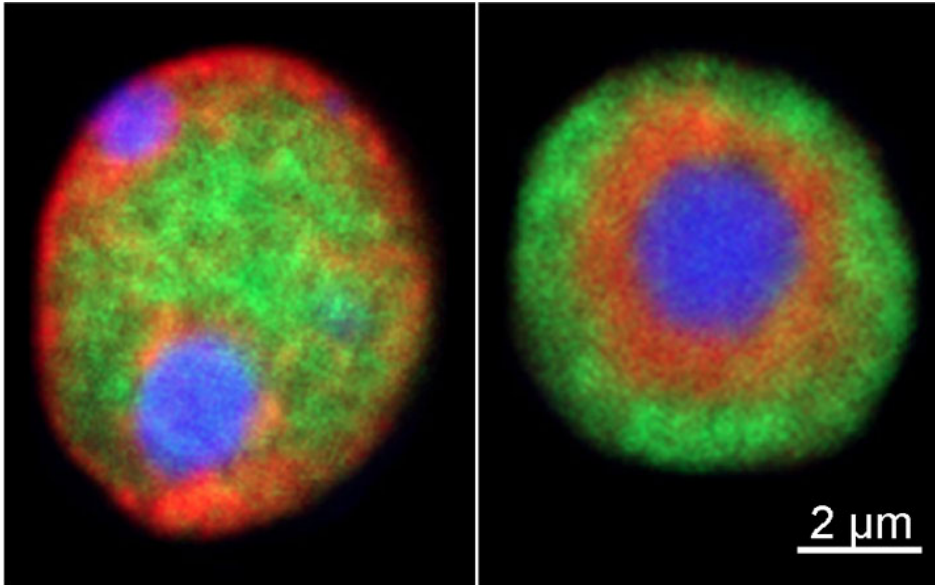
Abb. 1B zeigt einen menschlichen Zellkern, in dem mit einem derartigen Vielfarben „Chromosomen Painting“ Verfahren und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie alle Chromosomenterritorien gleichzeitig sichtbar gemacht wurden (Bolzer et al. 2005). Das Ergebnis sieht aus wie eine Landkarte Süddeutschlands zur Zeit des „Heiligen Römischen Reichs“ im 18. Jahrhundert, wo jeder kleine Baron oder „Duodezfürst“ ein kleines Territorium sein eigen nannte. Offenbar sind alle diese Chromosomenterritorien räumlich voneinander gut abgegrenzt, mit nur geringen „Überlappungszonen“. Wie weiter unten näher beschrieben wird, haben neue molekularbiologische Sequenzierungsmethoden und Mikroskopieverfahren mit stark verbesserter räumlicher Auflösung allerdings gezeigt, dass die einzelnen Chromosomenterritorien selbst eine äußerst verwickelte Innenstruktur besitzen.

Ein besonders drastisches Beispiel für die Dynamik der räumlichen Organisation des Zellkernsinnerns innerhalb desselben Typs bei derselben Entwicklungsstufe findet sich bei Zellen der Retina: Diese Dynamik hängt entscheidend davon ab, ob die Träger nachtaktiv oder tagesaktiv sind (Abb. 2): Während bei den tagesaktiven Tieren die genetisch aktive DNA (grün) im Zentrum des Kerns von Stäbchenzellen lokalisiert ist, ist es bei nachtaktiven Tieren genau umgekehrt (Solovei et al. 2009).

Die Organisation der DNA des Zellkerns in Chromosomenterritorien wurde nicht nur in menschlichen Zellen und allen bislang untersuchten Säugerzellen bestätigt, sondern sie findet sich auch in Vögeln, Pflanzenzellen, Insekten, Pilzen, und sogar in Einzellern, also durch die gesamte Evolution der Eukaryonten (kernhaltige Zellen) hindurch. Selbst in Bakterien scheint die DNA nicht nach dem „Spaghetti“ Modell verteilt zu sein, sondern einen höheren räumlichen Ordnungsgrad zu besitzen.

Auch wenn es bislang noch experimentell schwierig zu beweisen ist, so drängt sich doch der Verdacht auf, dass eine durch hunderte von Millionen Jahren und durch alle Zweige des Lebens hindurch konservierte Organisationsstruktur und seine Dynamik von funktioneller Bedeutung ist. Eine naheliegende Erklärung könnte sein, dass die komplexe „Verpackung“ der Zellkern DNA für die nächste Zellteilung auf diese Weise viel einfacher erfolgen kann: Wenn man jede Nacht das Hotelzimmer wechseln muss, ist es klüger, seinen Kofferinhalt nur soweit auszubreiten, als es für die jeweils spezifisch benötigten Aktivitäten erforderlich





**Abbildung 2:** Dynamische Umordnung der Genomstruktur in Kernen von Retinazellen

*Links:* Lichtoptischer Schnitt durch den Zellkern einer Ganglionzelle der Mausretina nach FISH mit drei DNA-Sonden zur Darstellung von repetitiven DNA-Sequenzen, die in Euchromatin (grün), konstitutivem Heterochromatin (blau) und fakultativem Heterochromatin (rot) angereichert sind. Das praktisch genfreie und transkriptionell weitgehend inaktive konstitutive Heterochromatin ist in Chromozentren angeordnet. Genarmes, „fakultatives“ Heterochromatin dominiert in der Zellkernperipherie, genreiches, „transkriptionell kompetentes“ Euchromatin im Kerninneren. Diese Unterschiede der „radialen“ Anordnung des Chromatins sind typisch für nahezu alle Zellkerne des Körpers [aus Solovei et al. 2009].

*Rechts:* Lichtoptischer Schnitt durch den Zellkern einer Stäbchenzelle der Mausretina mit einer im Vergleich zu dem Bild Links drastisch veränderten Zellkernarchitektur. Euchromatin (grün) dominiert die Peripherie. Im Zentrum findet sich ein Cluster aus konstitutivem Heterochromatin (blau), umgeben von einer Schicht aus fakultativem Heterochromatin (rot). Stäbchenzellen sind spezialisierte Sinneszellen für das Sehen bei geringer Helligkeit. Das im Vergleich zum Euchromatin viel stärker kompaktierte Heterochromatin hat einen erhöhten optischen Brechungsindex [Solovei et al. 2009]. Computermodellierungen zeigen, dass die im Inneren von Stäbchenzellkernen gefundene Anordnung von Heterochromatin den Zellkernen die Eigenschaften von Mikrolinsen verleiht, die zu einer Fokussierung des beim Nachtsehen spärlichen Lichts auf die Photorezeptoren der Stäbchenzellen beiträgt [aus Solovei et al. 2009].

ist; auch weiß jeder, dass lange nasse Hemden in einer Waschmaschine nach dem Waschvorgang schwer zu entwirren sind, ihre Trennung also erhebliche Energie kostet. Diese Alltagserfahrungen werden auch durch theoretische Überlegungen unterstützt.

Aber könnte die Organisation des Zellkerngenoms in Chromosomenterritorien und ihre gewebspezifische Dynamik darüber hinaus nicht noch ganz andere wesentliche Funktionen haben, vielleicht sogar für die zelltypische Genexpression und ihre Kontrolle? Sollte vielleicht eine Funktion der hochkomplexen „epigenetischen“ Modifikationen von DNA und Histonen die Herstellung geeigneter räumlicher Chromatinstrukturen sein, die die Expression bestimmter Gene fördern oder behindern? Aufgrund molekularbiologischer Experimente weiß man heute, dass die Transkription mit einer kleinen Dekondensation (Auflockerung) der betreffenden Chromatinregionen verbunden ist; umgekehrt ist die Stilllegung von Genen (das „Silencing“) mit einer geringeren Zugänglichkeit für Proteine verbunden. Vielleicht handelt es sich dabei nicht um eine „Zufallsbeziehung“, sondern um einen funktionalen Regelkreis, ein System: Eine bestimmte Chromatinstruktur erleichtert oder erschwert die Zugänglichkeit von Proteinen für die Modifikation von DNA/Proteinen bzw. die Replikation (Verdopplung der DNA)/Transkription („Ablesung“ der Gene durch Bildung von RNA); umgekehrt bestimmen die epigenetischen Modifikationen die Chromatinstruktur: Epigenetische Modifikationen bewirken Strukturänderungen; Strukturänderungen, ausgelöst z. B. auch durch mechanischen Stress, bewirken epigenetische Modifikationen. Beide sind zwei Seiten desselben lebensentscheidenden Prozesses: Der Steuerung der Genaktivität. Diese für ein verbessertes „mechanistisches“ Verständnis der Genregulation und damit des Lebens hoch relevante Hypothese würde Substanz gewinnen, wenn die einzelnen Chromosomenterritorien ihrerseits spezifische, dynamisch kontrollierte Substrukturen aufweisen würden (Lanctot et al. 2007). Heute ist es möglich geworden, mit neuen molekularbiologischen Verfahren (insbesondere Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierungstechniken) diese Hypothese experimentell anzugehen (Liebermann et al. 2009; Mirny et al. 2011; Dixon et al. 2012; Dekker et al. 2013; Gibcus & Dekker 2013; Rao et al. 2014; Williamson et al. 2014); allerdings werden hierbei typischerweise viele tausend Zellen „in einen Topf geworfen“; die funktionell entscheidende Verschiedenartigkeit einzelner Zellen kann nur sehr unzureichend berücksichtigt werden. Es ist daher außerordentlich wichtig, die innere Struktur von Chromosomenterritorien auch auf der Ebene der einzelnen Zelle erforschen zu können. Über die Verwendung rein molekularbiologischer Methoden (Nagano et al. 2013) hinaus ist dies möglich geworden durch

die Verbindung molekularbiologischer Markierungsverfahren mit geeigneten licht- bzw. elektronenmikroskopischen Methoden.

