

Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
(Direktor: Prof. Dr. Klaus Eder)
des
Fachbereichs 09 Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
der
Justus-Liebig-Universität Gießen
(Dekan: Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer)

**Einsatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten und
Präbiotika im Futter von Jungebern zur Verminderung von
Ebergeruch**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Ökotrophologie (Dr. oec. troph.)

vorgelegt von
M. Sc. oec. troph. Lisa-Marie Schütz
geboren am 27.02.1986 in Herborn

Gießen 2014

1. Gutachter: **Prof. Dr. Klaus Eder**

Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Interdisziplinäres Forschungszentrum
Heinrich-Buff-Ring 26-32
35392 Gießen

2. Gutachter: **Prof. Dr. Uwe Wenzel**

Institut für Ernährungswissenschaft
Justus-Liebig-Universität Gießen
Interdisziplinäres Forschungszentrum
Heinrich-Buff-Ring 26-32
35392 Gießen

Die vorliegende Arbeit wurde gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen der Richtlinie über die Förderung von Innovationen zur Verbesserung der Fleischqualität (Förderkennzeichen: 2816802211).

I TABELLENVERZEICHNIS	V
II ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 TRANSKRIPTIONSFAKTOR NUCLEAR FACTOR ERYTHROID-2-RELATED FACTOR 2 (NRF2)	3
2.2 BEDEUTUNG VON POLYPHENOLEN IM NRF2-SIGNALWEG	6
2.2.1 Polyphenole in Trauben	7
2.2.2 Polyphenole in Hopfen	8
2.2.3 Polyphenole in grünem Tee	10
2.3 EBERGERUCH	11
2.3.1 Androstenon	12
2.3.2 Skatol	14
2.4 MÖGLICHKEITEN ZUR VERMEIDUNG VON EBERGERUCH	16
2.4.1 Immunokastration	17
2.4.2 Fütterung in der Jungebermast	18
3 ZIELSTELLUNG DIESER ARBEIT	21
4 MATERIAL UND METHODEN	23
4.1 MATERIALIEN	23
4.2 GERÄTE	25
4.3 VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN	26
4.3.1 Puffer für RNA- und DNA-Gelelektrophorese	26
4.3.2 Puffer und Lösungen für den elektrophoretischen Mobilitäts Shift Assay	27
4.3.3 Puffer für proteinanalytische Methoden	29
4.4 TIERE UND HALTUNG	31
4.5 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	31
4.5.1 Design 1. Versuch	31

4.5.2 Design 2. Versuch	32
4.5.3 Versuchsfutter	32
4.6 METHODEN	35
4.6.1 RNA-Isolierung und -Konzentrationsbestimmung	35
4.6.2 RNA-Gelelektrophorese	36
4.6.3 cDNA-Synthese	36
4.6.4 Quantitative Real-Time-PCR	37
4.6.5 DNA-Gelelektrophorese	44
4.6.6 Nuklearextraktion	44
4.6.7 Proteinbestimmung mit dem BC Assay Protein Quantitation Kit	45
4.6.8 Elektrophoretischer Mobilitäts Shift Assay	45
4.6.8.1 Hybridisierung der Oligonukleotide	46
4.6.8.2 Markierung der Oligonukleotide mit Digoxigenein-11-ddUTP	47
4.6.8.3 Gelelektrophorese und Blotting	48
4.6.8.4 Detektion mittels Chemilumineszenz	48
4.6.9 Präparierung der verschiedenen Zellfraktionen	49
4.6.9.1 Mikrosomenfraktion	49
4.6.9.2 Zytosolische Fraktion	49
4.6.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
4.6.11 Western Blot	50
4.6.12 Enzymaktivitätsmessungen mittels HPLC	52
4.6.12.1 CYP2E1-Assay	52
4.6.12.2 SULT1A1-Assay	55
4.6.12.3 SULT2A1-Assay	59
4.6.13 pH-Messung im Kot	62
4.6.14 Bestimmung der Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren im Kot mittels Kapillar-Gaschromatographie	62
4.6.15 Enzymimmunologische Bestimmung von Androstenon im Fettgewebe	66
4.6.16 Bestimmung der Indol- und Skatolkonzentration im Fettgewebe mittels UPLC	66
4.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG	68
<u>5 ERGEBNISSE</u>	<u>69</u>
5.1 EBERMASTVERSUCH 1	69

5.1.1	Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf Leistungs- und Schlachtparameter von Ebern	69
5.1.2	Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Genexpression von Nrf2-Zielgenen in der Leber von Ebern	72
5.1.2.1	Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration von ausgewählten Nrf2-Zielgenen in der Leber	72
5.1.2.2	Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration von Nrf2-Zielgenen des Cytochrom P450 Enzymsystems in der Leber	73
5.1.2.3	Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration von Nrf2-Zielgenen des Sulfotransferasen-Systems in der Leber	74
5.1.3	Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Nrf2-Bindungsaktivität im Leberkernextrakt von Ebern	75
5.1.4	Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die relative Proteinkonzentration von Enzymen des hepatischen Fremdstoffmetabolismus in Ebern	76
5.1.5	Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Aktivitäten von Enzymen des hepatischen Fremdstoffmetabolismus in Ebern	78
5.1.6	Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Androstenon-, Indol- und Skatolkonzentration im Rückenspeck von Ebern	79
5.3	EBERMASTVERSUCH 2	81
5.3.1	Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf Leistungs- und Schlachtparameter von Ebern	81
5.3.2	Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf den pH-Wert und die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren im Kot von Ebern	83
5.3.3	Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf die Indol- und Skatolkonzentration im Rückenspeck von Ebern	85
6	DISKUSSION	87
6.1	BEDEUTUNG VON POLYPHENOLHALTIGEN PFLANZENEXTRAKTEN FÜR DIE JUNGEBERMAST IM BEZUG AUF EBERGERUCH	87
6.1.1	Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf die Mastleistung	88
6.1.2	Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf den Nrf2-Signalweg in der Leber	90
6.1.3	Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf den Androstenon- und Skatolmetabolismus in der Leber	93

6.2 BEDEUTUNG VON PRÄBIOTIKA FÜR DIE JUNGEBERMAST IM BEZUG AUF EBERGERUCH	100
6.2.1 Einfluss von Präbiotika auf die Mastleistung	100
6.2.2 Einfluss von Präbiotika auf die Darmflora und die Skatolproduktion	102
6.3 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	105
<u>7 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>108</u>
<u>8 SUMMARY</u>	<u>110</u>
<u>9 LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>112</u>

I Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1: Zusammensetzung der Grundmischung für beide Versuche (nach Empfehlungen der GfE, 2006) (Gewichts %)	33
Tab. 4.2: Charakterisierung der verwendeten polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte und Präbiotika	34
Tab. 4.3: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mastermix je Reaktionsansatz	37
Tab. 4.4: Zusammensetzung des qPCR-Mix je Reaktionsansatz	38
Tab. 4.5: Eigenschaften der verwendeten Primer	39
Tab. 4.6: Durchschnittliche Expressionsstabilität der drei stabilsten Referenzgene	42
Tab. 4.7: Effizienz der verwendeten Primer	43
Tab. 4.8: Eigenschaften der verwendeten Oligonukleotide für den EMSA	47
Tab. 4.9: Eigenschaften der verwendeten Antikörper für den Western Blot	51
Tab. 4.10: Verwendete Geräte der HPLC-Anlage für den CYP2E1-Assay	53
Tab. 4.11: Qualitätsüberprüfung des CYP2E1-Assay - Dreifacher Ansatz aus einer Leberprobe	55
Tab. 4.12: Verwendete Geräte der HPLC-Anlage für den SULT1A1-Assay	57
Tab. 4.13: Qualitätsüberprüfung des SULT1A1-Assay - Dreifacher Ansatz aus einer Leberprobe	59
Tab. 4.14: Verwendete Geräte der HPLC-Anlage für den SULT2A1-Assay	60
Tab. 4.15: Qualitätsüberprüfung des SULT2A1-Assay - Dreifacher Ansatz aus einer Leberprobe	62
Tab. 4.16: Verwendete Geräte des Gaschromatographen für die Bestimmung der Konzentration von flüchtigen Fettsäuren im Kot von Ebern	63
Tab. 4.17: Eigenschaften der verwendeten Fettsäuren	64
Tab. 4.18: Verwendete Geräte der UPLC-Anlage für die Bestimmung der Indol- und Skatolkonzentration im Fettgewebe	68
Tab. 5.1: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf Leistungsparameter von Ebern in der Mittel- und Endmast	71
Tab. 5.2: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf Schlachtparameter von Ebern	72

Tab. 5.3: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die relative mRNA-Konzentration von ausgewählten Nrf2-Zielgenen in der Leber von Ebern	73
Tab. 5.4: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die relative mRNA-Konzentration von Nrf2-Zielgenen des Cytochrom P450 Enzymsystems in der Leber von Ebern	74
Tab. 5.5 Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die relative mRNA-Konzentration von Nrf2-Zielgenen des Sulfotransferasen-Systems in der Leber von Ebern	75
Tab. 5.6: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Aktivität von Enzymen des hepatischen Fremdstoffmetabolismus von Ebern	79
Tab. 5.7: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Androstenon-, Indol- und Skatolkonzentration im Rückenspeck von Ebern	80
Tab. 5.8: Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf Leistungsparameter von Ebern	82
Tab. 5.9: Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf Schlachtparameter von Ebern	83
Tab. 5.10: Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf den pH-Wert im Kot von Ebern im Verlauf über den Versuchszeitraum	84
Tab. 5.11: Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf die flüchtigen Fettsäuren und den pH-Wert im Kot von Ebern	85
Tab. 5.12: Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf die Indol- und Skatolkonzentration im Rückenspeck von Ebern	86

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Nrf2- und Keap1-Protein Domänen	4
Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Nrf2-Signalweges	6
Abb. 2.3: Chemische Strukturformel der Hauptgruppen der Polyphenole	7
Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Androstenonmetabolismus	13
Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Skatolmetabolismus	15
Abb. 4.1: Prinzip der CYP2E1-Reaktion	52
Abb. 4.2: Beispielhaftes Chromatogramm der HPLC-Analyse zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität in der mikrosomalen Leberfraktion von Ebern	54
Abb. 4.3: Prinzip der Sulfotransferasen-Reaktion	55
Abb. 4.4: Beispielhaftes Chromatogramm der HPLC-Analyse zur Bestimmung der SULT1A1-Aktivität im Leberzytosol von Ebern	58
Abb. 4.5: Beispielhaftes Chromatogramm der HPLC-Analyse zur Bestimmung der SULT2A1-Aktivität im Leberzytosol von Ebern	61
Abb. 4.6: Beispielhaftes Chromatogramm der GC-Analyse zur Bestimmung der Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren im Kot von Ebern	65
Abb. 5.1: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf die Nrf2-Bindungsaktivität im Leberkernextrakt von Ebern	76
Abb. 5.2: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf die relative Proteinkonzentration des CYP2E1 in der Lebermikrosomenfraktion von Ebern	77
Abb. 5.3: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf die relative Proteinkonzentration der SULT2A1 im Leberzytosol von Ebern	78

