

Indol-3-essigsäure induzierte Calciumionen-abgabe bei Maiskoleoptilzylindern

3-Indol Acetic Acid Induced Efflux of Calciumions by Maize Coleoptile Sections

Boris Janistyn

Institut für Pharmazeutische Biologie,
Universität Freiburg/Br.

(Z. Naturforsch. **28 c**, 777–778 [1973]; eingegangen
am 24. September 1973)

3-Indol acetic acid, calcium, adenosin-3':5'-monophosphat
(c-AMP), maize coleoptile sections

Wie bereits berichtet¹, ließ sich bei Maiskoleoptilzylindern, welche in eine auxinfreie Pufferlösung gelegt wurden, eine Indol-3-essigsäure (IES) induzierte Nukleotidabgabe nachweisen. Durch $[8-^{14}\text{C}]$ -Adenin-Inkubationsversuche konnte Adenosin-3':5'-monophosphorsäure (cAMP) als das maßgebliche Nukleotid bestimmt werden¹.

In der tierischen Zelle wird cAMP als intracellulärer Auslöser („second messenger“) vieler Hormonwirkungen angesehen^{2, 3}. Damit cAMP wirksam werden kann, ist die Anwesenheit von Calciumionen notwendig⁴.

Es sprechen nun viele Befunde für einen direkten Zusammenhang zwischen der Calciumionen- und der cAMP-Konzentration^{4, 5}. Da das Calciumion als natürlicher Inhibitor des Koleoptil-Streckungswachstums gilt⁶, versuchten wir in Anlehnung an die

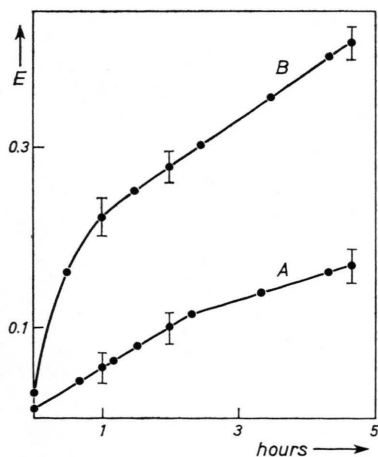


Abb. 1. Die Kurven A und B stellen die Calciumionen-Abgabe in die Arsenazo III ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)-haltige Pufferlösung bei 24°C dar (A, durchlüftet; B, mit Sauerstoff).

Sonderdruckanforderungen an Dr. B. Janistyn, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität, D-7800 Freiburg, Schänzlestr. 9–11.

Nukleotidabgabe-Versuche, die Calciumionen-Konzentration in der Pufferlösung zu bestimmen.

Für einen photometrischen Nachweis einer etwaigen Calciumionenabgabe benutzten wir den Komplexbildner Arsenazo III (1.8-Dihydroxy-naphthalin-3.6-disulfonsäure-2.7-bis(azo-2)-phenylsarsonsäure), welcher um pH 6 eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit für Calciumionen besitzt ($0,04 \mu\text{g Ca}^{2+} \text{ ml}^{-1}$, pH 5,5)⁷.

Wie die Abb. 1 zeigt, treten in einer auxinfreien Arsenazo enthaltenden Pufferlösung, in die Maiskoleoptilzylinder gelegt werden, sehr schnell Calciumionen auf, deren Konzentration vom jeweiligen Sauerstoffpartialdruck abhängt. Weitere Versuche ergaben zusätzlich eine deutliche Temperaturabhängigkeit. Wird nunmehr, bei erreichtem konstanten Anstieg der Calciumionen-Konzentration zu der auxinfreien Pufferlösung IES (10^{-5} M) gegeben, so steigt die Calciumionen-Konzentration gegenüber der Kontrolle schnell und über mehrere Stunden an (Abb. 2). Die Extinktion von 0,01 zum

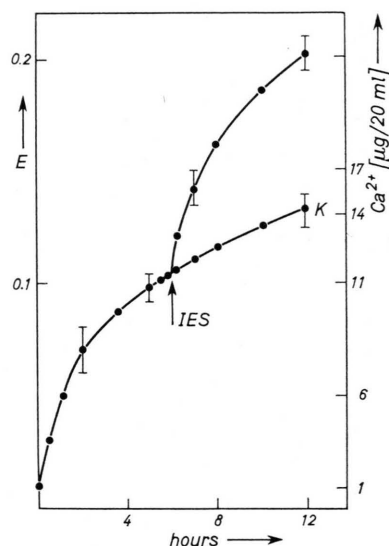


Abb. 2. Zeitabhängigkeit der Zunahme der Calciumionen-Konzentration in der Arsenazo III ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)-haltigen Pufferlösung bei 20°C , vor und nach Zugabe von Indol-3-essigsäure (10^{-5} M) (K = Kontrolle). Die Angabe der jeweiligen Calciumionen-Konzentration basiert auf einer Standardkurve. Dazu wird die Extinktion E gegen verschiedene Calciumionen-Konzentrationen (μg in 20 ml Pufferlösung) aufgetragen.

Zeitpunkt $t=0$, d.h. direkt nach Einbringen der Koleoptilzylinder in den Puffer, entspricht einem Calciumionengehalt von $1 \mu\text{g}$. Nach 12 h Versuchsdauer beträgt die Calciumionen-Konzentration in 20 ml Pufferlösung mit IES $22 \mu\text{g}$ und die der Kontrolle $14 \mu\text{g}$.