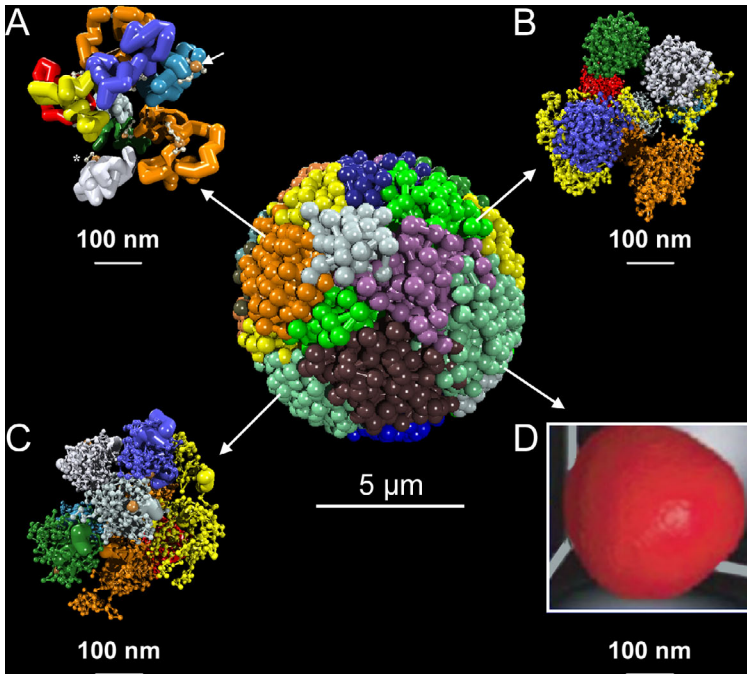
#### 4 Innere Struktur der Chromosomenterritorien

Dank den oben beschriebenen „molekularbiologischen“ Markierungsverfahren in Verbindung mit anderen, insbesondere fluoreszenzmikroskopischen Methoden gelang der Nachweis, dass einzelne Chromosomenterritorien nicht ihrerseits ein „Bag of DNA & Proteins“ sind, also in kleinerem Maßstab wiederum dem Spaghetti-Modell entsprechen; sondern dass auch sie offenbar hochstrukturiert sind.

Den genauen Zusammenhang zwischen lokaler Struktur der Chromosomenterritorien und den in ihnen ablaufenden molekularen Prozessen mithilfe von konventionellen Lichtmikroskopieverfahren wie der konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie zu bestimmen, erwies sich als nicht möglich: Der Grund hierfür war die bei allen solchen Lichtmikroskopieverfahren bestehende fundamentale Grenze der optischen Auflösung: Wie bereits im 19. Jahrhundert von zwei Pionieren der Optik, Ernst Abbe und Lord Rayleigh, bewiesen wurde, ist die kleinste Struktureinheit, die mit Licht einer bestimmten Wellenlänge noch unterschieden werden kann, etwa eine halbe Wellenlänge oder ca. 200 nm.

Abb. 3 zeigt die Folgen dieser Begrenzung der lichtoptischen Auflösung an einem einfachen numerischen Modell der Zellkernstruktur.

Natürlich bestehen die Chromosomenterritorien in Wirklichkeit nicht aus 500 nm großen Kugeln, sondern aus einzelnen, teilweise sehr viel kleineren Chromatindomänen mit extrem komplexen Nanostrukturen. Geht man von einem DNA-Gehalt einer großen Domäne (Abb. 3) von 1 Mbp aus, dann bietet sie genügend Platz für zehn einzelne Gendomänen mit jeweils 100 Kilobasenpaaren DNA. Bis vor kurzem glaubte man aufgrund von elektronenmikroskopischen und kristallographischen Ergebnissen an kurzen Chromatinfasern, dass der Großteil der Zellkern-DNA in Chromatinfasern mit 30 nm Durchmesser organisiert ist, deren Anordnung wiederum dem „Spaghetti“-Modell entsprechen sollte. Mit den in den letzten Jahren stark verbesserten elektronenmikroskopischen Methoden wurde jedoch immer deutlicher, dass zumindest ein großer Teil des Zellkerngenoms nicht in 30 nm Fasern organisiert ist; die einzelnen Chromatindomänen können also einen viel komplexeren Aufbau aus der Faltung einzelner Nukleosomenketten haben (Ou et al. 2017). In Abb. 3 sind einige Möglichkeiten der Faltung von 10 Gendomänen in einer 1 Mbp Chromatindomäne simuliert. Im Prinzip gibt es



**Abbildung 3:** Ein numerisches Modell (Computersimulation) des Zellkerngenoms.

Die Abbildung zeigt in der Mitte ein Modell der Genomstruktur eines menschlichen Zellkerns. Die in unterschiedlichen Farben dargestellten Chromosomenterritorien enthalten zahlreiche Chromatindomänen, die miteinander durch flexible Chromatinfasern verbunden sind. Für jede dieser Domänen wurde ein DNA Gehalt von 1 Megabase (Mbp) und ein Durchmesser von ca. 500 nm angenommen (Cremer et al. 2000; Hübschmann et al. 2010). Messungen mit Hilfe super-auflösender Fluoreszenzmikroskopie ergaben jedoch wesentlich kleinere Durchmesser zwischen 40 und 210 nm bei einem mittleren Durchmesser von 125 nm (Baddeley et al. 2010). Solche Messungen ermöglichen Abschätzungen der lokalen Kompaktierung des Chromatins und damit eine Modellierung der Zugänglichkeit der Domänen für funktionell wichtige Proteine, z. B. Transkriptionsfaktoren, und makromolekulare Maschinen für Transkription, Replikation und Reparaturprozesse (3A, Pfeil). Vergrößerte Darstellungen einzelner 1 Mbp-Domänen zeigen hypothetische Beispiele für eine innere Struktur aus zehn verschiedenfarbig markierten, etwa 100 kbp großen Subdomänen (A-C; Cremer et al., 2000). Die kleinen ‚Kugeln‘ stellen hier einzelne Nukleosomen dar. Jede Subdomäne kann ein oder auch mehrere Gene und DNA-Abschnitte mit regulierenden Funktionen enthalten. Für weitere Einzelheiten siehe den Text. (D) Bei einer konventionellern optischen Auflösung (200 nm) zeigt die numerische Simulation nur einen Klumpen ohne erkennbare innere Struktur. Mit dem inzwischen erreichten Stand der super-auflösenden Fluoreszenzmikroskopie ist eine visuelle Darstellung auch der inneren Struktur möglich geworden [Numerische Simulationen: G. Kreth, KIP].

mehr Faltungsmöglichkeiten als das Universum Atome enthält. Würde es sich dabei um rein zufällige („stochastische“) Faltungen entweder von 30 nm oder von 10 nm Nukleosomenketten handeln, würden diese Nanostrukturen wieder auf kleinerer Skala dem „Spaghetti“-Modell entsprechen und wahrscheinlich von untergeordneter funktioneller Bedeutung sein. Es ist aber auch denkbar, dass die Nanostruktur von solchen Chromatin-Cluster-Domänen von größter Bedeutung für die Genaktivität ist. Zum Beispiel ist die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren (spezifische Proteine für die ‘Ablesung’ von Genen) bei einer 30 nm Faser aus geometrischen Gründen stark reduziert, da die einzelnen Nukleosomen der Faser sehr dicht zusammenliegen (siehe Abb. 3A); eine Umwandlung in eine lockere 10 nm Nukleosomenkette (Abb. 3 B, C) würde Platz genug schaffen, um sehr viel mehr DNA für solche Proteine zugänglicher zu machen. Die Zugänglichkeit könnte weiter gesteigert werden, wenn sich die Anheftungsstellen der Transkriptionsfaktoren jeweils an der Oberfläche der Chromatindomänen befänden; dies würde auch den „Abtransport“ der RNA erheblich erleichtern: Die durch Transkription gebildete RNA kann erhebliche Längen haben (bis zu Sequenzlängen von 1 Million Nukleotiden) und ist ihrerseits mit Proteinen verbunden. Ferner ist zu berücksichtigen, dass diese RNA zunächst in riesigen, aus hunderten verschiedener Proteine aufgebauten „Biomolekularen Maschinen“, den „Spliceosomen“, weiter verarbeitet wird. Dies würde nicht allein Übergänge zwischen 30 nm dicken Chromatinfasern und 10 nm Nukleosomenketten erfordern, sondern darüber hinaus spezifische Faltungsmuster. Heute sind verschiedene molekulare Mechanismen bekannt, die solche spezifischen Faltungen ermöglichen könnten. So wurde experimentell gezeigt, dass bereits die Sequenz reiner DNA (im Kilobasenpaarbereich) eine große Anzahl sehr spezifischer Faltungen ermöglicht: Sie können sich spontan zu kleinen Stäbchen falten, oder Würfeln, oder anderen geometrisch klar umrissenen Nanostrukturen (Han et al. 2011); Teile bestimmter Histone ragen aus den Nukleosomen heraus und können in vielfältiger Weise an ganz bestimmten Aminosäureresten modifiziert sein (z. B. methyliert oder azetyliert). Diese Modifikationen (der sog. Histone-Code; Prakash & Fournier 2017) sind eng mit der Genaktivität verbunden. Da Proteine in vielfältiger Weise miteinander reagieren und außerordentlich komplexe Strukturen aufbauen, wäre es denkbar, dass auch einzelne Gendomänen in den Chromatin-Clustern hochspezifische Nanostrukturen besitzen könnten, ähnlich den vielen anderen biomolekularen Maschinen der Zelle; dies würde eine weitere Kontrollebene ermöglichen, um die Aktivität einzelner Gene und Cluster von Genen zu steuern. Die tatsächliche Existenz solcher spezifischer Chromatin-Nanostrukturen wäre nicht allein eine

faszinierende wissenschaftliche Entdeckung; sie wäre langfristig auch von größter potentieller Bedeutung für die Entwicklung neuer Möglichkeiten für die Steuerung der Aktivität von Genen durch Pharmaka, z. B. zur gezielten Ausschaltung von „Krebsgenen“.

Bevor es sich lohnt, über solche „Science Fiction“ Perspektiven ernsthaft nachzudenken, müsste man die Fundamentalfrage klären: Haben solche Chromatin-Cluster überhaupt eine spezifische Nanostruktur? Das Beste wäre, man könnte diese Nanostrukturen direkt und individuell in einem Mikroskop in intakten Zellen sichtbar machen und analysieren; dies wäre am besten mit lichtmikroskopischen Verfahren möglich: Moderne elektronenmikroskopische Methoden wie das „Electron Spectroscopic Imaging“ (ESI) ermöglichen zwar mit atomarer Auflösung die Unterscheidung von Proteinen und DNA im Zellkern (Bazett-Jones et al. 2008), erlauben aber nicht die vielfältigen spezifischen Markierungsmöglichkeiten der Fluoreszenzmikroskopie; Untersuchungen der Chromatin-Mobilität an lebenden Zellen sind naturgemäß ausgeschlossen. Vor wenigen Jahren noch wäre eine lichtmikroskopische Auflösung von Nanostrukturen aber als physikalisch unmöglich angesehen worden, als den Grundgesetzen der Natur widersprechend: Abb. 3 D zeigt die in der Abb. 3 A-C dargestellten 1 Mbp Chromatin-Domänen, wenn man sie mit dem besten existierenden „konventionellen“ Lichtmikroskop abbilden würde; aufgrund der Begrenzung der optischen Auflösung auf 200 nm (oder eine halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts) würden alle Chromatindomänen als mehr oder weniger runde Bälle erscheinen; die Nanostrukturen könnten nicht unterschieden werden.