III Abkürzungsverzeichnis

ACTB	β -Actin
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	<i>antioxidative responsive element</i>
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>
BCA	Bicinchoninic Acid
bp	Basenpaare
BSA	Fetales Kälberserum
BTB	<i>Broad complex, Tramtrack and Bric a bric</i>
CAR	<i>constitutive androstane receptor</i>
c-JUN	<i>jun proto-oncogene</i>
COUP-TF1	<i>Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factor 1</i>
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy-1,2-dioxetane-3-yl)phenyl phosphat
C _t	<i>cycle threshold</i>
CTR	Carboxyterminale Region
CYP	Cytochrom P450
DBV	Deutscher Bauernverband
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGR	<i>double glycine repeat</i>
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitäts Shift Assay
FXR	<i>farneosid X receptor</i>
GPX1	Glutathionperoxidase
GST	Glutathion-S-Transferase

h	Stunde(n)
HDE	Hauptverband des Deutschen Einzelhandels
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HO1	Hämoxygenase
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
IL1B	Interleukin 1 β
IL8	Interleukin 8
IVR	<i>intervening region</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
mRNA	messenger RNA
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Neh	<i>Nrf2-ECH homology domains</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
NQO1	NADPH-Dehydrogenase
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid-2-related factor 2</i>
NTC	<i>none template control</i>
NTR	N-terminale Region
NWG	Nachweisgrenze
PAP	Adenosin 3'-Phosphat 5'-Phosphat
PAPS	Adenosin 3'-Phosphat 5'-Phosphosulfat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PRDX6	Peroxiredoxin
PXR	<i>pregnane X receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SCFA	<i>short chain fatty acid</i> ; kurzkettige Fettsäure
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
sMaf	<i>small Maf protein</i>

SOD	Superoxiddismutase
SULT	Sulfotransferase
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBST	<i>Tris Buffered Saline Tween</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXNR1	Thioredoxinreduktase
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
VDF	Verband der Fleischwirtschaft e.V.
VK	Variationskoeffizient

1 Einleitung

In den meisten EU-Ländern, darunter auch Deutschland, werden Ferkel innerhalb der ersten sieben Lebenstage ohne Betäubung und postoperativer Schmerzbehandlung chirurgisch kastriert. Bisher war eine Betäubung für das Kastrieren von unter acht Tage alten Ferkeln in Deutschland nicht erforderlich. Die betäubungslose Kastration stellt allerdings, entgegen vorherigen Annahmen, eine enorme Belastung für das Tier dar und ist auch noch Stunden nach der Kastration mit Schmerzen verbunden (Hay *et al.* 2003). Der Deutsche Bauernverband (DBV), der Verband der Fleischwirtschaft e.V. (VDF) und der Hauptverband des Deutschen Einzelhandels (HDE) haben sich 2008 in Düsseldorf zur „gemeinsamen Erklärung zur Ferkelkastration“ zusammen getan (Düsseldorfer Erklärung 2008) um ein alternatives Verfahren zur Ferkelkastration zu entwickeln, so dass in Zukunft gänzlich auf das Kastrieren von männlichen Ferkeln verzichtet werden kann. Auch auf EU-Ebene wird dieses Ziel verfolgt und in der „Europäischen Erklärung über Alternativen zur chirurgischen Kastration bei Schweinen“ Stellung dazu genommen (Europäische Kommission 2010). Das langfristige Ziel besteht darin, die betäubungslose Kastration von männlichen Schweinen europaweit bis zum 1. Januar 2019 abzuschaffen. Bis dieses Gesetz in Kraft tritt, soll intensiv nach Alternativen für das betäubungslose Kastrieren gesucht werden. Neben einer Betäubung mittels Narkose, der nachfolgenden Schmerzstillung oder der Immunokastration stellt die Jungebermast eine interessante Alternative für die Schweinefleischproduktion dar. Das größte Problem der Ebermast besteht jedoch im Ebergeruch, der hauptsächlich durch die beiden Stoffe Androstenon und Skatol hervorgerufen wird (Patterson 1968; Jensen *et al.* 1995). Dieser Geruch, der von nicht kastrierten Schweinen während der Pubertät entwickelt wird, wird von vielen Menschen bei der Zubereitung von Eberfleisch als äußerst unangenehm empfunden. Daher ist eine Vermarktung von Eberfleisch aufgrund der geringen Akzeptanz der Verbraucher in Deutschland derzeit schwierig. Um auf die chirurgische Kastration verzichten zu können, müssen Methoden zur Feststellung und Messung von Ebergeruch, zur Schnellerkennung von Ebergeruch in Schlachtbetrieben und Strategien für die Verminderung des Ebergeruchs durch Züchtung, Haltung und Fütterung entwickelt werden (Europäische Kommission 2010). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Möglichkeiten der Fütterung in der Ebermast. Durch den Einsatz von bestimmten polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten und präbiotischen Zusatzstoffen im Futter von Jungebern soll das Ziel verfolgt werden, den unerwünschten Ebergeruch zu reduzieren. Über Polyphenole ist bekannt, dass sie den Transkriptionsfaktor *nuclear*

factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) aktivieren, der für die Transkriptionskontrolle von vielen zytoprotektiven Genen zuständig ist (Chen *et al.* 2000; Shen *et al.* 2005; Soyalan *et al.* 2011; Han *et al.* 2012). Darunter werden auch Gene reguliert, die am Androstenon- und Skatolabbau in der Leber beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese überprüft werden, dass polyphenolhaltige Pflanzenextrakte im Futter von Jungbern über den Nrf2-Signalweg den Androstenon- und Skatolabbau beschleunigen und damit zu einer verminderten Einlagerung von Androstenon und Skatol im Fettgewebe führen. Skatol wird im Darm durch Bakterien aus der Aminosäure Tryptophan, das von abgeschilferten Darmepithelzellen stammt, synthetisiert (Jensen *et al.* 1995). In der Literatur wird beschrieben, dass der Einsatz von präbiotisch wirksamen Pflanzenbestandteilen im Futter von Ebern zu einer Skatolreduktion im Fettgewebe führt, da Präbiotika von den Bakterien als alternative Energiequelle genutzt werden können und dadurch mehr Tryptophan zur mikrobiellen Proteinsynthese herangezogen wird. So wird weniger Tryptophan in Skatol umgewandelt (Claus *et al.* 1994; Claus *et al.* 2003; Hansen *et al.* 2006; Zamaratskaia *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Vhile *et al.* 2012). In der vorliegenden Arbeit soll dies mit dem Einsatz von kommerziell erhältlichen präbiotischen Zusatzstoffen, die in geringeren Dosierungen als pflanzliche Präbiotika eingesetzt werden können, untersucht werden. In einer Literaturübersicht sollen zunächst der Transkriptionsfaktor Nrf2 und die Bedeutung von Polyphenolen im Nrf2-Signalweg, sowie der Ebergeruch und Möglichkeiten zur Vermeidung von Ebergeruch dargestellt werden. Nach Erläuterung der Zielsetzung werden die durchgeführten Versuche und die Ergebnisse beschrieben und am Schluss kritisch anhand der aktuellen Literatur diskutiert.

2 Literaturübersicht

2.1 Transkriptionsfaktor nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2)

Der redoxensitive *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (Nrf2) ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler fremdstoffmetabolisierender, zytoprotektiver und antioxidativer Gene reguliert. Er gehört zur Familie der *cap'n'collar basic leucin zipper* Transkriptionsfaktoren und wurde erstmals von Moi *et al.* (1994) beschrieben.

Nrf2 besteht aus sechs *Nrf2-ECH* *homology domains* (Neh), wobei Neh1 das Leucin-Zipper-Motiv beinhaltet, welches für die Bindung an die DNA benötigt wird (Abb. 2.1). Die Neh2 Domäne ist am N-Terminus lokalisiert und besteht aus zwei Subdomänen, dem DIDLID-Element und dem ETGE-Motiv (McMahon *et al.* 2004). Die Neh4- und Neh5 Domänen sind zuständig für die Transaktivierung (Das *et al.* 2013). Am C-Terminus befindet sich die Neh3 Domäne, welche eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Transkription spielt. Die Deletion der letzten 16 Aminosäuren des Nrf2 Proteins führt zu einem transkriptionell inaktivem Protein (Nioi *et al.* 2005). Zwischen der Neh4 und der Neh5 Domäne liegt die Neh6 Domäne, die für den Abbau des Nrf2 Proteins zuständig ist. In Situation von oxidativem Stress trägt diese Domäne hauptsächlich zum Nrf2 Turnover bei (McMahon *et al.* 2004).

Die Nrf2-Aktivität wird posttranslational reguliert. Unter basalen Bedingungen liegt Nrf2 im Zytosol gebunden an das inhibitorische Protein *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) vor und ist damit inaktiv (Itoh *et al.* 1999). Keap1 ist ein zytosolisches, cysteinreiches Protein, das im Aktin-Zytoskelett verankert und aus fünf verschiedenen Domänen aufgebaut ist (Wakabayashi *et al.* 2004; Das *et al.* 2013; Abb. 2.1). Es bindet sequenz-spezifisch an die aminoterminalen Neh2 Domäne von Nrf2 und bewirkt dadurch, dass der Nrf2/Keap1-Komplex im Zytosol zurück gehalten wird (Itoh *et al.* 1999). Außerdem hat Keap1 einen Einfluss auf den Abbau von Nrf2. Aus Studien ist bekannt, dass Keap1 mittels der BTB- (*Broad complex, Tramtrack and Bric a bric*) und der IVR- (*intervening region*) Domäne einen Cullin Ligasekomplex (Cul3) binden kann, was zu einer Polyubiquitinierung von Nrf2 führt, welches dann durch das Proteasom abgebaut wird (Zhang und Hannink 2003; Kobayashi *et al.* 2004; McMahon *et al.*

2004). Li *et al.* (2012) konnten zudem nachweisen, dass die Nrf2-Ubiquitinierung nicht nur im Zytosol, sondern auch im Nukleus stattfindet.

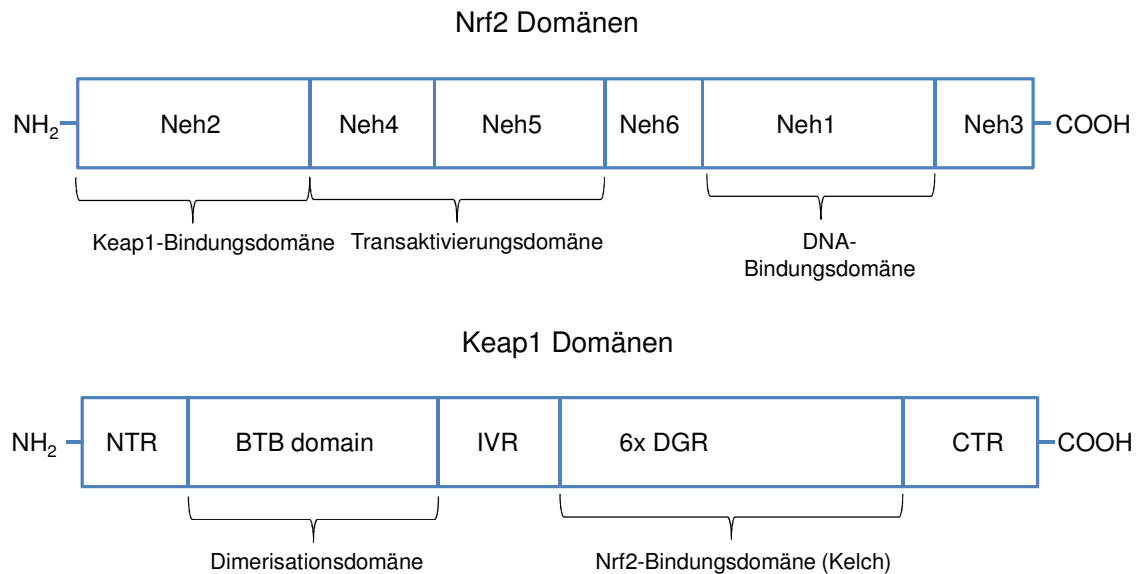


Abb. 2.1: Nrf2- und Keap1-Protein Domänen

Neh = *Nrf2-ECH* homology domain; NTR = N-terminale Region; BTB = *Broad complex, Tramtrack and Bric a bric*; IVR = *intervening region*; DGR = *double glycine repeat*; CTR = Carboxyterminale Region [Modifiziert nach Das *et al.* (2013)].

