

Ayleen Sprysch<sup>1</sup>  
 Simone Kröger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universität Münster

## **Faszination Fluoreszenzmikroskopie Experimente für ein Schülerlabor**

### **Relevanz der Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht Forschenden in den Lebenswissenschaften seit Jahrzehnten Einblicke in Zellen verschiedenster Organismen und liefert dabei Grundlagen für wesentliche wissenschaftliche Erkenntnisse. Der spezielle Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops führt dazu, dass in den mikroskopischen Aufnahmen nur die zellulären Strukturen in fluoreszierenden Farben zu erkennen sind, die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, während andere Strukturen nicht dargestellt werden und buchstäblich in den Hintergrund treten. Dies ermöglicht es Forschenden, gezielt Strukturen und Stoffwechselprozesse in der Zelle zu untersuchen und wissenschaftlichen Fragestellungen nachzugehen. Daher gehört die Fluoreszenzmikroskopie mittlerweile zum Standard in den Laboren der Lebenswissenschaften (Kubitschek, 2017, Lichtman & Conchello, 2005). So wird die Fluoreszenzmikroskopie unter anderem in der Grundlagenforschung eingesetzt, um den Aufbau und die Funktionsweise von Zellen, Geweben und ganzen Organismen besser verstehen zu können. Die vielfältigen Einsatzbereiche der Fluoreszenzmikroskopie spiegeln sich beispielsweise im *Cells in Motion Interfaculty Centre* der Universität Münster wider. In diesem Netzwerk entwickeln Forschende in interdisziplinärer Zusammenarbeit den Forschungsschwerpunkt „Zelldynamik und Bildgebung“ weiter (*Cells in Motion Interfaculty Centre*, 2022). Die interdisziplinäre Ausrichtung der Fluoreszenzmikroskopie sowie ihre hohe Relevanz im Forschungsalltag in den Lebenswissenschaften machen sie zu einem interessanten Thema für die Curriculare Innovationsforschung.

### **Experimentelle Erschließung der Fluoreszenzmikroskopie im Rahmen der Curricularen Innovation**

In der Curricularen Innovationsforschung, die auf Michael Tausch und seine Arbeitsgruppe zurückgeht, werden aktuelle, innovative Themen aus der wissenschaftlichen Forschung für die Lehre erschlossen, die Anknüpfungspunkte an obligatorische Inhalte aus dem Chemieunterricht bieten (Tausch, 2004, Parchmann et al., 2017). Der fachlich-konzeptionellen Erschließung des curricular innovativen Themas folgt die Elementarisierung der Fülle an Informationen, also eine didaktische Reduktion der Inhalte auf solche, die für Schüler:innen relevant sein können. Die didaktische Reduktion unterliegt der Prämisse, dass die Inhalte wissenschaftlich konsistent dargestellt werden. Im Zentrum der Curricularen Innovationsforschung steht die Entwicklung von Experimenten und die Konzeption von Lehr-Lern-Materialien, sowie die Erprobung und Optimierung dieser (Kröger geb. Krees, 2013, Gust, 2022).

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet multiperspektivisch Potential zur Anknüpfung an Inhalte aus dem Chemieunterricht. In diesem Projekt wird der Fokus auf die Fluoreszenzfarbstoffe gelegt, die der Markierung zellulärer Strukturen dienen. Forschende können aus einer großen Vielzahl an verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wählen, um gezielt zelluläre Strukturen und

Stoffwechselprozesse zu markieren. Dabei werden unter anderem Kriterien wie der Aufbau der zu untersuchenden zellulären Struktur, die Einbringung des Fluoreszenzfarbstoffes in diese, sein Emissionsspektrum oder seine Eignung, lebende oder fixierte Zellen anzufärben, berücksichtigt (vgl. z.B. Kubitschek, 2017, Schmitt, 2016, Thermo Fisher Scientific, 2010, Xu et al., 2016). Die Fülle an Möglichkeiten zur Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen in der Forschung wurde didaktisch reduziert und es wurden wesentliche Prinzipien zur Anfärbung herausgestellt, die sowohl wissenschaftlich konsistent sind als auch Anknüpfungspunkte an den Chemieunterricht bieten.

### **Modellexperimente zur Anfärbung zellulärer Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen**

Die Prinzipien zur Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen werden in Modellexperimenten veranschaulicht. Bei der Entwicklung der Experimente liegen folgende Kriterien zugrunde:

Jedes Modellexperiment soll ein gängiges Prinzip zur fluoreszenzmikroskopischen Anfärbung zellulärer Strukturen repräsentieren und mit diesem wissenschaftlich konsistent sein. Die erzielten Beobachtungen in den Modellexperimenten sollen didaktisch prägnant sowie anhand der Basiskonzepte durch die Schüler:innen erklärbar sein.