## 5 Superauflösende Lichtmikroskopie von Genom-Nanostrukturen

Die Grenze der lichtoptischen Auflösung auf ca. 200 nm galt für die meisten Physiker fast ein Jahrhundert lang als durch die Wellennatur des Lichtes gegeben und daher unüberwindlich; dies lernten viele Generationen von Studierenden der Physik, der Chemie und der Biowissenschaften als unumstößliche Tatsache, über die weiter nach zu denken sich nicht lohnte. Nur einige wenige „Auführer“ begannen etwa ab den 1950iger Jahren darüber zu spekulieren, es könne so etwas wie „Super-Resolution“ (also eine lichtoptische Auflösung von Struktureinheiten kleiner als ca. 200 nm) doch möglich sein. Solche Spekulationen blieben aber weitere Jahrzehnte lang Theorie, bis in den 1990er Jahren die Fortschritte in Lasertechnik, optischen Detektionsverfahren, Präzisionsmechanik, Datenverarbeitung und Photophysik von Molekülen den tatsächlichen Bau erster super-auflösender Licht-

mikroskope (SRMs) ermöglichten (Schermelleh et al. 2010; Zessin et al. 2012; Cremer & Masters 2013; Bechhoefer 2015; Cremer et al. 2017; Cremer 2018). Heute gibt es eine ganze Familie solcher SRMs, je nach ihrem Anwendungsgebiet und ihren spezifischen Eigenheiten. Im Jahre 2014 wurde die große Bedeutung dieser Entwicklungen durch die Verleihung des Nobelpreises für Chemie an den Deutschen Stefan Hell (Heidelberg/Göttingen) sowie die amerikanischen Wissenschaftler Eric Betzig und William Moerner für ihre wichtigen Beiträge hierzu gewürdigt. In seiner Begründung erklärte die Nobelpreiskommission, die superauflösende Fluoreszenzmikroskopie werde „eine Revolution von Biologie und Medizin“ bewirken. Diese Revolution hat jetzt bereits begonnen: Schon heute werden SRM-Methoden vielfältig in den Lebenswissenschaften eingesetzt, so in Entwicklungsbiologie, Stammzellforschung, Neurobiologie, Kardiologie, Krebsforschung, Pharmakologie, Ophthalmologie, Bakteriologie und Virologie, und natürlich auch für die Erforschung der funktionellen Nanostrukturen des Zellkerns. In Heidelberg wurde kürzlich ein neues Forschungsnetzwerk zur „Biologie auf der Nanoskala“ initiiert (<https://www.mpg.de/11972687/forschungsnetzwerk-nanobiologie>). Für die Erforschung von Nanostrukturen des Zellkerns haben sich insbesondere zwei SRM-Methoden als besonders gut geeignet erwiesen, die Mikroskopie mit Strukturierter Beleuchtung (Structured Illumination Microscopy/SIM); sowie die Lokalisationsmikroskopie mit Standardfluoreszenzfarbstoffen. Hier sollen einige mit diesen Methoden erzielte Ergebnisse zur Dynamik der Zellkernstruktur vorgestellt werden.

## **5.1 Superauflösende Lichtmikroskopie von Chromatin-Nanostrukturen mit strukturierter Beleuchtung**

Bei der „strukturierten Beleuchtung“ (SIM) wird ein Beleuchtungsmuster verwendet. Dieses Beleuchtungsmuster zur Anregung der Fluoreszenz wird dann relativ zum Objekt bewegt (oder das Objekt wird relativ zum Beleuchtungsmuster bewegt); bei jedem Schritt wird ein Bild mithilfe einer hochsensitiven Digitalkamera aufgenommen; aus den verschiedenen Bildern wird anschließend im Computer (mit teilweise sehr komplexen Rechenverfahren) ein Bild mit verbesserter Auflösung berechnet (Heintzmann & Cremer 1999; Gustafsson 2000; Markaki et al. 2010, 2012; Birk 2017). Damit wird eine Auflösungsverbesserung um den Faktor Zwei in allen drei Raumrichtungen sowie eine große Verbesserung des Kontrasts erreicht. Ein Faktor Zwei in jeder Raumrichtung bedeutet einen Faktor  $2 \times 2 \times 2$  in drei Dimensionen, also eine um den Faktor 8 verbesserte 3D-Auflösung (ca.

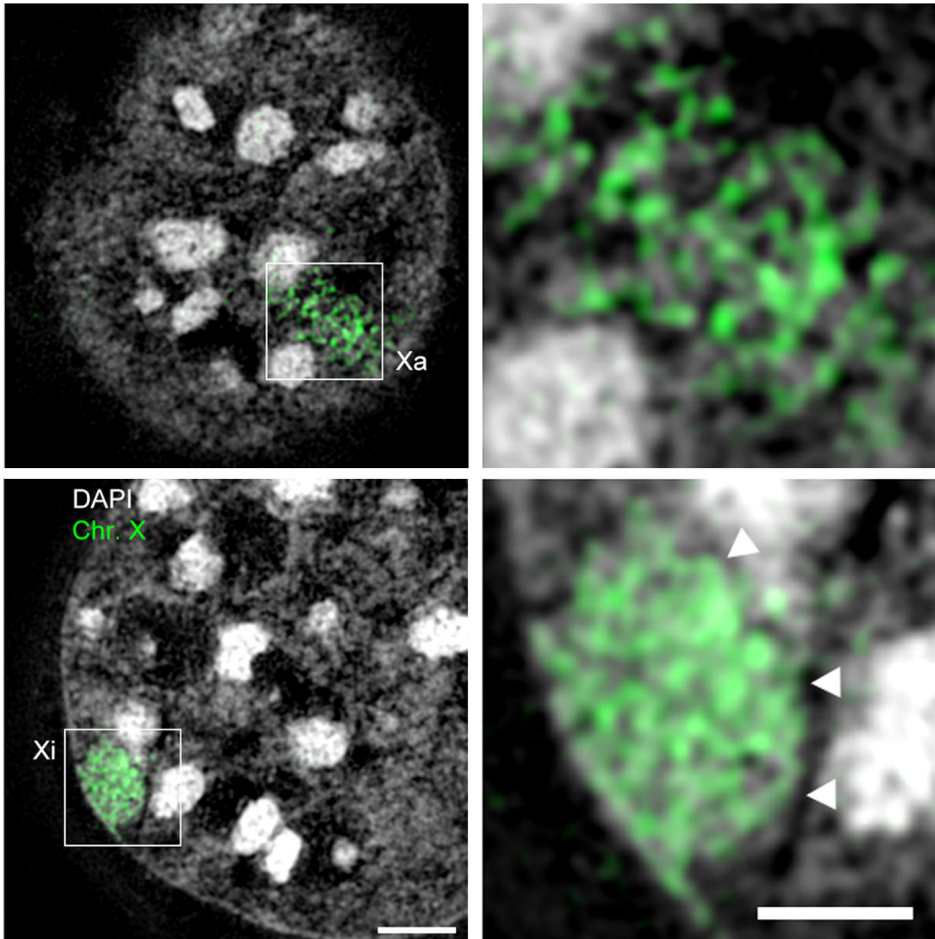
110 nm in der Objektebene, ca. 300 nm entlang der optischen Achse) gegenüber dem Konfokalmikroskop.

Abb. 4 zeigt eine Anwendung des „lateral SIM“ Verfahrens auf ein wichtiges Problem der Zellkernbiologie, die Nanostruktur von aktivem und inaktivem X-Chromosom.

In Säugerzellen, also auch beim Menschen, gibt es in männlichen Zellen nur ein einzelnes X-Chromosom, während es in weiblichen Zellen zwei davon gibt. Wären in weiblichen Zellen die Gene auf den beiden X-Chromosomen in gleicher Weise aktiv wie auf dem einen X-Chromosom in männlichen Zellen, so würde ein Ungleichgewicht in der Aktivität dieser Gene folgen. Um dies zu verhindern, sind in weiblichen Zellen entweder nur das mütterliche oder nur das vom Vater stammende X-Chromosom aktiv, während das jeweils andere inaktiviert wurde. Dieser für den Organismus wesentliche Aktivitätsunterschied findet sich auch in der Struktur der X-Chromosomenterritorien wieder. Früher glaubte man, dass das inaktive X im Gegensatz zum aktiven X-Chromosom ganz drastisch kondensiert sei, mit Volumenunterschieden um das Zehnfache. Untersuchungen von Säugerzellen nach Chromosome Painting mit X-Chromosomenspezifischen DNA-Proben und Konfokalmikroskopie zeigten jedoch, dass der Unterschied im Volumen sehr viel geringer war (etwa das Zweifache); ferner ergab sich, dass das aktive X-Chromosom im Gegensatz zum inaktiven etwas gestreckt war; darüber hinaus gehende strukturelle Unterschiede konnten jedoch wegen der auf ca. 200 nm lateral (Objektebene) und 600 nm axial (entlang der optischen Achse) nicht erforscht werden. Dies wurde jedoch möglich durch die mit SIM gegebene Auflösungsverbesserung. Bei den in Abb. 4 gezeigten Ergebnissen wurde ein kommerzielles SIM-Mikroskop verwendet, das auf Arbeiten von Mats Gustafsson und John Sedat in San Francisco beruht.

Die Abb. 4 zeigt SIM-Aufnahmen eines weiblichen Zellkerns der Maus [Smeets et al. 2014]; die Helldunkelfärbung zeigt die Chromatin-Verteilung nach Färbung mit einem konventionellen DNA-Farbstoff (DAPI). Die beiden X-Chromosomenterritorien (grün) wurden durch „Painting“ mit einer X-Chromosomen spezifischen DNA-Probe sichtbar gemacht. Abb. 4 oben zeigt das aktive X ( $X_a$ ), während Abb. 4 unten das inaktive X ( $X_i$ ) in einer anderen Ebene desselben Zellkerns darstellt. Wie schon von Aufnahmen mit konventionell auflösender Konfokalmikroskopie bekannt, ist das Volumen des aktiven X-Territoriums ( $X_a$ ) gegenüber dem inaktiven ( $X_i$ ) etwas erhöht. Die wesentliche, erst mit supraauflösender SIM sichtbare Nanostruktur zeigt in beiden Fällen ( $X_i$  und  $X_a$ ) eine Reihe kompakter kleiner Chromatin-Domänen, siehe auch Vergrößerungen Abb. 4 rechts); im Falle des ge-





**Abbildung 4:** Superauflösende Mikroskopie (structured illumination microscopy) des aktiven und des inaktiven Territoriums des X-Chromosoms in einem weiblichen Zellkern der Maus.