Durch reaktive Sauerstoffspezies, Elektrophile, Xenobiotika, Antioxidantien, Schwermetalle oder Phosphorylierungsreaktionen kann Nrf2 aktiviert werden (Tkachev *et al.* 2011). Die Phosphorylierung wird durch verschiedene Kinasen, wie z.B. der *mitogen-activated protein* Kinasen (MAPKs) (Yu *et al.* 2000; Shih und Yen 2007) oder der Phosphoinositid-3-kinase (PI3K) hervorgerufen (Lim *et al.* 2007). Neben der direkten Beeinflussung von Nrf2, können ebenso die Cysteinreste von Keap1 reduziert werden, was zu einer Konformationsänderung von Keap1 führt, wodurch Nrf2 frei wird und in den Nukleus translozieren kann. Die Cysteinreste von Keap1, die durch oxidativen Stress beeinflusst werden und zu der Freisetzung von Nrf2 führen, sind auch hauptsächlich für die Repression von Nrf2 verantwortlich (Wakabayashi *et al.* 2004). Dabei ist der Cysteinrest Cys151 in der BTB Domäne essentiell für die Nrf2-Aktivierung durch Elektrophile. Cys273 und Cys288 sind essentiell für die unter

basalen Bedingungen vorliegende Repression von Nrf2 durch Keap1 (Yamamoto *et al.* 2008).

Im Nukleus bindet Nrf2 an eine Konsensus-Sequenz in der Promotorregion der Zielgene. Dabei handelt es sich um ein sogenanntes *antioxidative responsive element* (ARE), wodurch die Transkription von Nrf2-Zielgenen aktiviert wird. Nrf2 bindet mit hoher Affinität als Heterodimer z.B. mit einem *small Maf Protein* (sMaf) (Itoh *et al.* 1997), einem *jun proto-oncogene* (c-JUN) (Venugopal und Jaiswal 1998) oder mit dem *activating transcription factor 4* (ATF4) (He *et al.* 2001) an die ARE-Sequenz. Indem sie die Aktivierung von Genen von Phase II Enzymen und antioxidativer Stressproteine stimulieren, scheinen Keap1 und Nrf2 einen zentralen, zellulären Sensor für oxidativen Stress darzustellen (Itoh *et al.* 1999). Typische Zielgene für Nrf2 sind z.B. die Glutathion-S-Transferase (GST), die Hämoxygenase (HO-1), die NADPH-Dehydrogenase (NQO1) und die UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) (Lee *et al.* 2005). Abbildung 2.2 zeigt schematisch den Nrf2-Signalweg.

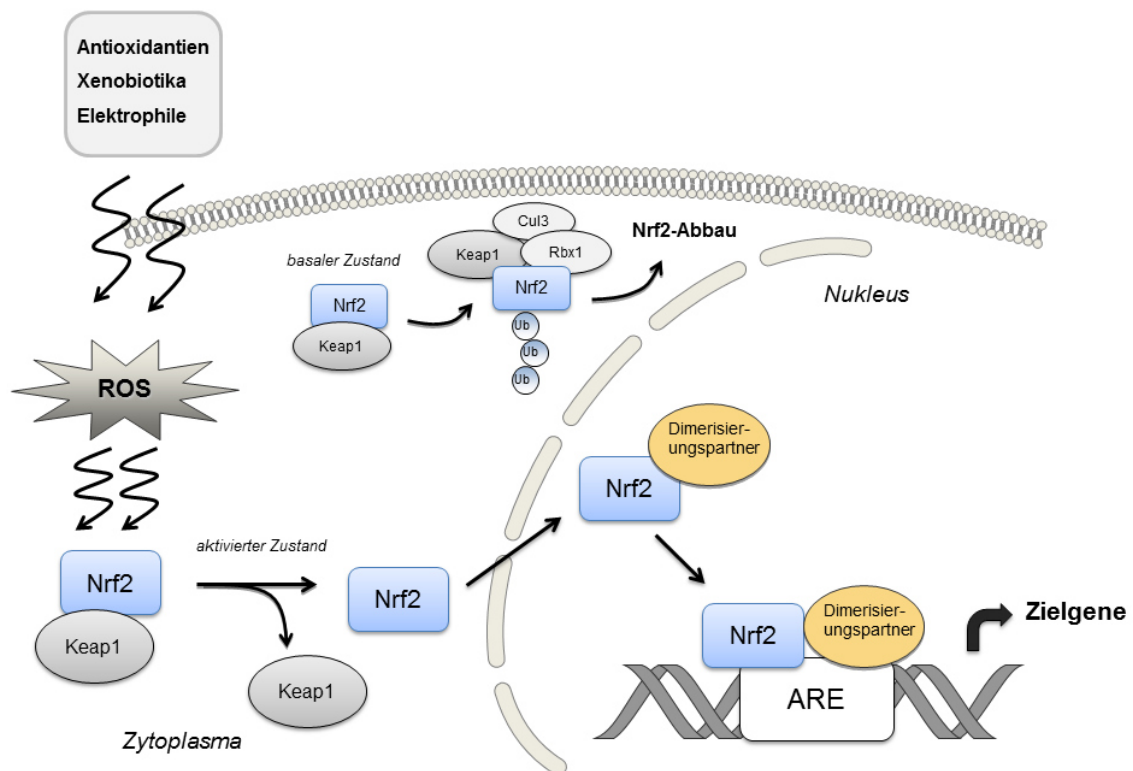


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Nrf2-Signalweges

ROS = Reaktive Sauerstoffspezies; Keap1 = *Kelch-like ECH-associated protein 1*; Nrf2 = *nuclear factor erythroid-2-related factor 2*; Cul3 = Cullin 3 Ligasekomplex; Rbx1 = *ring-box1*, E3 Ubiquitin Proteinligase; Ub = Ubiquitin; Dimerisierungspartner z.B.: *small Maf Protein*, *jun proto-oncogene* oder *activating transcription factor 4*;

Unter physiologischen Bedingungen wird Nrf2 über eine Ubiquitinierung durch das Proteasom abgebaut. Durch oxidativen Stress oder andere Aktivatoren löst sich der Nrf2/Keap1-Komplex und Nrf2 transloziert in den Nukleus, wo er als Heterodimer an die ARE-Sequenz seiner Zielgene bindet und deren Transkription aktiviert [Modifiziert nach Tkachev *et al.* (2011) und Li *et al.* (2012)].

2.2 Bedeutung von Polyphenolen im Nrf2-Signalweg

Polyphenole sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, denen eine antioxidative und antikanzerogene Wirkung zugesprochen wird. Sie kommen in vielen pflanzlichen Nahrungsbestandteilen vor. Alle Polyphenole besitzen einen aromatischen Ring mit einer oder mehreren Hydroxylgruppen, welche für die antioxidative Funktion verantwortlich sind. Anzahl und Position der Hydroxylgruppen können variieren, was die große Vielfalt der Polyphenole ausmacht. Zu den Hauptgruppen der Polyphenole gehören Flavonoide, Lignane, Phenolsäuren und Stilbenderivate (Tangney und

Rasmussen 2013). Abbildung 2.3 zeigt typische Vertreter der einzelnen Gruppen. Die Flavonoide machen die größte Gruppe aus und unterteilen sich, je nach Oxidationsgrad der sauerstoffhaltigen Ringe, in die Klassen der Flavanole, Flavanone, Flavonole, Flavone, Anthocyane und Isoflavone (Rahman *et al.* 2006).

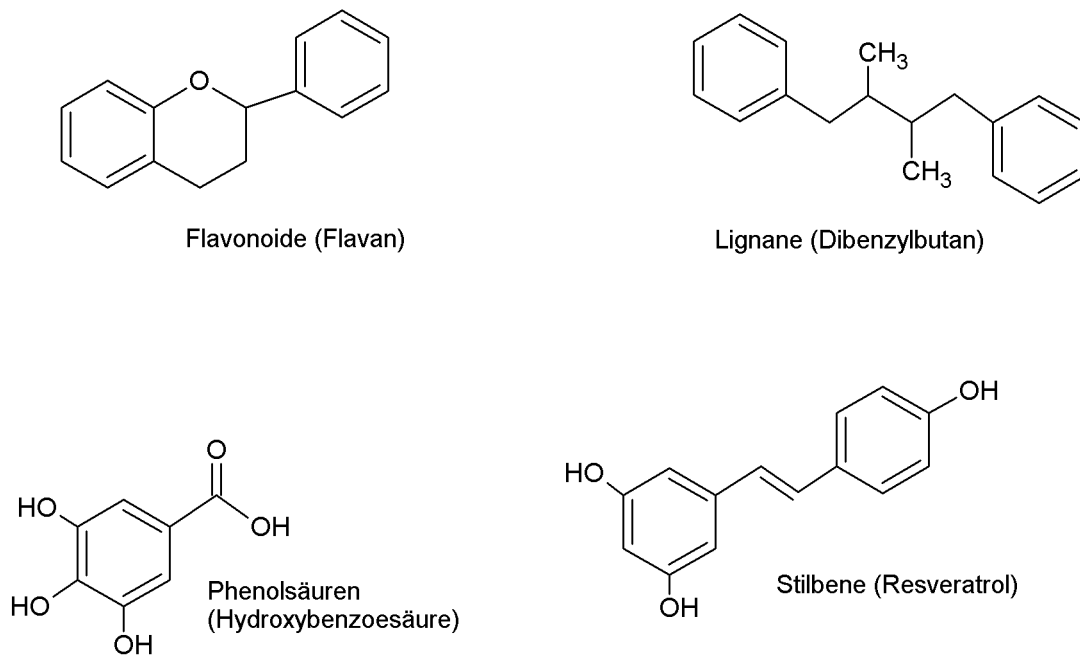


Abb. 2.3: Chemische Strukturformel der Hauptgruppen der Polyphenole

Dargestellt sind die vier Hauptgruppen mit jeweils einem typischen Vertreter

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit Extrakte aus Traubentrester, Hopfen und grünem Tee dem Futter der Jungeber zugesetzt wurden, soll im Folgenden kurz auf das Polyphenolvorkommen und deren Eigenschaften mit Hinblick auf den Nrf2-Signalweg eingegangen werden.

2.2.1 Polyphenole in Trauben

In Trauben- und Traubenprodukten, wie Saft und Wein, kommen hauptsächlich Phenolsäuren, deren Derivate und Flavonoide vor. So enthält Traubenkernöl beispielsweise reichlich Proanthocyanidine, Catechine, Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Epigallocatechin (EGC), Epicatechin-3-gallat (ECG), Epicatechin (EC) und

Gallensäuren, während Traubentrester Anthocyane und weniger Proanthocyanidine enthält (Auger *et al.* 2004). Den Polyphenolen aus Trauben wird eine hohe antioxidative Aktivität zugeschrieben. Neben dem Abfangen von freien Radikalen, der Inhibierung der Lipidoxidation und vielen weiteren antioxidativen Effekten (Xia *et al.* 2010) zeigen Traubenextrakte auch antiinflammatorische Effekte (Li *et al.* 2001; Terra *et al.* 2009; Gessner *et al.* 2012). Der Zusatz eines Extraktes aus Traubenkernen und Traubentrester führte bei Caco2-Zellen zu einer signifikant verbesserten Zelllebensfähigkeit und zu einer Reduktion einer durch TNF α induzierten NF- κ B-Transaktivierung. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der proinflammatorischen Genexpression beteiligt ist (Baeuerle und Henkel 1994). Eine Aktivitätsverminderung von NF- κ B wird daher positiv bewertet. Die relative mRNA-Konzentration von proinflammatorischen Genen wurde durch den Zusatz eines Extraktes aus Traubenkernöl und Traubentrester in den Caco2-Zellen signifikant reduziert (Gessner *et al.* 2012). *In vivo* konnte durch eine Proanthocyanidingabe, welches reichlich in Trauben vorkommt, zu einer *High fat diet* bei Ratten ein inflammatorischer Zustand verhindert werden (Terra *et al.* 2009). Diese Studien deuten darauf hin, dass der Zusatz eines Extraktes aus Trauben die Gesundheit des Organismus durch die Unterdrückung von Entzündungsreaktionen positiv beeinflussen kann. Proanthocyanidine können außerdem die Nrf2-Expression induzieren (Bak *et al.* 2012). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass durch ein Traubenkernextrakt in HepG2-Zellen die Transkriptionsaktivität, die durch eine ARE-Bindung initiiert wird, erhöht und dadurch die Expression von Phase II Enzymen aktiviert wird (Bak *et al.* 2012).