Die in den Modellexperimenten herausgestellten Prinzipien zur Anfärbung basieren auf bestimmten Eigenschaften oder einem spezifischen Aufbau der jeweiligen zellulären Strukturen. Dabei werden vor allem chemische Unterschiede im Aufbau der Zellstrukturen in den Fokus gerückt. In Tabelle 1 sind die vier Modellexperimente für die Fluoreszenzanfärbung der Zellmembran, der Mitochondrien (in Anlehnung an Weiß & Brandl, 2013), des Zellkerns (in Anlehnung an Wagner & MacDonald, 1998) und der Lysosomen aufgeführt. Es werden Eigenschaften bzw. der Aufbau der zellulären Struktur genannt, auf denen eine Anfärbung in der Fluoreszenzmikroskopie basieren kann, sowie das zugrundeliegende Prinzip benannt. Anschließend wird die Umsetzung im Modellexperiment beschrieben und mögliche Anknüpfungspunkte an Inhalte aus dem Chemieunterricht genannt, die sich zusätzlich zum Anknüpfungspunkt „Farbstoffe“ ergeben (Kultusministerkonferenz, 2020).

### **Einbettung der Modellexperimente in eine Schülerlaboreinheit**

Die Modellexperimente werden im Rahmen einer Schülerlaboreinheit eingesetzt. Adressat:innen sind Lernende eines Chemiekurses der Sekundarstufe II. Die Lernenden erarbeiten in Kleingruppen selbstständig fachliche Hintergründe anhand von Modellexperimenten und Begleitmaterial, gefolgt von einer gemeinsamen Sicherung durch Einsatz eines 3D-gedruckten Zellmodells. Fachliche Ziele der Schülerlaboreinheit sind das Erschließen von Prinzipien zur Fluoreszenzmarkierung wesentlicher zellulärer Strukturen sowie den Lernenden Einblicke in die Fluoreszenzmikroskopie als aktuelles und interdisziplinäres Thema zu ermöglichen.

### **Ausblick**

Im weiteren Forschungsprozess soll unter anderem folgenden Fragen nachgegangen werden: Kann die Immunfluoreszenzfärbung im Modellexperiment veranschaulicht werden? Kann die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen erfolgen? Kann ein 3D-gedrucktes Zellmodell dynamisch gestaltet werden? Können Aufbau und Funktionsweise eines Fluoreszenzmikroskops im Modell veranschaulicht werden?

*Tabelle 1: Modellexperimente zur Anfärbung zellulärer Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Aufgeführt sind Eigenschaften bzw. der Aufbau der modellhaft angefärbten zellulären Struktur, das zugrundeliegende Prinzip der Anfärbung in der Fluoreszenzmikroskopie (FM) sowie eine kurze Versuchsbeschreibung des Modellexperiments und Anknüpfungspunkte an Inhalte des Chemieunterrichts. Die Modellexperimente werden unter UV-Licht ausgewertet ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ).*