Die Abbildung zeigt die Chromatinverteilung nach Färbung mit einem konventionellen DNA Farbstoff (DAPI, grau). Die beiden X-Chromosomenterritorien (grün) wurden durch „Painting“ mit einer X-Chromosomen-spezifischen DNA Sonde sichtbar gemacht. Die obere Abbildung zeigt das aktive X, die untere das inaktive X-Territorium in einer andern optischen Schnittebene desselben Zellkerns, rechts jeweils als entsprechende Ausschnittvergrößerung. Im Vergleich zum aktiven X-Territorium hat das Territorium des inaktiven X-Chromosoms eine wesentlich kompaktere (heterochromatische) Struktur, die klar vom umgebenden (Eu)chromatin abgegrenzt ist (Pfeile in der Ausschnittvergrößerung).

Maßstab links = 2 $\mu$ m, Ausschnitt = 1 $\mu$ m [modifiziert, aus Smeets et al. 2014].

netisch inaktiven Xi ist jedoch der Abstand zwischen diesen „Chromatin-Clustern“ erheblich geringer als bei dem genetisch aktiven Xa (zu einer funktionalen Interpretation dieser Nanostrukturunterschiede siehe unten). Der Übergang zwischen aktivem und inaktivem Zustand bedeutet demnach eine erhebliche Dynamik auch der räumlichen Struktur des X-Chromosomenterritoriums: Es muss von einer mehr „aufgelockerten“ Architektur in eine mehr „kondensierte“ überführt werden.

## 5.2 Superauflösende Lichtmikroskopie von Chromatin-Nanostrukturen mit Lokalisationsmikroskopie

Eine weitere Methode zur Überwindung der konventionellen Grenze der optischen Auflösung und ihrer Anwendung auf die Erforschung von Chromatinnanostrukturen im Zellkern ist das Verfahren der „Lokalisations-Mikroskopie“ (Betzig et al. 2006; Gunkel et al. 2009; Bohn et al. 2010; Cremer C, 2011, 2018; Cremer C et al. 2017; Fornasiero & Opazo 2015; Birk 2017). Ihre Anfänge reichen bis in die 1990iger Jahre zurück, als sie erstmals konzipiert und in „Proof-of-Principle“ Experimenten realisiert wurde (Esa et al. 2000).

Der Ausgangspunkt der Überlegungen zur Überwindung der Auflösungsgrenze der konventionellen Lichtmikroskopie (ca. 200 nm) durch Lokalisationsmikroskopie sind die Überlegungen von Lord Rayleigh (1896): Wie schon erwähnt, ging dieser von der Annahme aus, dass der zu untersuchende Gegenstand aus vielen sehr kleinen ‚punktförmigen‘ selbstleuchtenden Objekten besteht. In der Astronomie ist das beim Licht von Sternen der Fall; in der Biologie ist eine Selbstleuchtern entsprechende Lichtemission möglich, wenn in der zu untersuchenden Biostruktur dort befindliche Moleküle durch das Beleuchtungslicht zur Fluoreszenz angeregt werden können: Das heißt, dass sie Licht einer anderen Wellenlänge aussenden als derjenigen des Anregungslichtes. Jeder kennt zum Beispiel das Phänomen, dass bestimmte Materialien, die mit ultraviolettem Licht bestrahlt werden, dann grün oder gelb aufleuchten. Auch chemische Reaktionen können zu einer ähnlichen Lichtaussendung führen.

Aufgrund der Wellennatur der Lichtausbreitung wird ein punktförmiges Objekt aber sogar mit einem Hochleistungsobjektiv nicht als Punkt abgebildet, sondern es erscheint als kleines Scheibchen mit einem Durchmesser von etwa einer halben Wellenlänge mal dem Vergrößerungsfaktor  $M$  des Mikroskops. Wenn zwei Objektpunkte näher als ca. 200 nm voneinander entfernt sind, überlagern sich die Beugungsscheibchen so stark, dass sie nicht mehr voneinander getrennt („aufgelöst“) werden können. Das ist die berühmte, von Ernst Abbe und Lord Rayleigh in

der zweiten Hälfte des 19. Jh. entdeckte „Auflösungsgrenze“. Da sie unmittelbar aus der Wellennatur des Lichts, einem „Urphänomen“ der Natur zu folgen schien, galt sie viele Jahrzehnte lang als unüberwindbar und als eine fundamentale Grenze der Erforschung der Natur mit lichtoptischen Verfahren.

Schon Rayleigh hat aber im Jahre 1895 darauf hingewiesen, dass die Position eines einzigen, von den Nachbarpunkten genügend weit entfernten Objektpunkts aus der Analyse des von ihm erzeugten Beugungsscheibchens „beliebig genau“ bestimmt werden kann. Diese Bedingung kann in der „konventionellen“ Lichtmikroskopie von Nanostrukturen nicht erfüllt werden, wenn die Beugungsscheibchen benachbarter Objektpunkte sich überlappen.

Was aber wäre, wenn es irgendwie gelänge, die Positionen von jedem Beugungsscheibchen unabhängig von den anderen zu messen? Dann könnte die Position jedes einzelnen unabhängig von den anderen gemessenen Beugungsscheibchens in einer Karte markiert werden; alle Markierungspunkte zusammen würden dann ein Bild des Objekts ergeben, ähnlich wie bei einem aus einzelnen Lichtpunkten zusammengesetzten Fernsehbild; je mehr Markierungspunkte eingetragen wären, desto detaillierter würde die Struktur des Objekts dargestellt werden können.

In der Lokalisationsmikroskopie kann dieses Problem auf verschiedene Weise gelöst werden, zum Beispiel mithilfe von verschiedenen Fluoreszenzmissionsspektren (‚Spektralfarben‘); oder mit Markierungsverfahren, in denen die Moleküle nicht gleichzeitig, sondern nacheinander aufleuchten, also „blinken“. Allen diesen Lokalisationsmikroskopieverfahren ist gemeinsam, dass im Prinzip molekular aufgelöste Abbildungen von beliebigen Nanostrukturen gewonnen werden können, sofern die wesentliche Grundbedingung, die ‚optische Isolation‘, erfüllt werden kann: Dies bedeutet, dass der Abstand zwischen zwei Molekülen *derselben* „spektralen Signatur“ mindestens eine halbe Wellenlänge (ca. 200 nm) betragen muss.

Beispielsweise könnte man die Beugungsscheibchen von ganz eng zusammen liegenden, nur in einer einzigen Farbe leuchtenden Moleküle auch dann voneinander trennen, wenn diese Moleküle ihre Leuchtkraft (Luminizenz) zeitlich verändern würden, wie das bei heutigen Leuchttürmen geschieht, oder in der Astronomie bei Supernova-Ausbrüchen. Aus solchen Hell- und Dunkelzuständen verschiedener Farbstoffmolekülen kann dann ein hochaufgelöstes Bild aufgebaut werden, gemäß einer schon vor 200 Jahren von einem Jenaer Naturforscher ausgesprochenen Leitidee:

*„Nunmehr behaupten wir, wenn es auch einigermaßen sonderbar klingen mag, daß das Auge keine Form sehe, indem Hell, Dunkel und*

*Farbe zusammen allein dasjenige ausmachen, was den Gegenstand vom Gegenstand, die Teile des Gegenstandes voneinander fürs Auge unterscheidet. Und so erbauen wir aus diesen dreien die sichtbare Welt.*“ (J.W. Goethe, Entwurf einer Farbenlehre, 1808).

Bei der Anwendung dieser Idee in der heutigen Lokalisationsmikroskopie muss man dafür sorgen, dass der Abstand von zwei Molekülen einer bestimmten Farbe im „Hell-Zustand“ so groß ist, dass sich die beiden Beugungsscheibchen derselben Farbe während der Aufnahmezeit im Detektionssystem (z. B. einer CCD-Kamera) nicht überlappen. In den letzten Jahren wurden derartige auf dem Grundkonzept der Lokalisationsmikroskopie beruhende Ideen von verschiedenen Gruppen (u. a. am King's College in London, der Harvard University, der Universität Heidelberg, der Universität Bielefeld, dem Howard Hughes Medical Institute, der Maine University, dem Max-Planck-Institut Göttingen) experimentell realisiert, wobei unterschiedliche Markierungs- und Aufnahmemethoden zum selben Ziel führten: Einer optischen Superauflösung, die um ein Vielfaches besser war als die von Abbe und Rayleigh postulierten Grenzen (Cremer & Masters 2013; Cremer et al. 2017).

Derzeit erlaubt die Lokalisationsmikroskopie eine lichtoptische Auflösung von Genomnanostrukturen im Zellkern von etwa 10–20 nm (0.010–0.020  $\mu\text{m}$ ; Reymann et al. 2008; Szczurek et al. 2017). Dies entspricht etwa 1/50 der eingesetzten Laserwellenlänge, oder 1/1000 Durchmesser eines Zellkerns; dabei konnten in einer einzelnen Zelle bis zu mehreren Millionen einzelne Moleküle voneinander unterschieden und mit einer Genauigkeit von wenigen Nanometer lokalisiert werden. Mit einem neu konstruierten Mikroskopiesystem verbunden mit einer neuen Methode der optischen Isolation von DNA-Farbstoffen („spatial switching“; Szczurek et al. 2017) gelang uns kürzlich eine Bestauflösung (gemessen an der Lokalisationsgenauigkeit einzelner Moleküle) im Zellkern von ca. 5 nm, also einem hundertstel der Wellenlänge; in genetisch inaktiven („heterochromatischen“) Bereichen in der Nähe des Zellkernrandes konnten bis zu rund 70,000 einzelne DNA bindende Farbstoffmoleküle pro  $\mu\text{m}^2$  lokalisiert werden (Shih-Ya Chen, C. Cremer, unveröffentlicht), mehrere hundertmal so viel wie noch vor zehn Jahren mit „photoactivated localization microscopy“ (Betzig et al. 2006).