2.2.2 Polyphenole in Hopfen

Der Hopfen (*Humulus lupulus* L.) gehört zur Familie der Cannabaceae. Bei der Herstellung von Bier ist er für den charakteristisch bitteren Geschmack verantwortlich (Magalhaes *et al.* 2009). Dem Hopfen wird eine beruhigende Wirkung nachgesagt und er wird deshalb beliebt als mildes Sedativum eingesetzt (Zanoli und Zavatti 2008). Die Hopfenpolyphenole sind reich an Flavonoiden, Proanthocyanidinen und dem Chalkon Xanthohumol (Wang *et al.* 2014). Xanthohumol stellt die wichtigste Verbindung der in Hopfen vorkommenden Polyphenole dar. Dieses Prenylflavonoid wurde bisher

ausschließlich im Hopfen nachgewiesen (Magalhaes *et al.* 2009). Neben Polyphenolen ist Hopfen reich an Gerbstoffen und α - und β -Säuren, die den bitteren Geschmack im Bier ausmachen. Der Gehalt an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen im Hopfen variiert in Abhängigkeit von der Kultivierungsform, während die Wachstumsbedingungen keinen Einfluss auf den Polyphenolgehalt haben (Ceh *et al.* 2007).

Der gesundheitsförderliche Effekt von Hopfen lässt sich größtenteils durch Xanthohumol erklären (Dietz *et al.* 2013). Xanthohumol ist in der Lage in Krebszellen die Proliferation zu inhibieren und die Apoptose zu induzieren (Krajka-Kuzniak *et al.* 2013). In höheren Konzentrationen reduziert Xanthohumol die Lebensfähigkeit von Krebszellen, während gesunde Zellen gegen die zytotoxische Eigenschaft resistent sind. Diese Effekte werden mit hoher Wahrscheinlichkeit über den Nrf2-Signalweg vermittelt (Dietz *et al.* 2013; Krajka-Kuzniak *et al.* 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol die Translokation von Nrf2 vom Zytosol in den Nukleus in Leberzellen induziert und die Bindung an eine ARE-Sequenz stimuliert (Lee *et al.* 2011; Krajka-Kuzniak *et al.* 2013). Die Translokation wird durch eine Alkylierung der Cysteinreste von Keap1 durch Xanthohumol ausgelöst (Dietz *et al.* 2005). Bedeutsame Zielgene von Nrf2, wie die GST oder die NQO1, wurden durch eine Behandlung mit Xanthohumol in Leberzellen hochreguliert (Krajka-Kuzniak *et al.* 2013). In einem *in vivo* Versuch mit Ratten konnte diese Beobachtung bestätigt werden (Dietz *et al.* 2013). Diese Studie zeigt zudem, dass der durch Xanthohumol hervorgerufene Effekt durch eine Fütterung von Hopfenextrakt noch stärker ausfällt als die alleinige Zugabe von Xanthohumol. Somit scheinen weitere Inhaltsstoffe im Hopfen zusammen mit Xanthohumol über die Induzierung von Phase II Enzymen über den Nrf2-Signalweg potentiell chemopräventiv zu wirken (Dietz *et al.* 2013; Krajka-Kuzniak *et al.* 2013). Im Gehirn kann Xanthohumol vor inflammatorischen Schäden schützen (Lee *et al.* 2011). Auch dort wird der Effekt über den Nrf2-Signalweg vermittelt (Lee *et al.* 2011). Die systemische Bioverfügbarkeit von oral aufgenommenem Xanthohumol aus Hopfen ist sehr gering. Xanthohumol akkumuliert nach der Aufnahme in den Darmzellen und bindet dort an zytosolische Proteine (Pang *et al.* 2007). Der Teil, der in den Blutkreislauf gelangt, wird über die Leber metabolisiert. Auch im Gastrointestinaltrakt findet eine Metabolisierung statt (Ruefer *et al.* 2005). Über UGTs und Sulfotransferasen (SULTs), Enzyme des Phase II Metabolismus, wird Xanthohumol konjugiert. Dabei ist die Konjugation mit Glucuronsäure durch UGTs stärker ausgeprägt, als die Sulfatierung durch SULTs (Ruefer *et al.* 2005).

2.2.3 Polyphenole in grünem Tee

Grüner Tee wird aus den Blättern von *Camellia sinensis* hergestellt. Im Gegensatz zu schwarzem Tee, bei dem die Blätter voll fermentiert werden, und zum Oolong Tee, der aus halbfermentierten Blättern hergestellt wird, werden die Blätter für die Zubereitung von grünem Tee nicht fermentiert, sondern frisch verarbeitet. Sie werden dabei entweder mit trockener Hitze behandelt oder mittels Wasserdampf getrocknet (Wang *et al.* 2000). Da Oxidationsenzyme bei diesem Schritt deaktiviert werden, ist der Gehalt an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in grünem Tee im Vergleich zu schwarzem Tee und zu Oolong Tee besonders hoch (Taylor *et al.* 2005; Yousaf *et al.* 2014). Den größten Anteil der Polyphenole in grünem Tee machen die Flavonoide aus. Etwa 20-30 % davon sind Catechine, wovon mehr als 50 % durch EGCG eingenommen werden. Weitere Catechine in grünem Tee sind EGC, ECG und EC (Wang *et al.* 2000; Taylor *et al.* 2005).

Dem grünen Tee werden antioxidative, kardioprotektive, antimikrobielle, immunmodulierende und entzündungshemmende Eigenschaften zugeschrieben (Ellinger *et al.* 2011; Bornhoeft *et al.* 2012; Jiang *et al.* 2012; Ohno *et al.* 2013; Newsome *et al.* 2014; Yousaf *et al.* 2014). Durch grünen Tee kann der Cholesterolgehalt im Plasma gesenkt und der Insulin- und der *high-density lipoprotein* (HDL)-Gehalt erhöht werden (Bornhoeft *et al.* 2012; Yousaf *et al.* 2014). Dadurch kann das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen merklich vermindert werden. Der Schutz vor oxidativem Stress wird durch die Hochregulierung von antioxidativen Genen in der Leber hervorgerufen (Newsome *et al.* 2014). Die Effekte werden größtenteils auf EGCG zurückgeführt. Dabei wird angenommen, dass EGCG über den Nrf2-Signalweg Gene des Fremdstoffmetabolismus aktiviert (Shen *et al.* 2005; Jiang *et al.* 2012; Newsome *et al.* 2014). EGCG kann zeit- und dosisabhängig MAPKs aktivieren, was zu der ARE-vermittelten Induzierung der Genexpression führt (Chen *et al.* 2000). Mittels einer Microarray Analyse wurden Gene ermittelt, die Nrf2-abhängig durch EGCG reguliert werden (Shen *et al.* 2005). Nach einer oralen Aufnahme von EGCG konnten bei Mäusen mehr EGCG-regulierte und Nrf2-abhängige Gene in der Leber als im Dünndarm gefunden werden. Der Einfluss von EGCG scheint demnach in der Leber bedeutender zu sein. Auch Nrf2-unabhängige, jedoch durch EGCG-regulierte Gene, wurden in Leber und Darm gefunden (Shen *et al.* 2005). Am stärksten beeinflusst wurden Gene für Enzyme des Fremdstoffmetabolismus, Kinasen und Transkriptionsfaktoren-codierende Gene. Ebenso wurde ein Einfluss von EGCG auf

Transportproteine gefunden, die durch Nrf2 reguliert wurden (Shen *et al.* 2005). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine hohe EGCG-Konzentration eine Induzierung der Apoptose hervorruft (Chen *et al.* 2000). Die entzündungshemmende Eigenschaft von grünem Tee wird auf eine Herunterregulierung der NF- κ B-Aktivierung zurückgeführt (Yang *et al.* 1998; Jiang *et al.* 2012). Von Yang *et al.* (1998) wurde erstmals nachgewiesen, dass Polyphenole aus grünem Tee die TNF- α -Genexpression durch eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung verhindern können. Dieser Effekt wird auf EGCG zurückgeführt. Untersuchungen in Makrophagen ergaben, dass eine durch TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung, durch eine Behandlung mit EGCG inhibiert werden konnte. Bisher ist nicht bekannt, ob die Translokation von Nrf2 in den Nukleus durch EGCG, durch eine direkte Beeinflussung von Nrf2, oder durch eine Interaktion mit Keap1 ausgelöst wird (Jiang *et al.* 2012).

All diese Erkenntnisse machen deutlich, dass durch EGCG bzw. durch grünen Tee über die Regulierung der Nrf2-vermittelten Genexpression und der Unterdrückung der durch NF- κ B-vermittelten Genexpression die zelluläre Abwehr, Entzündungsreaktionen und die Ausscheidung von Fremdstoffen verbessert wird und EGCG bzw. grüner Tee damit zur Gesundheit des Organismus beitragen kann.

2.3 Ebergeruch

Die Pubertät von männlichen Schweinen beginnt etwa ab der 12. Lebenswoche. In dieser Zeit entwickeln die Tiere den typischen Ebergeruch (Lindermayer 2010). Dieser ist gekennzeichnet durch eine stark negative Geruchs- und Geschmacksabweichung des Fleisches und wird von Verbrauchern hauptsächlich beim Erhitzen und Kochen des Fleisches wahrgenommen. Hauptverantwortlich für Ebergeruch sind die beiden Komponenten Androstenon und Skatol (Patterson 1968; Lundström *et al.* 1988). Während Skatol von allen Menschen wahrgenommen wird, sind ca. 20-30 % der Bevölkerung nicht in der Lage Androstenon olfaktorisch wahrzunehmen (Wysocki und Gilbert 1989; Andresen 2006), da die Eigenschaft, den unangenehmen Androstenongeruch zu vernehmen, genetisch festgelegt zu sein scheint (Wysocki und Beauchamp 1984). Anhand einer Verbraucherbefragung wurde beobachtet, dass die Ablehnung des von Ebergeruch belasteten Fleisches jedoch hauptsächlich auf dem hohen Skatolgehalt im Fleisch der Tiere beruht (Bonneau *et al.* 2000). Im Folgenden sollen die beiden Stoffe Androstenon und Skatol näher erläutert werden.