Der Längenzuwachs der Koleoptilzylinder wird innerhalb der Versuchsbedingungen durch Arsenazo III nicht beeinflusst. Werden an Stelle von IES die Wuchsstoffanaloga 2.4-Dichlorphenoxyessigsäure (2.4-D), α -Naphthylessigsäure (NAE) und β -Naphthylessigsäure (NAE) zugegeben (alle 10^{-5} M), so beginnt erst nach über 30 min eine gegenüber der IES-Zugabe deutlich schwächere Calciumionen-Abgabe aufzutreten. Im Gegensatz zu der IES induzierten Calciumionen-Abgabe sind bei Wuchsstoffanaloga-Zugabe stärkere Schwankungen der jeweiligen Calciumionen-Konzentration festzustellen, so daß wir bewußt auf eine graphische Darstellung verzichtet haben. Ähnliche Konzentrationsschwankungen stellen sich auch bei der nachfolgend genannten TIBA-Zugabe ein.

Die Zugabe des IES-Transporthemmers 2.3.5-Triiodbenzoesäure (TIBA) (10^{-5} M) vor der IES-Zugabe ergibt eine Calciumionen-Abnahme aus der Pufferlösung. Eine etwaige Komplexbildung zwischen TIBA und den Calciumionen konnte nicht festgestellt werden.

Diskussion

Die in der Abb. 1 dargestellten Kurven zeigen neben der deutlichen Abhängigkeit der Calciumionen-Abgabe vom Sauerstoff-Partialdruck zwei Phasen des Kurvenverlaufes, die im Falle der Sauerstoffzugabe besonders deutlich erkennbar sind.

Ebenso verhält sich der Kurvenverlauf der von uns gefundenen Nukleotidabgabe¹ und Wachstumskurven von Koleoptilzylindern ohne IES-Zugabe⁸.

In den genannten Fällen erfolgt die Änderung des Kurvenverlaufes stets nach etwa zwei Stunden, so daß eine zeitliche Korrelation verschiedener Reaktionen naheliegt. Die Calciumionenabgabe nach IES-Zugabe stellt einen neuen, schnellen und gut meßbaren Auxin-Effekt dar. Eine Erklärungsmöglichkeit für das rasche Auftreten der Calciumionen könnte sein, daß bei der auxininduzierten Umsetzung von Adenosin-5'-triphosphorsäure (ATP)

zu c-AMP^{9-11,1} die wahrscheinlich als Calciumionen-ATP-Komplex¹² vorliegenden Calciumionen freigesetzt werden, da c-AMP Calciumionen nicht mehr komplex zu binden vermag.

Bindungsstellen für Calciumionen sind auch in oder an der Zellwand anzunehmen, so daß durch allosterische Effekte von Membrananteilen ebenfalls Unterschiede in der Calciumionen-Konzentration auftreten könnten. Die Versuchsdauer ist durch Sekundärreaktionen, wie z.B. die Adsorption des Arsenazo-Reagens an die Koleoptilzellwand auf etwa 12 h beschränkt. Spätere Bestimmungen der Calciumionenkonzentration sind deswegen mit schwer bestimmbar Fehlern behaftet.

Das im Gegensatz zur IES-Zugabe langsame und deutlich schwächere Ansprechen der Calciumionen-Abgabe auf Wuchsstoffanaloga legt eine gewisse Spezifität der Calciumionen-Abgabe hinsichtlich der IES nahe.

Experimenteller Teil

Chemikalien. Indol-3-essigsäure (IES) wurde von der Firma E. Merck, Darmstadt, und Arsenazo III von K. Roth, Karlsruhe, bezogen.

Pflanzenmaterial: Maiskaryopsen (*Zea mays* L., Golden Bantam 8 row und Bear Hybrid WF 9 X 38, Vaughans' Seed Co.). Die Anzucht der Karyopsen erfolgte wie unter¹ bereits beschrieben.

Photometrische Bestimmung der Calciumionen-Konzentration: Je 20 Koleoptilzylinder (8 mm) wurden unter Lufteinleitung in 20 ml Kaliumphosphatpuffer ($3 \cdot 10^{-3}$ M, pH 6,6), welcher den Komplexbildner Arsenazo III ($2 \cdot 10^{-4}$ M) enthielt, gelegt und in Abständen von 15 bis 90 Min die Extinktionszunahme bei 612 nm mittels Beckman DB Spectrophotometer bestimmt.

Bei Sauerstoffeinleitung dürfen die Koleoptilzylinder nicht mit der Einleitungskapillare in Berührung kommen.

Herrn E. Thoma danke ich für geschickte Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

¹ B. Janistyn, Z. Naturforsch. **27 b**, 273 [1972].

² G. A. Robinson, R. W. Butcher, and E. W. Sutherland, Annu. Rev. Biochem. **37**, 149 [1968].

³ P. Greengard and E. Costa, Role of Cyclic AMP in Cell Function. Raven Press, New York 1970.

⁴ H. Rasmussen, Science [Washington] **170**, 404 [1970].

⁵ R. V. Farese, Science [Washington] **173**, 447 [1971].

⁶ E. Burling and T. W. Jackson, Plant Physiol. **40**, 138 [1965].

⁷ V. Michaylova and P. Ilkova, Anal. Chim. Acta **53**, 194 [1971].

⁸ R. Pohl, Physiol. Plantarum **10**, 681 [1956].

⁹ S. Azhar and C. R. Krishna Murti, Biochem. biophysic. Res. Commun. **43**, 58 [1971].

¹⁰ D. Salomon and P. J. Mascarenas, Life Sciences **10**, 879 [1971].

¹¹ B. Janistyn, Z. Naturforsch. **27 b**, 872 [1972].

¹² E. A. Martell and G. Schwarzenbach, Helv. chim. Acta **39**, 653 [1956].