Um die Leistungsfähigkeit der Lokalisationsmikroskopie für die Untersuchung der dynamischen Nanostruktur des Zellkerns zu zeigen, sei hier eine Anwendung dargestellt, die wir zusammen mit der Arbeitsgruppe von George Reid (ehemals IMB, derzeit EMBL) erforscht haben: Die durch Sauerstoffmangel induzierte

Änderung der Chromatin-Nanostruktur in Herzmuskelzellen (Kirmes et al. 2015). Bekanntlich beruht ein Herzinfarkt oder ein Schlaganfall auf einer plötzlichen Verminderung der Durchblutung von Herzmuskel oder Gehirnzellen; dies führt zu einer akuten Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und löst eine ganze Kette von biochemischen Änderungen aus; werden die Zellen nicht innerhalb kurzer Zeit wieder mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, so drohen bleibende Schäden; ein großer Teil aller Menschen in den industrialisierten Ländern stirbt an einer solchen Sauerstoff-Unterversorgung; selbst in Ländern wie Indien ist die Herzinfarkt/Schlaganfallrate sehr hoch. Um neue Therapien gegen die verheerenden Folgen selbst kurzen Sauerstoffmangels entwickeln zu können, wäre es wünschenswert, außer der besseren Kenntnis der molekularen Abläufe auch mehr über mögliche Änderungen der funktionellen Kernstruktur zu wissen. Abb. 5 zeigt ein Ergebnis aus Untersuchungen an Herzmuskelzellen der Maus; sie wurden mit einem neuen lokalisationsmikroskopischen Verfahren erzielt, bei dem es gelang, einen konventionellen DNA-Farbstoff so effektiv zum „Blinken“ zu veranlassen, dass die Chromatinnanostruktur mit hoher struktureller Auflösung untersucht werden konnte. Bei den in Abb. 5 gezeigten Ergebnissen konnten bis zu einer Million einzelne DNA-Stellen in einem einzelnen Zellkern lokalisiert und mit einer Präzision im Bereich von 10–20 nm vermessen werden; dies erlaubte quantitative Auswertungen mit einer bisher nicht erreichten Genauigkeit; die Dichte der einzeln auflösbaren Signale war mehrere tausendmal höher als dies mit konventioneller Mikroskopie möglich gewesen wäre.

Abb. 5A zeigt einen Herzmuskelzellkern nach Färbung der DNA mit einem direkt an diese bindenden Farbstoff (Purpur) sowie einer immunchemischen Färbung eines bestimmten „Histon“ Proteins, das aktiv abgelesene Gene anzeigt (Blau). Wie man durch Vergleich mit dem Maßstab leicht feststellt, haben die einzelnen DNA dichten Chromatin-Domänen einen variablen Durchmesser mit einer typischen Größe von bis zu einigen hundert Nanometer, wie dies bereits aufgrund von Konfokalaufnahmen in dem oben genannten Chromatinmodell angenommen wurde; dort war es allerdings wegen der limitierten Auflösung nicht möglich, die Variabilität dieser Strukturen näher zu erforschen. Ein weiteres sehr bemerkenswertes Ergebnis ist die Verteilung der (blau markierten) genetisch aktiven Regionen; diese befinden sich offenbar in den allermeisten Fällen am Rande der stärker verdichteten Chromatin-Cluster (Purpur); natürlich befindet sich auch an den blau markierten Stellen noch DNA; wie aber quantitative Vermessungen ergeben haben, ist dort die DNA-Dichte um ein Vielfaches geringer als in den DNA dichten Chromatin-Clustern, sodass sie in der Abbildung nicht sichtbar wird.

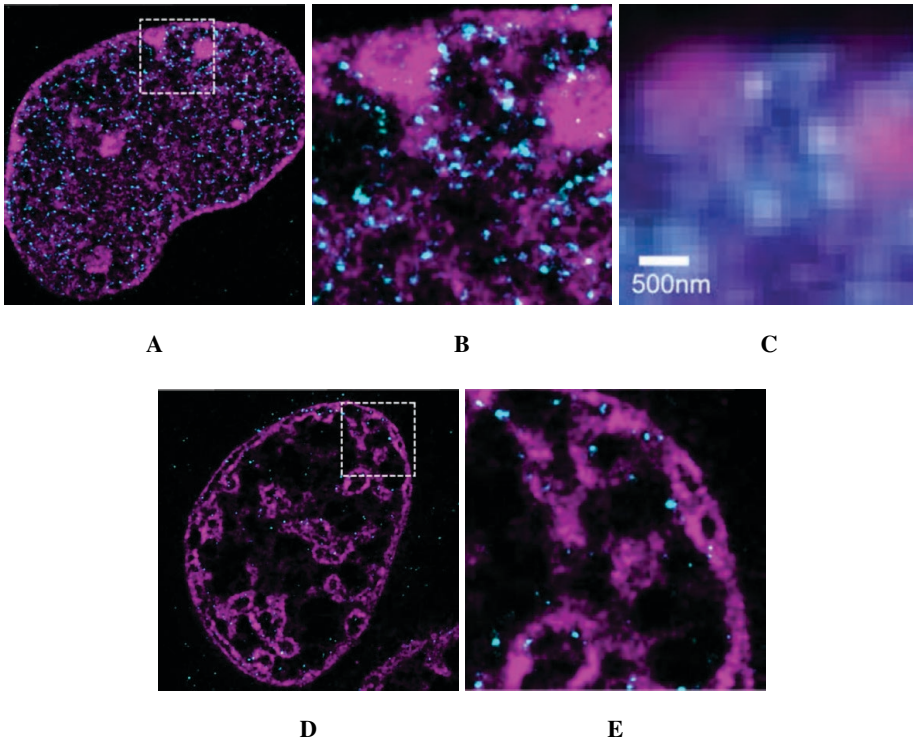
Der Vergleich des Lokalisationsbildes mit einer „konventionellen“ Aufnahme derselben Kernregion zeigt den enormen Gewinn an Strukturinformation, der sich aus der Anwendung von supraauflösenden Lokalisationsmikroskopiemethoden ergibt.

Wir (Arbeitsgruppen C. Cremer/T. Cremer) und andere Gruppen haben herausgefunden, dass viele andere Moleküle, die für die Replikation und die Transkription der DNA, aber auch für die Weiterverarbeitung („Splicing“) der produzierten RNA sowie für Reparaturvorgänge verantwortlich sind, sich ebenfalls vor allem in dieser Grenzregion aufhalten (für ein zusammenfassendes Modell siehe Abb. 6).

Was geschieht, wenn solche Herzmuskelzellen unter Bedingungen gesetzt werden (Sauerstoffmangel etc.), wie sie bei Infarkt/Schlaganfall auftreten?

Das Ergebnis war extrem überraschend: Kurze Zeit nach Sauerstoff Unterversorgung änderte sich die Chromatin-Nanostruktur dramatisch: Ein Großteil des Chromatins verdichtete sich und bildete kleine „Atoll-artige“ Strukturen. Die auftretenden Unterschiede konnten dank der Auflösung der einzelnen beteiligten Moleküle mit Nanometerpräzision vermessen werden; ähnlich wie bei der Auflösung einzelner Sternpositionen in einem Sternhaufen in der Astronomie mithilfe der neuen „Super Teleskope“ können auch in der Zellkernbiologie dank dieser quantitativen Vermessungen ganz neue Erkenntnisse gewonnen werden. Zum Beispiel ist es jetzt möglich, nicht nur „qualitative“ Unterschiede festzustellen („Die Nanostruktur ändert sich bei Sauerstoffmangel“), sondern auch quantitative („um wieviel genau?“). Wie in der Astrophysik ist das sehr wichtig, wenn es darum geht, numerische Modelle der Zellkernnanostruktur (Diesinger & Heermann 2006; Langowski 2006; Hübschmann et al. 2010; Barbieri et al. 2013; Nicodemi & Pombo 2014) zu entwickeln und daraus stark verbesserte Voraussagen zu gewinnen, z. B. über die Wirkung von ionisierender Strahlung, oder hier von Sauerstoffmangel und ihrer Milderung durch bestimmte Pharmaka.

In den oben skizzierten Untersuchungen wurden Zellen verwendet, die nach einer Behandlung zu bestimmten Zeitpunkten fixiert worden waren. Derartige Strategien zur Erforschung der dynamischen Entwicklung biologischer Systeme sind seit Jahrtausenden erprobt; bereits Aristoteles konnte auf diese Weise erste Aufschlüsse über die Embryonalentwicklung gewinnen. Das gleiche geschieht auch bei modernen molekularbiologischen Verfahren, wo zunächst die Zellen aufgelöst werden müssen, um DNA, RNA oder Proteine zu weiteren chemischen Untersuchungen zu isolieren. Dennoch wäre es außerordentlich wünschenswert, Mobilität und Dynamik der Zellkernorganisation mit supraauflösender Mikroskopie direkt an einer lebenden Zelle zu verfolgen. In begrenztem Umfang ist dies



**Abbildung 5:** Änderung der Chromatin-Nanostruktur von Herzmuskelzellen (Maus) durch Sauerstoff/Nährstoffmangel

A) Superauflösende Lokalisationsmikroskopie bei Normalbedingungen. Purpur: Chromatin-Domänen mit hoher DNA Dichte; blau: Orte der aktiven Transkription. Gezeigt ist ein ganzer Zellkern.

B) Vergrößerung der weiß eingerahmten Zone von A.

C) Dieselbe Zone wie in B, aber aufgenommen unter konventionellen Mikroskopiebedingungen.

D) Superauflösende Lokalisationsmikroskopie (ganzer Zellkern) nach Sauerstoff/Nährstoffmangel, entsprechend den Bedingungen bei Herzinfarkt; eine starke Änderung der Chromatinnanostruktur (Purpurgefärbte Chromatin-Domänen mit hoher DNA Dichte) tritt ein, aber auch eine starke Abnahme der aktiven Transkriptionsbereiche an der Peripherie der Chromatin-Domänen.

E) Vergrößerung der weiß eingerahmten Zone von D.

Der Maßstab ist in C (Skala 500 nm) und in B), E) derselbe [Aus Kirmes et al. (2015)].

bereits heute möglich (Shermelleh et al. 2001; Shechtman et al. 2015; Nozaki et al. 2017).