2.3.1 Androstenon

Für den urinartigen Geruch des Eberfleisches ist das lipophile Steroidhormon Androstenon (5 α -Androst-16-en-3-on) verantwortlich. Es wurde erstmals von Patterson (1968) im Fett von Schweinen identifiziert. Neben anderen Steroidhormonen, wie dem Testosteron oder den Östrogenen, wird es in den Leydig-Zellen im Hoden synthetisiert, wirkt jedoch selbst nicht als Hormon. Die Synthese von Androstenon wird durch die Bildung des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) im Hypothalamus angeregt, welches eine stimulierende Wirkung auf das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) und das luteinisierende Hormon (LH) in der Adenohypophyse hat. LH bindet anschließend an Rezeptoren in den Leydig-Zellen, wodurch Sexualsteroid- und Pheromone synthetisiert werden. Aufgrund seiner Lipophilie kann Androstenon im Fettgewebe akkumulieren (Katkov und Gower 1970). Über den Blutkreislauf gelangt es entweder in die Leber oder in die Speicheldrüsen, wo es im Speichel als Pheromon wirkt. Androstenon wird in der Leber und in den Hoden durch den gleichen Metabolismus abgebaut (Rasmussen *et al.* 2012a). In einer Phase I Reaktion wird Androstenon durch die 3 α - und 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 α - bzw. 3 β -HSD) zu α - und β -Androstenol reduziert, wobei mengenmäßig hauptsächlich β -Androstenol entsteht (Doran *et al.* 2004; Kim *et al.* 2013). Die 3 β -HSD scheint eines der Hauptenzyme im Androstenonmetabolismus darzustellen. Forschungen zeigen, dass die 3 β -HSD im Eber hauptsächlich in der Leber exprimiert wird (Nicolau-Solano *et al.* 2006). Die hepatische 3 β -HSD-Expression scheint durch einen hohen Androstenongehalt im Fett der Eber unterdrückt zu werden (Doran *et al.* 2004). Im Hoden wird die Expression durch die Androstenonkonzentration nicht beeinflusst. Die Hemmung der 3 β -HSD durch Androstenon scheint auf transkriptioneller Ebene zu erfolgen, da neben der unterdrückten Proteinexpression auch eine niedrige mRNA-Expression beobachtet wurde (Nicolau-Solano *et al.* 2006). Kim *et al.* (2013) identifizierten acht Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im Gen der 3 β -HSD. Alle SNPs wurden in nicht codierenden Regionen gefunden. Dabei wurde herausgefunden, dass nur ein SNP, SNP5, einen signifikanten Effekt auf den Androstenongehalt von unkastrierten Ebern hat. Die erhöhte 3 β -HSD-Expression wurde von einem erniedrigten Androstenongehalt im Fettgewebe begleitet (Kim *et al.* 2013).

Im Phase II Metabolismus werden α - und β -Androstenol entweder durch die Sulfotransferase 2A1 (SULT2A1) sulfokonjugiert oder durch UGT-Enzyme glucuronidiert, wodurch die Wasserlöslichkeit steigt und eine Ausscheidung über Niere

und Galle ermöglicht wird (Sinclair *et al.* 2005; Sinclair *et al.* 2006). Abbildung 2.4 zeigt schematisch den Androstenonmetabolismus im Eber.

Im Blut liegt Androstenon neben der freien Form zu 70 % sulfokonjugiert vor (Sinclair und Squires 2005). Die sulfokonjugierte Form von Androstenon bestimmt die Menge an unkonjugierten Androstenon, das sich im Fettgewebe der Eber einlagert. Je höher der Anteil an konjugiertem Androstenon im Plasma, desto geringer ist die Akkumulation von Androstenon im Fettgewebe (Sinclair und Squires 2005). Die Leber trägt zu einem geringen Anteil zur Sulfokonjugation von Androstenon im Plasma bei (Sinclair *et al.* 2005). Die Menge im Plasma wird durch die testikuläre Hydroxysteroidsulfotransferase bestimmt, weshalb dieses Enzym ein potentiell genetischer Marker für das Aussortieren von Tieren mit starkem Ebergeruch darstellen könnte (Sinclair und Squires 2005). Tiere mit einer hohen Aktivität weisen einen geringeren Ebergeruch auf und könnten für die weitere Zucht genutzt werden.

Der Grenzwert für Androstenon im Fett von Ebern ist nicht mehr gesetzlich festgelegt. Ein Androstenongehalt von 0,5-1 µg/g Fett wird als Richtwert für das Aussortieren von geruchsauffälligem Fleisch angesehen (Rhodes 1971).

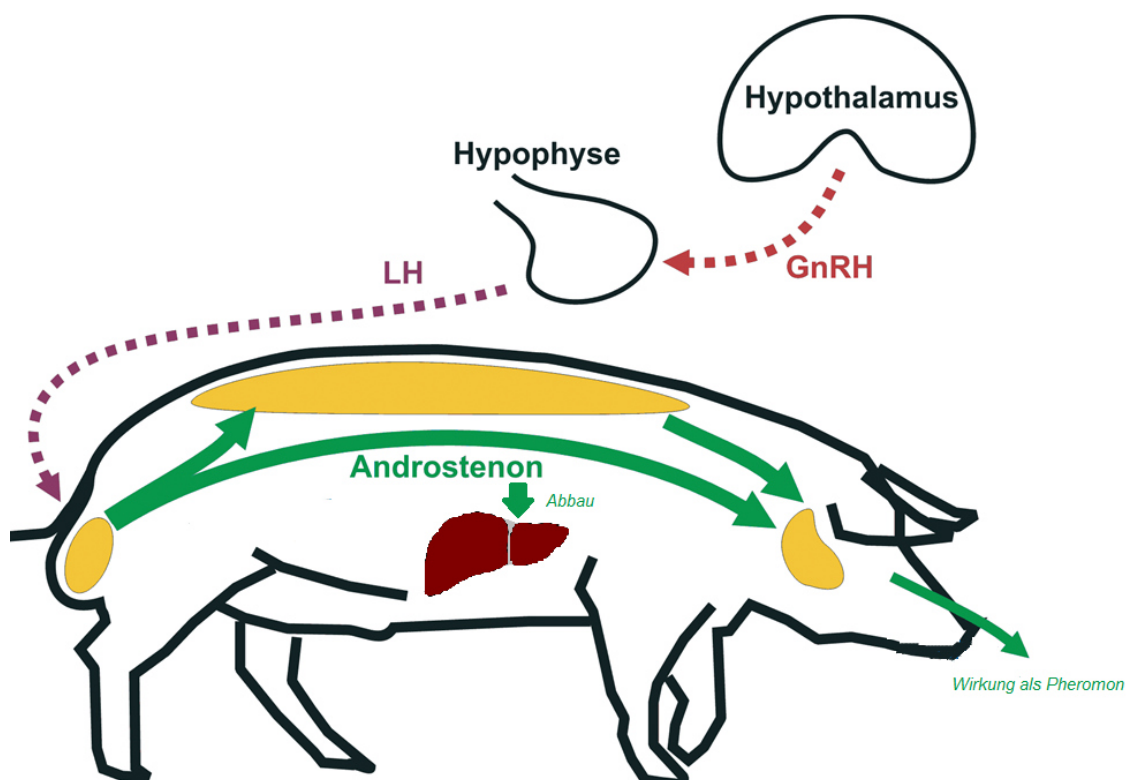


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Androstenonmetabolismus

Androstenon wird im Hoden gebildet und kann im Fettgewebe und der Speicheldrüse akkumulieren. Es wirkt als Pheromon. Der Abbau erfolgt über die Leber.

GnRH = Gonadotropin-Releasing-Hormon; LH = luteinisierende Hormon; [Modifiziert nach Baumgartner *et al.* (2004)].

2.3.2 Skatol

Der fäkalartige Geruch des Eberfleisches wird durch Skatol (3-Methyl-Indol) hervorgerufen. Skatol wird bei männlichen sowie weiblichen Schweinen im Dickdarm durch Bakterien aus der Aminosäure Tryptophan gebildet (Jensen *et al.* 1995). Auch in Wiederkäuern kommt Skatol vor, wo es hauptsächlich im Pansen gebildet wird. Hauptverantwortlich für die Skatolsynthese sind *Clostridien* und *Lactobacillen* (Yokoyama *et al.* 1977; Jensen *et al.* 1995). Tryptophan, welches über die Nahrung oder durch Zellabschilferungen des Darmepithels in den Colon gelangt, wird durch eine Desaminierung zu Indolpyruvat umgewandelt (Whitehead *et al.* 2008). Aus Indolpyruvat kann entweder durch Abspaltung des Pyruvats Indol synthetisiert werden oder durch eine Decarboxylierung an der Seitenkette des Indolpyruvats Indolessigsäure (Whitehead *et al.* 2008). Während dieser Reaktionsschritt durch viele verschiedene Bakterien katalysiert werden kann, sind nur eine geringe Anzahl von Bakterien aus den Familien der *Clostridien* und *Lactobacillen* in der Lage aus Indolessigsäure durch eine Decarboxylase-Reaktion Skatol zu synthetisieren (Whitehead *et al.* 2008). Eine Ausnahme bildet der Stamm *Clostridium scatologenes*, der ohne die oben beschriebenen Zwischenprodukte, direkt aus Tryptophan Skatol synthetisieren kann (Jensen *et al.* 1995).

Im Darm wird Skatol passiv aufgenommen und gelangt über die Portalvene zur Leber, wo es über den hepatischen Fremdstoffmetabolismus abgebaut wird (Andresen 2006). In einer Phase I Reaktion spielen die Cytochrom P450 Enzyme CYP2E1 und CYP2A19 eine Schlüsselrolle im Skatolmetabolismus (Babol *et al.* 1998a; Matal *et al.* 2009; Wiercinska *et al.* 2012). In dieser Reaktion entstehen mehrere Zwischenprodukte, wobei die Bildung von 3-Methoxyindol mengenmäßig überwiegt. Neben diesem Metabolit entstehen Indol-3-carbinol, 5-Hydroxy-3-methylindol, 6-Hydroxy-3-methylindol, 2-Aminoacetophenon und 3-Hydroxy-3-methoxyindol (Diaz *et al.* 1999; Wiercinska *et al.* 2012). Diesen Reaktionsschritt kann Androstenon beeinflussen. Die Expression von CYP2E1 und CYP2A19 wird durch Androstenon gehemmt, während Indol und Skatol die Expression stimulieren (Doran *et al.* 2002; Chen *et al.* 2008). Für CYP2E1 wurde nachgewiesen, dass die Hemmung der Expression durch Androstenon durch die Bindung an den Transkriptionsfaktor COUP-TF1 (*Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factor 1*) hervorgerufen wird (Tambyrajah *et al.* 2004). Neben der Expressionshemmung wurde ebenfalls eine Inhibierung der CYP2E1 Aktivität durch Androstenon beschrieben (Zamaratskaia *et al.* 2007).

In einer Phase II Reaktion werden die entstandenen Metabolite glucuronidiert oder sulfokonjugiert und können, aufgrund der dadurch erreichten Wasserlöslichkeit, über die Niere ausgeschieden werden (Babol *et al.* 1998b). Die SULT1A1 stellt das Hauptenzym in diesem Metabolisierungsschritt dar (Lin *et al.* 2004). Wie beim Androstenon, liegt Skatol im Plasma zum größten Teil sulfokonjugiert vor, was zeigt, dass die Sulfotransferaseaktivität eine entscheidende Rolle beim Abbau von Skatol spielt (Lin *et al.* 2004). Schweine mit einer hohen Sulfotransferaseaktivität weisen einen niedrigen Skatolgehalt im Fett auf. Mutationen im SULT1A1 Gen könnten deswegen als genetische Marker genutzt werden, um Tiere mit einer erniedrigten Aktivität auszusortieren (Lin *et al.* 2004). Eine Punktmutation in der codierenden Region des SULT1A1 Gens (546 bp) wurde identifiziert, bei der die Base Adenin durch Guanin ersetzt wurde (Lin *et al.* 2004). Diese Substitution führt zum Austausch von Lysin zu Glutaminsäure, wodurch die Enzymaktivität signifikant reduziert wird. Daher wird vermutet, dass eine verminderte Sulfotransferaseaktivität für einen höheren Skatolgehalt im Fett von Schweinen mitverantwortlich sein könnte (Lin *et al.* 2004). Abbildung 2.5 zeigt schematisch den Skatolmetabolismus im Eber.