Die Zellmembran	Die Mitochondrien
<b>Eigenschaft / Aufbau</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aufbau aus einer Phospholipid-Doppelschicht</li> <li>- amphiphile Eigenschaften der Phospholipide</li> </ul>	<b>Eigenschaft / Aufbau</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ort der Atmungskette</li> <li>- oxidierende Proteinkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran</li> </ul>
<b>Prinzip der Anfärbung in der FM</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verteilung des Farbstoffes aufgrund von Hydrophilie / Lipophilie</li> <li>- Einlagerung lipophiler Farbstoffe in der lipophilen inneren Schicht der Membran</li> </ul>	<b>Prinzip der Anfärbung in der FM</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- keine Fluoreszenz der reduzierten Form des Farbstoffes</li> <li>- Auftreten von Fluoreszenz nach Oxidation des Farbstoffes in den Mitochondrien</li> </ul>
<b>Modellexperiment</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hinzugabe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe zu einem Zwei-Phasen-Gemisch aus Wasser und Octanol</li> <li>- Repräsentation des Cytosols und der extrazellulären Flüssigkeit durch die wässrige Phase</li> <li>- Repräsentation der Zellmembran durch die organische Phase</li> </ul>	<b>Modellexperiment</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fluoreszenz von wässriger Riboflavin-Lösung unter UV-Licht</li> <li>- Erlöschen der Fluoreszenz bei Hinzugabe von Natriumdithionit-Lösung durch Reduktion des Farbstoffes</li> <li>- erneutes Auftreten der Fluoreszenz bei Reoxidation durch den Luftsauerstoff</li> <li>- mehrfache Durchführung möglich</li> </ul>
<b>Anknüpfungspunkte</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verbindungen mit funktionellen Gruppen</li> <li>- intermolekulare Wechselwirkungen</li> </ul>	<b>Anknüpfungspunkte</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Elektronenübergänge (Redoxreaktionen als Elektronenübergang)</li> </ul>
Der Zellkern	Die Lysosomen
<b>Eigenschaft / Aufbau</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vorliegen der DNA</li> </ul>	<b>Eigenschaft / Aufbau</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- pH-Wert innerhalb der Lysosomen von 4 bis 5</li> <li>- niedrigerer pH-Wert als im neutralen Cytosol</li> </ul>
<b>Prinzip der Anfärbung in der FM</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- deutliche Fluoreszenzverstärkung des Farbstoffes bei Bildung einer Einschlussverbindung mit der DNA</li> </ul>	<b>Prinzip der Anfärbung in der FM</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- pH-Wert-abhängige Fluoreszenz des Farbstoffes</li> </ul>
<b>Modellexperiment</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- geringe Fluoreszenz von 8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure-Ammoniumsalz (1,8-ANS) in wässriger Lösung</li> <li>- Fluoreszenzverstärkung bei Hinzugabe von Hydroxypropyl-<math>\beta</math>-Cyclodextrin (HP-<math>\beta</math>-CD) durch Bildung einer Einschlussverbindung</li> </ul>	<b>Modellexperiment</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- zwei pH-Reihen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen</li> <li>- pH-Wert-abhängige Fluoreszenzintensität bzw. Fluoreszenzfarbe von Uranin bzw. Pyranin</li> <li>- Repräsentation des sauren Milieus der Lysosomen bei einem pH-Wert von 4 bis 5</li> </ul>
<b>Anknüpfungspunkte</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- koordinative Bindungen</li> </ul>	<b>Anknüpfungspunkte</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Protonenübergänge (Säure-Base-Konzept nach Brønsted)</li> </ul>

### Literatur

- Cells in Motion Interfaculty Centre (2022). Homepage der Einrichtung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Online verfügbar unter der URL <https://www.uni-muenster.de/Cells-in-Motion/de/> [Stand 31.10.2022].
- Gust, F. (2022). Das Self-assemblyLAB – Entwicklung, Erprobung und Optimierung eines curricular innovativen Schülerlabors zum Thema Self-assembly. Berlin: Logos Verlag.
- Kröger geb. Krees, S. (2013). Curriculare Innovation als Herausforderung für die Chemiedidaktik. Antrittsvorlesung an der WWU Münster.
- Kubitscheck, U. (Hrsg.) (2017). Fluorescence microscopy. From Principles to Biological Applications (2. Aufl.). Weinheim: Wiley-VCH.
- Kultusministerkonferenz (2020). Bildungsstandards im Fach Chemie für die Allgemeine Hochschulreife. Beschluss der Kultusministerkonferenz vom 18.06.2020. Hürth: Wolters Kluwer.
- Lichtman, J. W. & Conchello, J.-A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2 (12), 910–919.
- Parchmann, I., Schwarzer, S., Wilke, T., Tausch, M. & Waitz, T. (2017). Von Innovationen der Chemie zu innovativen Lernanlässen für den Chemieunterricht und darüber hinaus. *Chemkon*, 24 (4), 161–164.
- Schmitt, S. (2016). Funktionalisierte Fluoreszenzfarbstoffe für Biologie und Medizin. *Praxis der Naturwissenschaften – Chemie in der Schule*, 65 (1), 10–15.
- Tausch, M. (2004). Curriculare Innovation. *Praxis der Naturwissenschaften – Chemie in der Schule*, 53 (8), 18–21.
- Thermo Fisher Scientific (2010). The Molecular Probes™ Handbook – A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Online verfügbar unter der URL: <https://www.thermofisher.com/handbook> [Stand 31.10.2022].
- Wagner, B. D. & MacDonald, P. J. (1998). The fluorescence enhancement of 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) by modified  $\beta$ -cyclodextrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 114 (2), 151–157.
- Weiß, D. & Brandl, H. (2013). Experimente mit Pflanzeninhaltsstoffen. Fluoreszenzfarbstoffe in der Natur. Teil 2 von 2. *Chemie in Unserer Zeit*, 47, 122–131.
- Xu, W., Zeng, Z., Jiang, J.-H., Chang, Y.-T. & Yuan, L. (2016). Wahrnehmung der chemischen Prozesse in einzelnen Organellen mit niedermolekularen Fluoreszenzsonden. *Angewandte Chemie*, 128 (44), 13858–13902.