## **6 Ein allgemeines Modell der dynamischen Nanostruktur des Zellkerns**

Ausgegangen sind wir von der Jahrzehnte gültigen, allgemein akzeptierten Vorstellung, die mehrere Meter lange DNA im Kern einer Säugerzelle (typischer Durchmesser  $10\ \mu\text{m}$ ) sei sehr chaotisch verteilt, entsprechend etwa langen Spaghettifäden in einem Teller; die gesamte hoch komplexe Regulation der Genaktivität sei ausschließlich eine Sache biochemischer Reaktionen, ähnlich derjenigen, wie sie in einer wässrigen Lösung (Reagenzglas) ablaufen. Die in den letzten Jahren erzielten methodischen Fortschritte in Mikroskopie und Molekularbiologie haben jedoch neue Einblicke in die raum-zeitlichen Beziehungen der funktionellen Organisation der Zellkern-DNA ergeben. Aus diesem riesigen Gebiet neuer Erkenntnisse haben wir hier einige Beispiele aus unserer eigenen Erfahrung dargestellt. Die ständig wachsende Menge experimenteller Daten verlangt immer dringender nach einer zusammenfassenden Schau, also Modellen. Die typische Aufgabe von Modellen ist nicht, alle experimentellen Einzelheiten vollständig wieder zu geben; sondern eine Orientierungsmöglichkeit zu schaffen und Wege zu neuen Experimenten zu weisen; ein Modell hat auch dann eine ganz wesentliche Funktion erfüllt, wenn die zu seiner Prüfung unternommenen Untersuchungen das Modell „falsifizieren“ und dazu anregen, ein neues Modell aufzustellen. Derzeit gibt es eine ganze Reihe von allgemeinen Modellen der Zellkernstruktur, die sich im Einzelnen auch widersprechen können. Welches Modell wo richtig und wo falsch ist: Das ist derzeit eine offene und höchst spannende Frage der modernen Zellbiologie. Vielleicht gibt es gar nicht DAS richtige Modell der Zellkernarchitektur, ebensowenig wie es DAS richtige Modell einer Proteinstruktur gibt; bei Proteinen weiß man inzwischen, dass die auf der Grundlage der linearen Aminosäureketten im Zusammenwirken mit der Umwelt gebildeten dreidimensionalen Strukturen hoch spezifisch sind und vielfältig dynamisch sein können. Könnte ähnliches auch für die dreidimensionale Faltung der linearen DNA-Basenkettengelten? Als Beispiel präsentieren wir hier ein Modell der funktionellen Kernorganisation, das hauptsächlich aus Elektronenmikroskopie und super-aufgelösten Fluoreszenzmikroskopie-Studien entwickelt wurde.

Dieses auf der Grundlage früherer Überlegungen (Cremer T et al. 1993, 1995, 2000; Cremer & Cremer, 2001) entwickelte Modell (Abb. 6; Cremer et al. 2015,



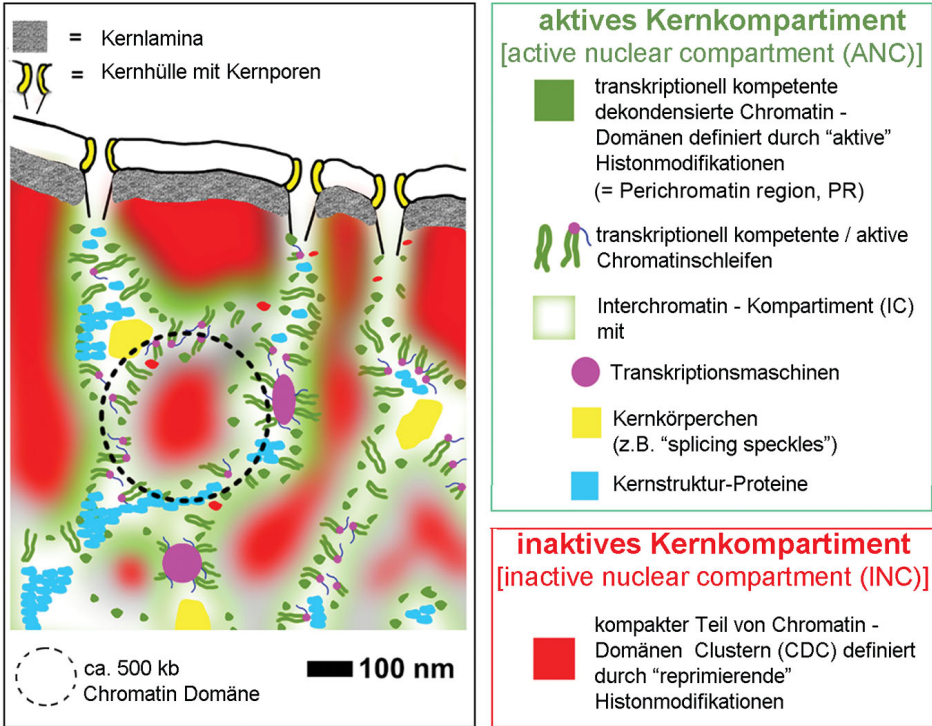
2018) nimmt im Zellkern zwei räumlich miteinander interagierende Bereiche (Kompartimente) an, das „Aktive Kernkompartiment“ (ANC) und das „Inaktive Kernkompartiment“ (INC). Die oben beschriebenen Chromosomenterritorien (CTs) werden hier aus „topologisch assoziierten Chromatindomänen“ (TAD) aufgebaut, die ein Netzwerk von Chromatin-Domain-Clustern (CDCs) bilden: Das INC wird durch die kompakten, transkriptionell inaktiven Kerne der CDCs gebildet, während das ANC aus zwei Komponenten besteht. Das ist zum Einen die transkriptionell aktive Peripherie der CDCs, die so genannte Perichromatin-Region (PR; Rouquette et al. 2010); zum andern ist dies ein räumlich miteinander zusammenhängendes System von Kanälen, das Interchromatin Compartment (IC); es beginnt an den Kernporenkomplexen der Kernhülle und dient nuklearen Import-Export-Funktionen, so ähnlich wie ein Fluss/Kanalsystem bei den Meereshäfen beginnt und mit den Städten im Landesinneren verbunden ist. Chromatin-Schleifen können aus den CDCs/TADs herausragen und als Hauptorte der RNA-Synthese fungieren, entsprechend Flusshäfen im Binnenland. Das ANC ist hoch mit Proteinen und epigenetischen Markierungen für genetisch aktives Chromatin angereichert. Im Gegensatz hierzu ist das INC mit Markierungen für genetisch inaktive DNA angereichert. Das INC und das ANC stellen zwei strukturell unterschiedliche funktionelle „Phasen“ dar, deren „Phasenübergänge“ von großer funktioneller Bedeutung sind.

Diese Organisation des Zellkerns (zu weiteren Modellen auf molekularbiologischer Grundlage siehe Cremer et al. 2015) könnte eine Reihe von wichtigen Funktionen haben:

- Aufgrund des modularen Aufbaus aus einzelnen Chromatin-Domain-Clustern (CDCs) können die einzelnen Chromosomen für die Zellteilung leicht stärker verpackt (kondensiert) werden, ohne dass es zu einer Verhedderung der Chromatinfasern kommt;
- Die Verpackungsdichte eines Chromosomenterritoriums (oder eines Teils) kann rasch geändert werden, indem die verbindenden Chromatinfasern relaxieren oder aber stärker zusammengezogen werden; hierdurch kann die Zugänglichkeit bestimmter DNA-Sequenzen (Gene) für Proteine reguliert werden; wie jeder aus dem täglichen Leben weiß, kann bereits eine kleine Änderung räumlicher Parameter (eine Türe ist voll oder halb geöffnet) zu einer großen Änderung der Gebäudezugänglichkeit führen; in ähnlicher Weise könnten Änderungen der Kompaktierung zu einer Regulierung der Aktivität einzelner oder von Gruppen von Genen führen, ohne die Biochemie

(Abbau/Neubildung von Proteinen) ändern zu müssen; solche räumlich kontrollierte Änderungen der Genaktivität können also sehr schnell erfolgen und je nach Kompaktierungsgrad die Zugänglichkeit für bestimmte DNA-Sequenzen und damit deren Aktivität sehr präzise regeln;

- Die Anordnung genetisch aktiver Bereiche an der Oberfläche der CDCs/TADs gibt die Möglichkeit einer raschen und ungehinderten Interaktion mit Faktoren des Interchromatin-Kompartments, z. B. mit Proteinen, die von Hormonen oder allergischen Reaktionen ausgelöst und außen über die Kernporen an das Kerninnere weitergegeben werden; oder mit kurzen RNA-Molekülen, die sich an bestimmte Sequenzen der dort befindlichen DNA anlagern und so weitere Reaktionen auslösen können; insgesamt ergibt sich damit eine weitere Möglichkeit der schnellen Feinregulierung der Aktivität einzelner bestimmter Gene;
- Eine der wichtigsten Voraussagen des Modells ist die dynamische Verknüpfung von Chromatinstruktur und Genregulation: Sobald ein aktives Gen inaktiviert wird, findet eine Relokalisation vom ANC zum INC statt, unter gleichzeitiger Kompaktierung; sobald ein inaktives Gen aktiviert wird, wird seine Position vom INC zum ANC verschoben, unter gleichzeitiger Dekondensation; die dabei wirksamen „epigenetischen“ Mechanismen können biochemische Prozesse sein (Modifikation von DNA/Histonen), aber auch mechanische Einwirkungen, z. B. Druck/Zug auf die Zellmembran, der über cytoplasmatische Mikrofilamente auf die Kernhülle und die mit ihr verbundenen Chromatinstrukturen weiter geleitet wird (Gruenbaum & Foisner 2015; Roy et al. 2017).
- Auch die Reparatur von geschädigter DNA könnte durch einen solchen Aufbau wesentlich verbessert werden; es wurde bereits experimentell gezeigt, dass bei Schäden durch ionisierende Teilchen im Inneren von kompakten Chromatindomänen die betroffenen DNA-Stellen zur Reparatur an die Oberfläche solcher Domänen verlegt werden.