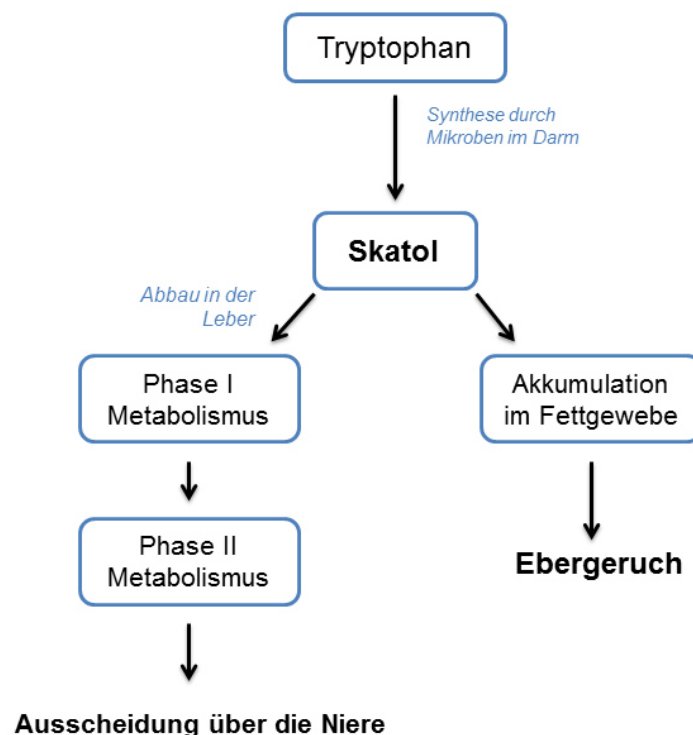


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Skatolmetabolismus

Skatol wird im Darm durch Bakterien aus Tryptophan synthetisiert. Im Fettgewebe kann Skatol akkumulieren. Der Abbau erfolgt über die Leber. [Modifiziert nach Zamaratskaia und Squires (2009)].

Da nicht das gesamte im Dickdarm gebildete Skatol dem Lebermetabolismus zugeführt wird, reichert sich unmetabolisiertes Skatol aufgrund seiner Lipophilie, wie im Falle von Androstenon, im Fettgewebe von Ebern an. Die Akkumulation hängt von der Skatolkonzentration im Blut, von der Synthese im Dickdarm und der Abbaurate in der Leber ab (Jensen 2006). Der Skatolgehalt im Plasma und im Fettgewebe von Ebern variiert altersabhängig. Mit dem Eintritt in die Pubertät steigt die Skatolkonzentration stark an. Nach Erreichen eines Maximums sinkt der Skatolgehalt mit zunehmendem Alter wieder. Das Alter und der Zeitraum, in dem die Skatolwerte ansteigen sind rasseabhängig (Babol *et al.* 2004). Wie im Falle von Androstenon scheint auch die Genetik bei der Einlagerung von Skatol eine Rolle zu spielen. Der Gehalt variiert zwischen einzelnen Rassen, was z.B. durch einen rassenspezifisch späteren Eintritt in die Pubertät hervorgerufen werden kann (Babol *et al.* 2004).

Gute Haltungsbedingungen und eine angemessene Hygiene können den Skatolgehalt im Fettgewebe positiv beeinflussen (Andersson *et al.* 1997). Liegen schlechte und unhygienische Haltungsbedingungen vor, nehmen die Tiere Skatol, welches sich im ausgeschiedenen Kot befindet, über die Atemwege auf, was sich wiederum im Fettgewebe einlagern kann (Lindermayer 2010).

Für Skatol wird ein Richtwert von maximal 250 ng/g Fett empfohlen, damit das Fleisch als genusstauglich angesehen werden kann (Lindermayer 2010).

2.4 Möglichkeiten zur Vermeidung von Ebergeruch

Möglichkeiten, um Ebergeruch trotz des angestrebten Verbots der betäubungslosen Kastration der männlichen Ferkel erfolgreich zu vermeiden, sind neben der gezielten Selektion geruchsauffälliger Eber, der Einsatz von Narkose- und Betäubungsmitteln bei der Kastration. Die Ferkel können entweder durch eine Lokalanästhesie, durch eine Inhalationsnarkose und anschließender Schmerzmittelgabe oder durch eine Injektionsnarkose kastriert werden (Baumgartner 2008; Preinerstorfer *et al.* 2010). Doch auf Dauer ist diese Methode für viele Schweinefleischerzeuger unwirtschaftlich und mit zu viel Aufwand verbunden (Preinerstorfer *et al.* 2010). Da Eber theoretisch erst bei Eintritt in die Pubertät den Ebergeruch voll entwickeln, könnten die Tiere vor Beginn der Pubertät geschlachtet werden. Doch auch hier zeigte sich, dass das Merkmal Ebergeruch zwischen den Rassen sehr stark variieren kann und auch Eber mit einem deutlich niedrigeren Schlachtgewicht bereits geruchsauffällig sein können (Aldal *et al.* 2005). Die frühzeitige Schlachtung garantiert also nicht, dass das Fleisch

der Eber geruchsunauffällig ist. Ein angemessenes Stall-Management spielt ebenfalls eine große Rolle im Bezug auf die Reduzierung von Ebergeruch. So zeigte sich, dass kleinere Gruppen, eine geringere Stallfläche pro Eber, eine moderne Ausstattung und eine längere Fastenperiode vor der Schlachtung positiv mit dem Auftreten von Ebergeruch assoziiert wird (van Wagenberg *et al.* 2013). Die besten Alternativen zur Vermeidung von Ebergeruch stellen zum einen die sogenannte Immunokastration dar, die in einigen Ländern erfolgreich angewendet wird und zum anderen die Jungebermast mit besonderem Augenmerk auf die Fütterung und Haltung. Diese beiden Alternativen sollen in den nächsten Kapiteln genauer vorgestellt werden.

2.4.1 Immunokastration

Die bisher einzige Möglichkeit den Androstenongehalt im Fettgewebe der Eber positiv zu beeinflussen ist die aktive Immunisierung gegen Androstenon (Fuchs *et al.* 2009; Zamaratskaia und Squires 2009; Fàbrega *et al.* 2010; Dunshea *et al.* 2013). Dabei werden die Tiere gegen das GnRH immunisiert. Die Eber erhalten zwei Impfungen einer modifizierten Form des GnRH, was zu einer verminderten Sekretion des FSH und des LH führt, die im Normalfall die Synthese von Androstenon und Testosteron im Hoden stimulieren. Die erste Dosis wird etwa im Alter von 10 Wochen gegeben, die zweite Dosis ca. 4-6 Wochen vor der Schlachtung. Werden die Tiere nicht innerhalb dieser Zeit geschlachtet, müssen sie spätestens 10 Wochen nach der letzten Dosis geschlachtet werden, mit dem Hinweis, dass ein minimales Risiko für Ebergeruch besteht (Andersson *et al.* 2012). Durch die Verabreichung der Vakzine bildet der Körper Antikörper aus, die sich auch gegen das natürliche GnRH richten, was dadurch seine Wirkung verliert. In Folge dessen werden weniger Testosteron und Androstenon im Hoden gebildet, so dass weniger Androstenon im Blutkreislauf zirkuliert und im Fettgewebe akkumulieren kann (Dunshea *et al.* 2013). Nach Verabreichung der ersten Dosis entwickelt sich der Eber normal weiter. Erst nach der zweiten Dosis besteht die hormonelle Kastration, da die Hormone erst ab diesem Zeitpunkt unterdrückt werden (Dunshea *et al.* 2013). Als erfolgreiches Vakzin hat sich das sogenannte Improvac® (Pfizer Animal Health, Berlin, Deutschland) durchgesetzt. Kastrierte Schweine wurden mit Ebern, die mit Improvac® behandelt wurden, verglichen (Dunshea *et al.* 2001). Keines der behandelten Schweine hatte Androstenon-, oder Skatolwerte über den Grenzen von 1 µg/g Fett bzw. 0,2 µg/g Fett (Dunshea *et al.* 2001). Die Immunisierung hat also auch indirekt einen Einfluss auf den Skatolgehalt. Die Wachstumsrate

verbesserte sich sogar im Vergleich zu den kastrierten Schweinen, wobei der Futteraufwand unverändert blieb. Grund dafür könnte ein vermindertes aggressives und sexuelles Verhalten der Eber nach der zweiten Verabreichung sein, die zur Unterdrückung der testikulären Funktion führt (Dunshea *et al.* 2001). Ohne Immunisierung würden sich die Eber zu diesem Zeitpunkt in der Pubertät befinden und ein erhöhtes sexuelles und aggressives Verhalten zeigen (Dunshea *et al.* 2001). Je früher die Immunokastration eingesetzt wird, desto weniger treten aggressives und sexuelles Verhalten der Eber auf. Dadurch wird die Tiergesundheit verbessert und die Haltung der Eber einfacher (Andersson *et al.* 2012). Seit Mai 2009 ist Improvac® EU-weit zugelassen (Europäische Kommission 2009). Inwieweit die Immunokastration von den Konsumenten in Zukunft akzeptiert wird, ist nicht sicher vorauszusagen. Viele Fleischkonsumenten stehen der Immunokastration weiterhin skeptisch gegenüber, da sie Angst vor Rückständen des Impfstoffes im Eberfleisch und damit verbundenen Folgen haben (Fredriksen *et al.* 2011).

2.4.2 Fütterung in der Jungebermast

Eine weitere Alternative für die Schweinefleischproduktion stellt die Ebermast dar. Die Mast von jungen Ebern hat gegenüber der Börgermast einige Vorteile. Unkastrierte, männliche Schweine wachsen schneller und weisen eine bessere Schlachtkörperzusammensetzung auf. Sie besitzen im Vergleich zu Kastraten ein höheres Proteinansatzvermögen und setzen weniger Fett an (Andersson *et al.* 1997; Lindermayer 2010). Darin ist eine bessere Futterverwertung begründet, die aus ökonomischer Sicht positiv zu bewerten ist (Babol und Squires 1995; Lindermayer 2010; Lindermayer *et al.* 2012). Ebenfalls entstehen keine Kosten durch eine Kastration und der nachfolgenden Schmerzbehandlung. Doch trotz dieser Vorteile stellt der größte limitierende Faktor der Ebermast der Ebergeruch dar, weswegen Methoden entwickelt werden müssen, die zu einer Reduzierung oder Vermeidung von Ebergeruch führen. Dabei bietet sich zum einen die Zucht mit ausgewählten Ebern an, die eine geringere Geruchsabweichung aufweisen, zum anderen spezielle Fütterungskonzepte, die die unerwünschten Geruchsabweichungen minimieren. In der Literatur wird beschrieben, dass der Skatolgehalt im Speck von Ebern durch eine spezielle Fütterung von präbiotisch wirksamen Pflanzenbestandteilen reduziert werden kann (Claus *et al.* 1994; Claus *et al.* 2003; Zamaratskaia *et al.* 2006; Hansen *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Hansen *et al.* 2008; Vhile *et al.* 2012; Zammerini *et al.* 2012).

