

6.0 ZUSAMMENFASSUNG

Die Flavin-Monooxygenasen (FMO) sind mikrosomale Enzyme. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 54 und 59 kDa (ZIEGLER, 1988), und sie enthalten ca. 530 Aminosäuren (LAWTON *et al.*, 1994). Sie weisen einen Polymorphismus mit großer Gewebe- und Speziespezifität auf.

Die FMOs oxidieren diverse Xenobiotika mit einem schwach nukleophilen Heteroatom, wie Stickstoff, Schwefel, Phosphor und Selen (ZIEGLER, 1988 und 1990).

Die Flavin-Monooxygenasen werden in fünf Subfamilien (oder Isoformen) eingeteilt, FMO 1 - FMO 5 (LAWTON *et al.*, 1994). Man weiß, daß FMOs in der Schafleber vorkommen (GALTIER *et al.*, 1986, WILLIAMS *et al.*, 1989), doch es ist nicht bekannt, welche Isoformen vorliegen und welche die Hauptform ist.

Deshalb war es Ziel dieser Studie, Flavin-Monooxygenasen aus der Leber vom Schaf zu isolieren und zu identifizieren. Zu diesem Zweck sollte eine valide Versuchsanordnung erstellt werden.

Es wurden zunächst Mikrosomen aus Schafleber isoliert. Aus diesen konnte durch Kopplung unterschiedlicher Chromatographieverfahren eine FMO Form angereichert werden, deren Reinheit und Identifikation untersucht wurden.

Nach Abschluß dieser Untersuchungen gelang es dem Labor des Service de Biochimie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, eine zweite, unterschiedliche FMO Form (FMO 1) aus der Schafleber zu isolieren (LATTARD, 1997).

Es wurden im Einzelnen folgende Befunde erhoben:

1. Durch konsekutive Kopplung von DE 52-, Hydroxyapatit-, 2' 5' ADP und Hydroxyapatitsäulenchromatographien gelang es, FMO 3 elektrophoretisch einhandrein aus Schafleber zu isolieren (Anreicherungsfaktor: 142,7, spezifische Aktivität: 496,46 μmol Methimazoloxid/mg Protein)
2. Nach Bestimmung des Molekulargewichtes (57500 Da) und der Ermittlung der Substratspezifität der isolierten Form sowie Feststellung der Aminosäuresequenz in entscheidenden Bereichen konnte die isolierte Proteinfraktion als FMO 3 charakterisiert werden.

3. Eine schon bei den ersten Isolierungsstudien vermutete Heterogenität der FMOs in der Schafleber konnte durch Elektrofokussierung der Eluate bestätigt werden. Mittels anderer Zusammenstellung der Chromatographien (Verwendung einer Blue-Sepharose-CL-6B-Säule) konnte letztlich FMO I als zweite weniger bedeutende FMO-Fraktion in der Schafleber dargestellt werden (4,5 nmolMethimazoloxid/mg Protein).

7.0 SUMMARY

Christina Lillaz: Flavin-containing monooxygenases in the liver of sheep: isolation, identification and production of antibodies. Investigation of an appropriate technique.

Flavin-containing monooxygenases (FMO) are microsomal enzymes. Their molecular weights are inbetween 54 and 59 kDa (ZIEGLER, 1988) and they incorporate about 530 amino acids (LAWTON *et al.*, 1994). The enzymes show polymorphism with marked tissue and species specificity.

FMOs oxygenate different xenobiotics containing a weak nucleophile heteroatom e.g. nitrogen, sulfur, phosphorous and selen (ZIEGLER, 1988 and 1990).

There are five subfamilies of the FMOs (isoforms): FMO 1 - FMO 5 (LAWTON *et al.*, 1994). It is known that FMOs occur in sheep liver (GALTIER *et al.*, 1986, WILLIAMS *et al.*, 1989) but nothing is known about eventually isoforms and which is the mainform of the enzyme.

Therefore it was the main objective of the present study to isolate FMOs from sheep liver with consecutive identification of the isolate.

To begin with microsomes of sheep liver were isolated. By coupling of different chromatographic methods a FMO-form was enriched and purity and identity of which was subsequently tested.

After finishing this study another laboratory (Service de Biochimie de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon) was able to isolate a second FMO-form (FMO 1) from sheep liver (LATTARD, 1997).

In detail the following results were worked out:

1. By using a consecutive coupling of DE 52 , hydroxyapatit , 2' 5' ADP- and hydroxyapatit-columnchromatographies FMO 3 could be isolated from sheep liver and the isolate electrophoretically showed one band (enrichement factor: 142,7, specific activity: 496,46 μmol methimazoleoxide/ mg protein).

2. The isolated FMO-form was identified as FMO 3 by determination of the molecular weight (57500 Da), by testing the substrate specificity and by measuring amino acid sequences in decisive places.
3. A second form of FMO in sheep liver has been suspected while studying the FMO 3. It was confirmed by isoelectric focusing the eluates. By differing arrangements in the chromatographic methods used and adding a Blue-Sepharose-CL-6B-column FMO 1 could be isolated. It was characterized as the minor FMO-form in sheep liver (specific activity: 4,5 nmol methimazoleoxide/mg protein).