**Abbildung 6:** Ein aktuelles Modell der Kernorganisation. *Dieses Modell beruht auf der Annahme mit einander räumlich vernetzter genetisch aktiver und genetisch inaktiver Kompartimente. Das aktive Kernkompartiment (ANC) ist eine zusammengesetzte funktionelle Einheit aus einem dreidimensionalen Netzwerk von „Kanälen“, das bei den Kernporen beginnt und sich zwischen stärker kondensierten Zonen von Chromatin befindet; diese stärker kondensierten Zonen bilden das inaktive Kernkompartiment (INC); Das am Rand dieser INC befindliche dekondensierte Chromatin enthält die aktiv abgelesene (transkribierte) DNA; dort befinden sich auch die neu gebildete RNA und ihre Verarbeitungszone, sowie die neu gebildete DNA; auch die Reparatur der DNA findet dort statt. Diese hoch aktive Randzone wird zum aktiven Kernkompartiment (ANC) gezählt [aus Cremer et al. (2018)].*

## 7 Perspektiven für Biologie und Medizin

Die dynamische Organisation des Zellkerngenoms ist eine der heute noch offenen, wesentlichen Herausforderungen der biologischen Grundlagenforschung; ihre verbesserte Kenntnis könnte wesentlich dazu beitragen, die unglaublich verwickelte Dynamik epigenetischer biochemischer Prozesse zu verstehen: Warum zum Beispiel folgt die sequenzspezifische Methylierung bestimmter DNA-Basen oder dort befindlicher Histone ganz exakten und hochkomplexen Mustern, abhängig von Genaktivität, Zelltyp, Entwicklungsstand, Alter etc.? Gilt hier vielleicht etwas ähnliches wie bei vielen Proteinen, bei denen die chemisch induzierte Strukturänderung die Voraussetzung für ihre enzymatische Aktivität bildet? Jedenfalls würde eine derartige Hypothese Licht in das Dunkel dieser so verwickelten Verhältnisse bringen können. Besonders „spannend“ wäre es in diesem Zusammenhang auch, der Hypothese einer engen Verbindung zwischen der Kodierung des Langzeitgedächtnisses und der Kern-Genomstruktur der dabei beteiligten Neuronen nachzugehen. Hier gibt es viele Untersuchungen, die zeigen, dass bei den Speicherungsprozessen biochemisch vermittelte epigenetische Veränderungen des Chromatins stattfinden. Gemäß dem in Abb. 6 skizzierten Modell der dynamischen Genomorganisation müssten einzelne Neuronkerne entsprechende „lernbedingte“ Modifikationen ihrer Genom-Nanostruktur aufweisen. Mit neuen optischen Verfahren (seien es die supraauflösende Lichtmikroskopie, seien es aktuelle Methoden der Ultrastrukturmikroskopie wie Electron Spectroscopic Imaging) gibt es jetzt Wege, solche Hypothesen zu „falsifizieren“. Das wäre z. B. der Fall, wenn mit Nanometerauflösung gezeigt werden könnte, dass eine epigenetische Modifikation zu starker Änderung der Genaktivität führt, ohne aber irgend eine Modifikation der örtlichen Genomnanostruktur zu bewirken.

Die dynamische Organisation des Zellkerngenoms bildet auch eine Grundlage für neue Ansätze der Gesundheitsforschung. Wäre es z. B. möglich, gemäß dem ANC-INC-Modell (Abb. 6) die Kompaktierung von „Krebsgenen“ durch bestimmte Pharmamoleküle „epigenetisch“ zu verändern, so böte dies einen neuen Weg der Krebstherapie; ein weiteres Beispiel wäre die Entwicklung neuer Pharmaka zur Behandlung von Herzinfarkt und Schlaganfall: Wäre es möglich, durch solche Stoffe die durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel induzierte drastische Änderung der Chromatin-Nanostruktur (und damit der Genaktivität) rückgängig zu machen? Ähnliche Einflussmöglichkeiten könnte man sich beim Ersatz von Körpergewebe durch Reprogrammierung von Zellen vorstellen, oder bei der Verlangsamung des zellulären Alterungsprozesses. Heute mögen solche Spekulationen noch als

„Science Fiction“ erscheinen; ein umfassendes Verständnis der dynamischen Architektur des Zellkerns, bis hinunter zur molekularen Ebene könnte aber eine wesentliche Grundlage bieten, dem alten Menschheitstraum von einem langen Leben in Gesundheit und Jugend ein wenig näher zu kommen.

### **Danksagung**

Der vorstehende Beitrag gibt eine Zusammenfassung gemeinsamer jahrzehntelanger Forschungstätigkeit mit Thomas und Marion Cremer (1978 – 1995 Universität Heidelberg, Institut für Humangenetik & Anthropologie; seit 1996 Biozentrum LMU München). Erweiterte allgemeine Darstellungen hierzu finden sich in: T. Cremer, M. Cremer, C. Cremer (2016) „Chromosomenterritorien und Chromatindomänen“. *Biologie in unserer Zeit* 5: 290–299. doi:10.1002/biuz. 201810640; C. Cremer, A. Szczurek, H. Strickfaden, U. Birk, M. Cremer, T. Cremer (2018) „Chromatin-Nanoarchitektur und Genregulation“. *Biologie in unserer Zeit (BIUZ)* 1/2018 (48), pp. 45–53).

Bei der Entwicklung der oben skizzierten Methoden zur Erforschung der Zellkernstruktur an den Universitäten Freiburg (Institut für Anthropologie und Humangenetik, 1970–1978), Heidelberg (Institut für Anthropologie und Humangenetik, Kirchhoff-Institut für Physik, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, seit 1978) und München (Biozentrum LMU, seit 1996) sowie am Institut für Molekulare Biologie (IMB) Mainz (seit 2011) haben zahlreiche Diplomanden, Doktoranden, wissenschaftliche Mitarbeiter, PostDocs und Habilitanden, sowie weitere Kooperationspartner und Förderer aus vielen anderen Institutionen mitgewirkt, denen hier sehr herzlich gedankt sei (siehe [www.optics.imb-mainz.de](http://www.optics.imb-mainz.de)). Für Hinweise auf neue Resultate sei hier insbesondere gedankt: Dr. Aleksander Szczurek (IMB; jetzt Oxford/UK), Shih-Ya Chen (IMB/Cremer-Lab) und Hilmar Strickfaden (Edmonton), sowie Antonius van Dongen (Singapur). Die Forschungen wurden unterstützt vom Land Baden-Württemberg, der DFG, dem BMBF, der EU sowie von der Boehringer Ingelheim Stiftung.

## Literatur

Aus der inzwischen außerordentlich großen Literatur können hier nur einige Hinweise gegeben werden.

- Baddeley D, Chagin VO, Schermelleh, Martin S, Pombo A, Carlton PM, Gahl A, Domaing P, Birk U, Leonhardt H, Cremer C, Cardoso C (2010) Measurement of replication structures at the nanometer scale using super-resolution light microscopy. *Nucleic Acids Research* 38, No. 2 e8 doi:10.1093/nar/gkp901.
- Barbieri M, Scialdone A, Piccolo A, Chiariello AM, di Lanno C, et al. (2013) Polymer models of chromatin organization. *Front Genet* 4: 113.
- Bazett-Jones DP, Li R, Fussner E, Nisman R, Dehghani H (2008) Elucidating chromatin and nuclear domain architecture with electron spectroscopic imaging. *Chromosome Res* 16: 397–412.
- Bechhoefer J (2015) What is superresolution microscopy? *Am J Phys* 83: 22–29.
- Betzig E et al. (2006): Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* 313:1642–1645.
- Birk UJ (2017). Super-resolution microscopy: A practical guide. John Wiley & Sons, Weinheim: 408 pg.
- Bohn M, Diesinger P, Kaufmann R, Weiland Y, Müller P, Gunkel M, von Ketteler A, Lemmer P, Hausmann M, Cremer C (2010) Localization microscopy reveals expression dependent parameters of chromatin nanostructure. *Biophys. J.* 99: 1358 – 1367.
- Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, et al. (2005) Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol*, 2005, 3, e157.
- Boveri T (1909) Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch Zellforsch* 3: 181–268.
- Comings DE (1968) The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Am J Hum Genet* 20: 440–460.
- Cremer C (2018) Mit Laserlicht ins Innerste des Zellkerns. In: „Physiker erinnern sich“, Fakultät für Physik & Astronomie Univ. Heidelberg, pp. 1–49. <https://www.physi.uniheidelberg.de/physikerberichten/Cremer-Band-4-2018-01-23.pdf>
- Cremer C, Masters BR (2013) Resolution enhancement techniques in microscopy. *Eur Phys J H* 38: 281–344.
- Cremer C, Cremer T (1978) Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field. *Microsc Acta* 81:31–44.

- Cremer C, Szczurek A, Schock F, Gourram A, Birk U (2017) Super-resolution microscopy approaches to nuclear nanostructure imaging. *Methods* 123: 11–32.
- Cremer C, Szczurek A, Strickfaden H, Birk U, Cremer M, Cremer T (2018) Chromatin-Nanoarchitektur und Genregulation. *Biologie in unserer Zeit (BIUZ)* 1/2018 (48), pp. 45 – 53. doi:10.1002/biuz. 201810640.
- Cremer C (2011) Lokalisationsmikroskopie - Lichtmikroskopie unterhalb des Abbe-Limits. *Physik in Unserer Zeit* 42: 21 – 29.
- Cremer M, Küpper K, Wagler B, Wizelman L, v. Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T (2003) Inheritance of gene-density related doi: higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* 162: 809-820.
- Cremer T, Cremer M, Cremer C (2018) The 4D Nucleome: Genome Compartmentalization in an Evolutionary Context. *Biochemistry (Moscow)* 83: 313–325.
- Cremer T (1985) Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie, Naturwissenschaftliche Erkenntnis und Theorienwechsel in der frühen Zell- und Verebungsforschung. Heidelberg: Springer Verlag.
- Cremer T, Cremer M, Cremer C (2016) Chromosomenterritorien und Chromatindomänen (Chromosome territories and chromatin domains). *Biologie in unserer Zeit* 5: 290 – 299.
- Cremer T, Cremer C (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2: 292–301.
- Cremer T, Cremer C (2006a) Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories. *Eur J Histochem* 50: 161–176.
- Cremer T, Cremer C (2006b) Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s; Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present. *Eur J Histochem* 50: 223–272.
- Cremer T, Cremer M (2010) Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003889.
- Cremer T, Dietzel S, Eils R, Lichter P, Cremer C (1995) Chromosome territories, nuclear matrix filaments and inter-chromatin channels: a topological view on nuclear architecture and function. In: Brandham PE, Bennet MD, editors; *Royal Botanic Gardens, Kew*. pp. 63–81.
- Cremer T, Kurz A, Zirbel R, Dietzel S, Rinke B, et al. (1993) Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58: 777–792.