Präbiotika sind Nahrungsbestandteile, die den Colon unverdaut erreichen und selektiv das Wachstum oder die Aktivität von spezifischen, gesundheitsfördernden Bakterien stimulieren (Roberfroid *et al.* 1998). Da Skatol im Dickdarm der Schweine durch Bakterien aus dem, durch abgeschilferte Darmzellen stammenden Tryptophan gebildet wird, kann ein spezielles Futter, welches den Mikroben eine alternative Energiequelle liefert wodurch Tryptophan in Mikrobenprotein eingebaut wird, zu einer verminderten Skatolbildung im Darm führen. Besonders wirksam scheinen rohe Kartoffelstärke und Inulin zu sein (Claus *et al.* 1994; Claus *et al.* 2003; Hansen *et al.* 2006; Zamaratskaia *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Vhile *et al.* 2012). Die Bakterien metabolisieren die präbiotisch wirksamen Stoffe und setzen dabei mikrobielle Fermentationsprodukte frei, v.a. kurzkettige Fettsäuren (*short chain fatty acids*; SCFA). SCFA hemmen die Apoptose der Darmzellen, so dass weniger Tryptophan freigesetzt und die mikrobielle Skatolproduktion reduziert wird (Claus *et al.* 2003). Der Androstenongehalt im Fett von Ebern ist genetisch determiniert. Es konnte jedoch durch die Verfütterung von Zichorienwurzeln erstmals eine Androstenonreduktion erzielt werden, die höchstwahrscheinlich durch eine Induzierung der β -HSD hervorgerufen wird (Rasmussen *et al.* 2012b). Deutlich wird, dass Präbiotika in der Jungebermast eine entscheidende Rolle bei der Reduzierung von Ebergeruch spielen können. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei kommerziell erhältlich präbiotisch wirksame Zusatzstoffe verwendet wurden, sollen deren Bestandteile kurz vorgestellt werden.

Fructooligosaccharide (FOS) sind Mehrfachzucker, die in den oberen Darmabschnitten nicht durch Verdauungsenzyme metabolisiert werden und in den Dickdarm gelangen. Dort fungieren sie als Nahrungsquellen für die mikrobielle Flora und fördern so z.B. das Wachstum von *Bifidobakterien*. *In vitro* führt der Zusatz von FOS in einem Kulturmedium zu einer Verminderung des Tryptophanabbaus und damit zu einer reduzierten Skatolkonzentration (Xu *et al.* 2002). Bei Ferkeln wurde nachgewiesen, dass der Zusatz von 3 g FOS pro Tag zu einer deutlichen Stimulierung der mikrobiellen Fermentation führt (Howard *et al.* 1995).

Gluconsäure resultiert aus einer unvollständigen Oxidation der Glucose durch verschiedene *Gluconobacter* Stämme (Deppenmeier *et al.* 2002). Da Gluconsäure schlecht absorbierbar ist, gelangt es in den Dickdarm, wo es von Bakterien als Energiequelle genutzt und hauptsächlich in Butyrat umgewandelt wird. Die Produktion der SCFA im Darm kann durch den Zusatz von Gluconsäure im Futter von Ferkeln erhöht werden. Auch eine verbesserte Wachstumsleistung von Ferkeln kann durch den Zusatz von Gluconsäure im Futter erzielt werden (Biagi *et al.* 2006). Da Butyrat die Hauptenergiequelle für die Epithelzellen des Dickdarms ist, kann der Zusatz von

Gluconsäure im Futter von Ferkeln indirekt das Epithel-Zellwachstum anregen (Biagi *et al.* 2006). Die gesteigerte SCFA-Produktion und eine verminderte Ammoniakkonzentration im Darm von Ferkeln deuten darauf hin, dass der Zusatz von Gluconsäure die mikrobielle Flora im Darm der Tiere verbessert und dass der Zusatz von Gluconsäure eine mögliche Alternative zum Einsatz von Antibiotika sein kann (Biagi *et al.* 2006).

3 Zielstellung dieser Arbeit

Das Hauptziel der vorgelegten Arbeit bestand darin, den unerwünschten Ebergeruch im Fleisch der Jungeber durch einen Zusatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten und Präbiotika zum Futter zu reduzieren. Dieses Ziel unterteilte sich im ersten Teil der Dissertation auf den Versuch den Androstenon- und Skatolgehalt im Rückenspeck der Eber durch polyphenolreiche Pflanzenextrakte im Futter über den Nrf2-Signalweg zu reduzieren und im zweiten Teil die Skatolkonzentration im Rückenspeck durch den Zusatz von präbiotischen Stoffen zum Futter zu senken. Folgende Hypothesen wurden dafür aufgestellt und untersucht:

Wie in Kapitel 2.2 bereits dargestellt, ist bekannt, dass Polyphenole in der Lage sind Nrf2 und dessen Zielgene zu aktivieren (Chen *et al.* 2000; Shen *et al.* 2005; Soyalan *et al.* 2011; Han *et al.* 2012). Zielgene des Nrf2 sind unter anderem auch Gene für Enzyme, die in den Androstenon- und Skatolmetabolismus involviert sind (Babol *et al.* 1998a; Sinclair *et al.* 2005; Sinclair *et al.* 2006). Versuche zur Fütterung von Traubentrester, Hopfenextrakt oder grünem Tee bei Ebern und dessen Effekt auf den Nrf2 in der Leber wurden bislang nicht untersucht. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von polyphenolreichen Pflanzenextrakten auf die Aktivierung von Nrf2 im Zellkern und die Aktivierung von Nrf2-Zielgenen in der Leber untersucht werden. In diesem Zuge stellte sich die Frage, ob eine potentielle Aktivierung von Nrf2 auch zu einer Aktivitätssteigerung von Enzymen des hepatischen Fremdstoffmetabolismus führt, die in den Abbau von Androstenon und Skatol involviert sind und dadurch möglicherweise dessen Abbau beschleunigen und eine Akkumulation im Fettgewebe verhindern oder reduzieren.

Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurden in **Versuch 1** 48 Eber in vier Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe stellte die Kontrollgruppe dar. In den anderen Gruppen wurde dem Futter zu je 1 % Traubentrester, Hopfenextrakt oder grüner Tee zugesetzt. Die Leistungs- und Schlachtparameter der Eber wurden erhoben. In der Leber wurde die Aktivierung von Nrf2 und die relative mRNA-Konzentration von Nrf2-Zielgenen, sowie die Proteinexpression und die Aktivität von Enzymen des hepatischen Fremdstoffmetabolismus untersucht, die in den Abbau von Androstenon und Skatol involviert sind. Im Rückenspeck der Eber wurde die Androstenon- und Skatolkonzentration gemessen.

Durch präbiotische Zusätze im Futter von Schweinen, z.B. lösliche Nichtstärkepolysaccharide oder resistente Stärke, kann der Skatolgehalt im Speck der Tiere merklich vermindert werden (Vhile *et al.* 2012; Zammerini *et al.* 2012). Im Darm werden präbiotische Stoffe bakteriell fermentiert. Dabei entstehen u.a. flüchtige Fettsäuren, die die Apoptose der Dickdarmzellen hemmt und daher die Menge an Tryptophan, welches für die mikrobielle Synthese von Skatol notwendig ist, vermindert. Allerdings müssen für eine Reduktion der Skatolkonzentration im Fettgewebe relativ große Mengen der Präbiotika eingesetzt werden. Studien haben gezeigt, dass chemische Verbindungen wie Gluconsäure oder lösliche, kurzkettige Fructooligosaccharide in geringeren Dosierungen als Präbiotika verwendet werden können (Howard *et al.* 1995; Biagi *et al.* 2006). Bisher wurde der Einsatz dieser chemischen Verbindungen zur Skatolreduktion im Speck der Eber nicht untersucht. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass FOS die Skatolkonzentration senken und das bakterielle Wachstum fördern können (Xu *et al.* 2002). Daher sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft werden, dass der Einsatz von Gluconsäure und Fructooligosacchariden im Futter der Jungeber die mikrobielle Fermentation steigert und dass im Zuge dessen, durch eine potentiell verminderte Bildung von Skatol im Darm, eine Anreicherung von Skatol im Speck der Eber reduziert werden kann. Um diese Hypothesen zu überprüfen wurden in **Versuch 2** 48 Eber in vier Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe stellte die Kontrollgruppe dar. In den anderen Gruppen erhielten die Eber über das Futter entweder 0,5 % Fructooligosaccharide, 1 % Gluconsäure oder eine Kombination der beiden Verbindungen mit den zuvor genannten Relationen. Neben der Erfassung der Leistungs- und Schlachtparameter der Eber, wurden der pH-Wert und die flüchtigen Fettsäuren im Kot bestimmt und der Skatolgehalt im Rückenspeck gemessen.

4 Material und Methoden

Um den Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten und Präbiotika im Futter von Jungebern auf die Androstenon- und Skatolkonzentration im Rückenspeck zu untersuchen und dabei eine potentielle Beteiligung des Nrf2 aufzuklären, wurden zwei Ebermastversuche durchgeführt. Wie in Kapitel 3 bereits beschrieben, sollte im ersten Tierversuch untersucht werden, ob die Androstenon- und Skatolkonzentration im Rückenspeck der Eber durch die Verabreichung von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten über das Futter beeinflusst werden kann und ob der Zusatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten über das Futter den Transkriptionsfaktor Nrf2, dessen Zielgene und bestimmte Enzyme des hepatischen Fremdstoffmetabolismus, die in den Androstenon- und Skatolmetabolismus involviert sind, aktiviert. Im zweiten Tierversuch sollte der Einfluss eines mit Präbiotika angereicherten Futters auf die Skatolkonzentration im Rückenspeck nicht kastrierter Schweine und der Zusammensetzung der flüchtigen Fettsäuren im Kot untersucht werden um darauf rückschließen zu können, ob sich die bakterielle Aktivität im Darm der Tiere verändert hat. Folgend werden die verwendeten Materialien, das Studiendesign und die durchgeführten Methoden erläutert.

4.1 Materialien

Folgende Materialien wurden für die Analysen verwendet.

Material	Hersteller, Land
2-Naphtol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
4-Nitrophenol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
5-fach Green GoTaq® Flexi Buffer	Promega GmbH, Deutschland
5-fach Puffer für cDNA-Synthese	Fermentas GmbH, Deutschland
APS	Carl Roth GmbH, Deutschland
Bicinchoninsäure Assay Reagent A/	Uptima Interchim, Frankreich
BC Assay Protein Quantitation Kit	
Borsäure	Carl Roth GmbH, Deutschland

Broad Range Protein Molecular Weight Markers	Promega GmbH, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH, Deutschland
DEPC	Carl Roth GmbH, Deutschland
Detergent	Active Motif, USA
DHEA	Santa Cruz, Deutschland
DIG Gel Shift Kit, 2 nd Generation	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
dNTPs	GeneCraft, Deutschland
DTT, 1 M	Active Motif, USA
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare Europe GmbH, Deutschland
Ethanol	Karl Roth GmbH, Deutschland
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, USA
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
Hypotonic Buffer 10 x	Active Motif, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
KAPA™ SYBR® FAST QPCR MasterMix for Bio-Rad iCycler™	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Lysis Buffer AM1	Active Motif, USA
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Deutschland
Methanol	VWR International GmbH, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH, Deutschland
Nuclear Extract Kit	Active Motif Europe, Belgien
Oligo-dT-18 Primer	Eurofins MWG Operon, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, Deutschland
PAP	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
PAPS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

peqGOLD Universal Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Active Motif, USA
Protein Quantitation Kit, BC-Assay	Interchim, Frankreich
Reagent A + B	
RevertAid™ Reverse Transcriptase, 200 u/μl	Fermentas GmbH, Deutschland
Roti-Load®, Proteinauftragpuffer, reduzierend	Carl Roth GmbH, Deutschland
Rotiphorese Gel 40 (Acrylamid)	Carl Roth GmbH, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH, Deutschland
TEMED	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
TRIS	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
TRIzol® Reagent	Invitrogen GmbH, Deutschland
Tween® 20 pure	SERVA Elektrophoresis GmbH, Deutschland

4.2 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Analysen verwendet.

