

F. ZUSAMMENFASSUNG

Dem Stickstoffmonoxid, NO, gilt seit einigen Jahren großes wissenschaftliches Interesse. Die wichtigsten Reaktionen von NO sind aus biologischer Sicht die mit Sauerstoff in dessen verschiedenen Redoxformen in Gasphase und in wässriger Lösung. Aus der Reaktion NO-enhaltender Verbindungen mit Metallen, Thiolen und anderen Molekülen entstehen, abhängig von der chemischen Umgebung, Stoffe mit biologischer Aktivität und Relevanz. Physiologische, bisher primär für Wirbeltiere beschriebene Bedeutung hat NO im vaskulären und pulmonalen System, vor allem bei der Regulation von Blutfluß und -druck. Im Nervensystem der Invertebraten und Vertebraten existiert ein NO-cGMP-Stoffwechselweg. Bei der Immunabwehr spielt die auf Hervorrufen eines intrazellulären Eisenverlustes und Reaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies basierende Zytotoxizität von NO eine Rolle.

In biologischen Systemen wird NO von Stickstoffmonoxid-Synthase, NOS, gebildet. NOS-Isoenzyme synthetisieren via zwei Mono-Oxygenations-Schritte NO und Citrullin aus L-Arginin. Eine fehlerhafte NO-Produktion kann pathologische Konsequenzen haben.

Neuere Arbeiten zeigen, daß NO und NOS nicht nur in Wirbeltieren, sondern in allen untersuchten Tieren und im übrigen Reich der Lebewesen vorkommen. Die Wirkungen von NO ähneln den physiologischen Wirkungen von NO in Säugetieren. Darüber hinaus dient es beispielsweise Einzellern als Überlebenshilfe in oxidativer Umgebung, erhöht in Pflanzen die Synthese bestimmter Stoffe und beeinflusst Wachstumsformen diverser Pilze. Die NOS-Isoenzyme weisen Sequenzhomologien mit den Säugetierenzymen auf.

In dieser Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, daß die Hefe *Candida tropicalis* über eine NOS-Aktivität verfügt. Der Nachweis der NOS erfolgte immunologisch mittels SDS-PAGE und anschließender Western-Blot-Analyse mit Hilfe spezifischer Antikörper. Darüberhinaus bestätigten die Ergebnisse diverser Aktivitätsteste das Vorhandensein einer NOS-Aktivität enzymologisch. Wachstumsversuche machten deutlich, daß NO die Morphologie der Hefe beeinflusst. NO reguliert bei der einzellig bzw. als Mycel wachsenden Hefe die Wachstumsphysiologie. Neben *Dyctiostelium discoideum* und *Neurospora crassa* ist *Candida tropicalis* ein weiterer Organismus, an dem sich derartige Regulationen im Labormaßstab gut untersuchen lassen. Eine vergleichende Analyse der Regulationseffekte von NO in Zellsystemen unterschiedlicher Phyla gäbe eventuell Aufschluß über Ätiologie und Pathogenese

diverser Erkrankungen. Wirkungen von Theophyllin und Koffein ließen sich im Rahmen dieser Arbeit leider nicht quantifizieren, aber es ist anzunehmen, daß NO auch in *Candida tropicalis* in eine Reaktionskaskade mit Beteiligung des Kalzium/Kalmodulin-Systems und von cGMP eingebunden ist.

Vielleicht ist es mit Hilfe dieser und weiterer Erkenntnisse möglich, das Erscheinen von Pilzen an bestimmten Lokalisationen zu verstehen und Therapien gegen *Candida*-Infektionen zu entwickeln, die die NO-Wirkungen der Hefe manipulieren, bzw. in deren NO-Syntheseprozess eingreifen, und die Vermehrung bzw. das Wachstum des Pilzes beeinträchtigen.

SUMMARY

Wilken, M. (1999):

Nitric oxide in biological systems - immunobiological and enzymological investigations of a nitric oxide synthase activity in *Candida tropicalis*

From biological view the most important reactions of NO are those with oxygen in its different redoxforms in the gas phase and in the liquid phase. Depending on the chemical environment, NO-containing compounds specifically react with metals, thiols and other molecules to form substances with biological activity and relevance. NO plays a physiological role, so far primary described for vertebrates, in the vascular and pulmonary system, particularly in regulation of blood flow and blood pressure. A NO-cGMP-pathway exists in the nervous system of invertebrates and vertebrates. In the immunological defence NO shows cytotoxicity, which is based on a intracellular loss of iron and a reaction of reactive oxygen species.

In biological systems, NO is formed by nitric oxide-synthase, NOS. NOS-isoenzymes synthesise NO and citrulline from L-arginine via two mono-oxygenation-steps. A defective NO-production could lead to pathological consequences.

Recent studies have shown that NO and NOS are not only present in vertebrates but also in all explored animals and, probably, in the whole kingdom of life as well. The mechanisms of NO mediated regulation resemble the physiological mechanisms of NO in mammals. Furthermore, for example it helps unicellular organisms to survive in an oxidative environment, it increases the synthesis of certain biomolecules in plants and influences the growth of different fungi. The NOS-isoenzymes show homologies in sequence as compared to the enzymes of mammals.

For the first time, the present study demonstrates the presence of NOS-activity in the yeast *Candida tropicalis*. The demonstration from NOS was done immunobiological through SDS-PAGE and subsequent Western-blotting-analysis with help from specific antibodys. Furthermore, the results from different activity-tests confirmed enzymological the existence of NOS-activity. Growth experiments showed the influence from NO on the morphology of the yeast. NO regulates the physiology of growth of this yeast, which growth as single cell form and mycel form, respectively. Beside *Dyctiostelium discoideum* and *Neurospora crassa*, *Candida tropicalis* is another organism, where these regulations can be well examined in a laboratory. An analysis that compares the mechanisms of regulation of NO in cell systems of different

phyla could give information of the aetiology and pathogenesis of different diseases. The effects of theophylline and coffee are difficult to be measured in these studies, but one could assume that in *Candida tropicalis* NO also cooperates in a cascade of reaction with participation of the calcium/calmodulin-system and of cGMP.

Further studies based on these results may help to understand the occurrence of fungi in different localizations and to develop therapies against *Candida*-infections. Such therapies may be based on the manipulation of NO mediated differentiation or the inhibition of NO-synthesis. This way proliferation or growth of the fungi may be interfered.