- Cremer T, Kreth G, Koester H, Fink RH, Heintzmann R, et al. (2000) Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10: 179–212.
- Cremer T, Cremer M, Hübner B, Strickfaden H, Smeets D, Popken J, Sterr M, Markaki Y, Rippe K, Cremer C (2015) The 4D nucleome: Evidence for a dynamic nuclear landscape based on coaligned active and inactive nuclear compartments. *FEBS Lett* 589: 2931–2943.
- Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome specific library probes. *Hum Genet*, 80: 235–246.
- Cremer T, Cremer C, Lichter P (2014) Recollections of a scientific journey published in human genetics: from chromosome territories to interphase cytogenetics and comparative genome hybridization. *Hum Genet* 133: 403–416.
- Dekker J, Marti-Renom MA, Mirny LA (2013) Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data. *Nat Rev Genet* 14: 390–403.
- Diesinger PM, Heermann DW (2006) Two-angle model and phase diagram for chromatin. *Physical Review E* 74: 031904-1 – 031904-8.
- Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, et al. (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485: 376–380.
- Esa A et al. (2000) Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome. *Journal of Microscopy* 199: 96–105.
- Fornasiero EF, Opazo F (2015) Super-resolution imaging for cell biologists: Concepts, applications, current challenges and developments. *Bioessays* 37: 436–451.
- Gibcus JH, Dekker J (2013) The hierarchy of the 3D genome. *Mol Cell* 49: 773–782.
- Gruenbaum Y, Foisner R (2015) Lamins: nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Ann. Rev. Biochem* 84: 131-164.
- Gunkel M, et al. (2009) Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. *Biotechnology J.* 4: 927 – 938.
- Gustafsson, MGL (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* 198: 82 - 87.
- Habermann FA, Cremer M, Walter J, Kreth G, von Hase J., et al. (2001), Arrangements of macro and microchromosomes in chicken cells. *Chromosome Res*, 9: 569–584.



- Han D, Pal S, Nangreave J, Deng Z, Liu Y, Yan H (2011) DNA Origami with Complex Curvatures in Three-Dimensional Space. *Science* 332: 342-346.
- Hancock R, Jeon KW (2014) Preface. New models of the cell nucleus: crowding, entropic forces, phase separation, and fractals. *Int Rev Cell Mol Biol* 307: xiii.
- Heintzmann R, Cremer C (1999) Lateral modulated excitation microscopy: Improvement of resolution by using a diffraction grating. *Proc. SPIE* 3568: 185-196.
- Hübschmann D, Kepper N, Cremer C, Kreth G (2010) Quantitative Approaches to Nuclear Architecture Analysis and Modelling, in: N.M. Adams and P.S. Freemont (eds.), *Advances in Nuclear Architecture*, 87 – 129. DOI 10.1007/978-90-481-9899-3\_3, Springer Inc.
- Kirmes I, Szczurek A, Prakash K et al. (2015) A transient ischemic environment induces reversible compaction of chromatin. *Genome Biology* 16: 246 (pp. 1–19), doi:10.1186/s13059-015-0802-2.
- Kosak ST, Groudine M (2004) Form follows function: The genomic organization of cellulardifferentiation. *Genes Dev* 18: 1371–1384.
- Lanctot C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T (2007) Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8: 104–115.
- Langowski J (2006) Polymer chain models of DNA and chromatin. *Eur. Phys. J. E* 19: 241-249.
- Laurent M, Johannin G, Le Guyader H, Fleury A (1992), Confocal scanning optical microscopy and three-dimensional imaging. *Bio Cell*, 76: 113–124.
- Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, et al. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326: 289–293.
- Markaki Y, Gunkel M, Schermelleh L, Beichmanis S, Neumann J, et al. (2010) Functional nuclear organization of transcription and DNA replication: a topographical marriage between chromatin domains and the interchromatin compartment. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75: 475–492.
- Markaki Y, Smeets D, Fiedler S, Schmid VJ, Schermelleh L, et al. (2012) The potential of 3D-FISH and super-resolution structured illumination microscopy for studies of 3D nuclear architecture: 3D structured illumination microscopy of defined chromosomal structures visualized by 3D (immuno)-FISH opens new perspectives for studies of nuclear architecture. *Bioessays* 34: 412–426.
- Mirny LA (2011) The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell. *Chromosome Res* 19: 37–51.
- Nagano T, Lubling Y, Stevens TJ, Schoenfelder S, Yaffe E, et al. (2013) Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature* 502: 59–64.

- Nicodemi M, Pombo A (2014) Models of chromosome structure. *Curr Opin Cell Biol* 28: 90–95.
- Nozaki T, Imai R, Tanbo M, Nagashima R, Tamura S, Tani T, Joti Y, Tomita M, Hibino K, Kanemaki MT, Wendt KS, Okada Y, Nagai T, Maeshima K (2017) Dynamic Organization of Chromatin Domains Revealed by Super-Resolution Live-Cell Imaging. *Molecular Cell* 67: 282–293.
- Olins A L & Olins D E (1974) Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183: 330-332.
- Ou HD, Phan S, Deerinck TJ, Thor A, Ellisman MH, O’Shea CC (2017) ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science*, 357.
- Pederson T (2014) The nuclear physique. *Int Rev Cell Mol Biol* 307: 1–13.
- Popken J, Brero A, Koehler D, Schmid VJ, Strauss A, et al. (2014) Reprogramming of fibroblast nuclei in cloned bovine embryos involves major structural remodeling with both striking similarities and differences to nuclear phenotypes of in vitro fertilized embryos. *Nucleus* 5: 555–589.
- Popken J, Graf A, Krebs S, Blum H, Schmid VJ et al. (2015) Remodeling of the Nuclear Envelope and Lamina during Bovine Preimplantation Development and its Functional Implications. *PLoS One*, 2015, 10, e012.
- Prakash K, Fournier D (2017) Histone Code and higher-order chromatin folding: A hypothesis. *Genomics and Computational Biology* 3, No. 2: e41.
- Rao SS, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, et al. (2014) A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping *Cell* 159: 1665–1680.
- Reymann J, Baddeley D, Gunkel M, Lemmer P, Stadter W, et al. (2008) High-precision structural analysis of subnuclear complexes in fixed and live cells via spatially modulated illumination (SMI) microscopy. *Chromosome Res* 16: 367–382.
- Rouquette J, Cremer C, Cremer T, Fakan S (2010) Functional nuclear architecture studied by microscopy: present and future. *Int Rev Cell Mol Biol* 282: 1–90.
- Roy B, Venkatachalapathy S, Ratna P, Wang Y, Doorgesh DS, Nagarajan M, Shivashankar GV (2017) Laterally confined growth of cells induces nuclear reprogramming in the absence of exogenous biochemical factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115: E4741 - E4750.
- Schermelleh L, Solovei I, Zink D, Cremer T (2001) Two-color fluorescence labeling of early and mid-to-late replicating chromatin in living cells. *Chromosome Res* 9: 77–80.
- Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhard H (2010) A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 190: 165–175.

- Sexton T, Cavalli G (2015) The Role of Chromosome Domains in Shaping the Functional Genome. *Cell* 160: 1049–1059.
- Shechtman Y, Gustavsson A-K, Petrov PN, Dultz E, Lee MY, Weis K, Moerner WE (2017) Observation of live chromatin dynamics in cells vis 3D localization microscopy using Tetrapod point spread functions. *Biomedical Optics Express* 8: 5735.
- Smeets D, Markaki Y, Schmid VJ, Kraus F, Tattermusch A, et al. (2014) Three-dimensional superresolution microscopy of the inactive X chromosome territory reveals a collapse of its active nuclear compartment harboring distinct Xist RNA foci. *Epigenetics Chromatin* 7: 8.
- Solovei I, Kreysing M, Lanctot C, Kosem S, Peichl L, et al. (2009) Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137: 356–368.
- Szczurek A, Klewes L, Xing J et al (2017) Imaging chromatin nanostructure with binding-activated localisation microscopy based on DNA structure fluctuations. *Nucl. Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkw1301.
- Tanabe H, Muller S, Neusser M, von Hase J et al (2002) Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci* 99: 4424–4429.
- Tashiro S, Lanctot C (2015) The international nucleome consortium. *Nucleus* 6: 89–92.
- Vogel F, Schroeder TM (1974) The internal order of the interphase nucleus. *Humangenetik* 25: 265–297.
- Wendt KS, Grosveld FG (2014) Transcription in the context of the 3D nucleus. *Curr Opin Genet Dev* 25: 62–67.
- Williamson I, Berlivet S, Eskeland R, Boyle S, Illingworth RS, et al. (2014) Spatial genome organization: contrasting views from chromosome conformation capture and fluorescence in situ hybridization. *Genes Dev* 28: 2778–2791.
- Wischnitzer, S (1973) The submicroscopic morphology of the interphase nucleus. *Int Rev Cytol*,34, 1–48.
- Woringer M, Darzacq X, Izeddin I (2014) Geometry of the nucleus: a perspective on geneexpression regulation. *Curr Opin Chem Biol* 20: 112–119.
- Zessin PJ, Finan K, Heilemann M (2012) Super-resolution fluorescence imaging of chromosomal DNA. *J Struct Biol* 177: 344–348.
- Zorn C, Cremer C, Cremer T, Zimmer J (1979) Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. *Exp Cell Res* 124: 111–119.

## Über den Autor

Christoph Cremer studierte Physik an den Universitäten München und Freiburg. Nach Promotion zum Dr. rer. nat. und Habilitation an der Universität Freiburg i. Br. arbeitete er 1983–2011 als Professor (seit 2004 Ordinarius) für Angewandte Optik und Informationsverarbeitung am Kirchhoff-Institut für Physik (KIP) der Universität Heidelberg. Derzeit ist er tätig am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB), dem Interdisziplinären Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen (IWR) der Universität, sowie Arbeitsgruppenleiter am Institut für molekulare Biologie (IMB) und Honorarprofessor (Physik) an der Universität Mainz, sowie Research Associate am dortigen Max-Planck-Institut für Chemie. Sein aktuelles Arbeitsgebiet ist die Entwicklung super-auflösender Lichtmikroskopieverfahren mit Anwendungs-Schwerpunkten bei der Erforschung der Zellkern-Architektur. Er ist Autor/Co-Autor von mehreren hundert Originalpublikationen.

### **Korrespondenz:**

Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer  
Group Leader Superresolution Microscopy  
Institute of Molecular Biology (IMB)  
Ackermannweg 4  
55128 Mainz  
Germany  
E-Mail: [cremer@kip.uni-heidelberg.de](mailto:cremer@kip.uni-heidelberg.de), [c.cremer@imb-mainz.de](mailto:c.cremer@imb-mainz.de)