Gerät	Hersteller, Land
BIO Rad Mini Trans-Blot® Cell, Tank Blot System	Bio-Rad, Laboratories, USA
Bio Trace™ NT, Pure	Pall Corporation, USA
Nitrocellulose Blotting Membran	
BioRad Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories, USA
Blotpapier	Bio-Rad Laboratories, USA
Fiber Pads	Bio-Rad Laboratories, USA
G:BOX (Lumineszenzimager)	SYNGENE, Großbritannien
GeneFlash (UV-Licht-Imager)	SYNGENE, Großbritannien

Heidolph Duomax 1030 (Schwenker)	Heidolph Instruments, Deutschland
HERAEUS Fresco 21 Centrifuge	Thermo Electron LED GmbH, Deutschland
HERAEUS Incubator	Thermo Scientific, Deutschland
NanoQuant plate™	TECAN Austria GmbH, Österreich
Nylon Membran, positiv geladen	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Optima™ TLX Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, Deutschland
pH-Meter 211	Hanna Instruments, Deutschland
Plattenreader TECAN infinite M200	TECAN Austria GmbH, Österreich
RotiLoad Blottingpapier	Carl Roth GmbH, Deutschland
Rotorgene Q	Qiagen, Deutschland
Thermocycler Tprofessional BASIC	Biometra GmbH, Deutschland
Thermoschüttler	Eppendorf AG, Deutschland
TissueLyser	Qiagen GmbH, Deutschland
UVP® HL-2000 HybridLinker™	VWR International GmbH, Deutschland
Hybridization Oven/ UV Crosslinker	

4.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die Analysen angesetzt und verwendet.

4.3.1 Puffer für RNA- und DNA-Gelelektrophorese

DEPC-Wasser

0,1 % DEPC wurde in Reinstwasser gelöst, für 24 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert

10x FA-Gelpuffer

200 mM Mops wurden mit 50 mM Na-Acetat x 3 H₂O und 0,5 M EDTA versetzt. Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt

50x TAE-Puffer	242 g Tris wurden mit 57,1 ml Essigsäure, 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) versetzt und auf 1 Liter mit Reinstwasser aufgefüllt
1x TAE-Puffer	40 ml 50x TAE-Puffer wurden mit 1960 ml Reinstwasser aufgefüllt
5x RNA-Laufpuffer	2-3 Krümel Bromphenolblau wurden mit 8 µl EDTA (5 mM; pH 8), 72 µl 37 % FA, 200 µl Glycerol, 310 µl Formamid, 400 µl 10x FA-Gelpuffer versetzt

4.3.2 Puffer und Lösungen für den elektrophoretischen Mobilitäts Shift Assay

Für die Durchführung des elektrophoretischen Mobilitäts Shift Assay (EMSA) wurde das DIG Gel Shift Kit und das DIG Wash and Block Buffer Kit der Firma Roche genutzt und nach Herstellerangaben vorgegangen. Im Folgenden sind die Inhaltsstoffe der verschiedenen Puffer aufgeführt.

5x Puffer für die Bindungsreaktion	100 mM Hepes, pH 7,6 5 mM EDTA 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mM DTT Tween 20 1 % (w/v) 150 mM KCl
5x Puffer für die Markierung	1 M Kaliumkakodylat 0,125 M Tris-HCl 1,25 mg/ml Rinderalbumin pH 6,6

10x TBE	108 g Tris, 55 g Borsäure und 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8) wurden auf 1 L mit Reinstwasser aufgefüllt
Anti-Digoxigenin-AP	750 U/ml polyclonal sheep Anti-Digoxigenin Fab Fragments sind mit alkalischer Phosphatase konjugiert
Blocklösung	10x konzentriert 10 % Blockreagenz in Maleinsäurepuffer
Cobaltchloridlösung	25 mM
CSPD	10 mg/ml
Detektionspuffer	10x konzentriert 1 M Tris-HCl 1 M NaCl pH 9,5
DIG-ddUTP Lösung	1 mM Digoxigenin-11-ddUTP in Reinstwasser gelöst
Ladepuffer	1. Ohne Bromphenolblau 0,25x TBE 60 % Glycerol 2. Mit Bromphenolblau Siehe a.) + 40 % Bromphenolblau, 0,2 % (w/v)
Maleinsäurepuffer	10x konzentriert
Poly [d(I-C)]	1 µg/µl in Reinstwasser gelöst

Poly L-lysin	0,1 µg/µl in Reinstwasser gelöst
Terminale Transferase, rekombinant	60 mM Kaliumphosphat, pH 7,2 150 mM KCl 1mM Mercaptoethanol 0,5 % Triton X-100 50 % Glycerol 400 U/µl
Waschpuffer	10x konzentriert Maleinsäure (10x konzentriert) mit 3-5 % Tween 20 (v/v)

4.3.3 Puffer für proteinanalytische Methoden

Homogenisationspuffer für den CYP2E1-Assay (pH 7,4)	50 mM Tris-HCl 150 mM KCl 1 mM EDTA 250 mM Sucrose
Homogenisationspuffer für den SULT-Assay (pH 7,4)	100 mM Tris-HCl 10 µM EDTA 250 mM Sucrose
Resuspensionspuffer für die mikrosomale Fraktion (pH 7,4)	50 mM Tris-HCl 20 % Glycerol 1 mM EDTA 250 mM Sucrose
Inkubationspuffer für den CYP2E1-Assay (pH 6,8)	100 mM Kaliumphosphat 0,2 mM p-Nitrophenol 1,0 mM NADPH

Inkubationspuffer für den SULT-Assay (pH 6,2)	50 mM Phosphatpuffer 250 mM Sucrose 10 µM PAPS - SULT1A1: 100 µM 2-Naphtol - SULT2A1: 2 µM DHEA
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS pH 8,8
APS	0,1 g wurden in 900 µl Reinstwasser gelöst
SDS (10 %ig)	1 g SDS wurden mit 10 ml Reinstwasser gelöst
SDS-Laufpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 3,5 mM SDS pH 8,3
Transferpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 20 % Methanol
Ponceau S	0,25 g Ponceau S wurden in 500 µl Eisessig und 46,5 ml Reinstwasser gelöst
1x TBST	50 mM TRIS 150 mM NaCl 0,2 % Tween 20 pH 7,5

4.4 Tiere und Haltung

Zur Untersuchung des Einsatzes von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten und Präbiotika im Futter von Jungebern zur Verminderung von Ebergeruch wurden nicht kastrierte männliche Schweine einer Kreuzungsrasse [Piétrain x (Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein)] gehalten. Die Haltung erfolgte einzeln. Die zur Verfügung stehende nutzbare Stallfläche entsprach den Anforderungen der Schweinehaltungsverordnung. Die Schweine wurden bis zu einer Körpermasse von 50 kg mit bedarfsgerechtem Futter aufgezogen und dann gleichmäßig in die entsprechenden Behandlungsgruppen eingeteilt. Alle Tierversuche wurden an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Nutztierwissenschaftlichem Zentrum in Merbitz unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Gabriele Stangl durchgeführt (Tierversuchsanzeige: 42502-Merbitz19).

4.5 Versuchsdurchführung

4.5.1 Design 1. Versuch

Für den ersten Versuch wurden 48 Eber mit einer Körpermasse von ca. 50 kg gleichmäßig in vier Behandlungsgruppen eingeteilt. Sie erhielten in den Mastabschnitten zwischen 50 und 80 kg bzw. 80 und 120 kg bedarfsgerechte Futterrationen, denen 3 % Ergänzungsfutter (Premix Mineralfutter BASU 9045) (Tab. 4.1) und 1 % der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte zugesetzt wurden. In der Kontrollgruppe erhielten die Tiere die Futtermischung ohne Zusatz der Pflanzenextrakte. In den anderen drei Gruppen wurde dem Futter jeweils zu 1 % Traubentrester, Hopfenextrakt oder grüner Tee zugesetzt. Das Futter wurde den Ebern *ad libitum* angeboten. Wasser stand zur freien Verfügung. Nach Beendigung der einzelnen Mastperioden wurden die Leistungsdaten für jede Behandlungsgruppe an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch Herrn Tobias Gräber erfasst und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Bei einer Lebendmasse von ca. 120 kg wurden die Eber geschlachtet und Rückenspeckproben sowie Leberproben für die weitere Analytik entnommen.

4.5.2 Design 2. Versuch

Für den zweiten Versuch wurden 48 Eber nach Erreichen einer Körpermasse von 85 kg gleichmäßig in vier Behandlungsgruppen eingeteilt. In der Mastperiode von 80-120 kg wurde mit der Fütterung der Versuchsdiäten begonnen. In der Kontrollgruppe wurde den Schweinen ein kommerzielles, bedarfsgerechtes Futter gefüttert (Tab. 4.1). In der zweiten Gruppe war dem Futter 0,5 % Fructooligosaccharide (FOS) zugesetzt. In der dritten Gruppe erhielten die Tiere ein Futter mit 1 % Gluconsäure und in der vierten Gruppe wurde eine Kombination der beiden Zusätze gefüttert (0,5 % FOS, 1 % Gluconsäure). Das Futter wurde den Ebern *ad libitum* angeboten, außerdem stand Wasser zur freien Verfügung. Wöchentlich wurden Kotproben zur pH-Messung gesammelt. Einen Tag vor der Schlachtung wurden Kotproben für die Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren genommen und bei -20 °C gelagert. Bei einer Lebendmasse von ca. 120 kg wurden die Eber geschlachtet und Speckproben für die Skatolanalytik entnommen.

4.5.3 Versuchsfutter

In Tabelle 4.1 ist die Zusammensetzung der Grundmischung, die für beide Versuche verwendet wurde, dargestellt. Die Zusammensetzung richtet sich nach den Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen von der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (2006). Alle verwendeten Zusätze stammen von der Firma Dr. Eckel GmbH (Niederzissen, Deutschland). Die Charakteristika der verwendeten Zusätze sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Die Diäten wurden im Nutztierwissenschaftlichen Zentrum in Merbitz gemischt.

Tab. 4.1: Zusammensetzung der Grundmischung für beide Versuche (nach Empfehlungen der GfE, 2006) (Gewichts %)

Komponenten	Mastperiode 50-80 kg	Mastperiode 80-120 kg
Weizen	41,27	34,5
Gerste	41,0	55,0
Mais	0	0
Sojaextraktionsschrot (Proteingehalt 44 %)	13,0	7,0
Sojaöl	1,2	3,0
Premix Mineralfutter BASU 9045 ¹	3,0	3,0
MCP	0,5	0,5
Lysin HCl	0	0
DL-Methionin	0	0
L-Threonin	0,03	0
Kalkulierte Energie/Nährstoffe		
Metabolisierbare Energie (ME) (MJ/kg TM)	13,3	12,85
XP (g/kg TM)	160,6	139,8
Lysin (g/kg TM)	8,73	7,34

MCP = Monocalciumphosphat; XP = Rohprotein; TM = Trockenmasse

¹Premix Mineralfutter BASU 9045 Inhaltsstoffe (pro kg Premix):

Lysin 7 %, Methionin 1 %, Methionin + Cystin 1.05 %, Threonin 1 %, Calcium 20 %, Phosphor 2 %, Natrium 5 %, Magnesium 0.5 %, Vitamin A 300.000 I. E. Vitamin D 50.000 I.E. Vitamin E 2.500 mg, Vitamin K 100 mg, Vitamin B1 85 mg, Vitamin B2 180 mg, Vitamin B6 130 mg, Vitamin B12 800 µg, Nikotinsäure 1.000 mg, Pantothersäure 400 mg, Folsäure 35 mg, Cholinchlorid 5.000 mg, Betain 3.000 mg, Eisen 3.500 mg, Mangan 3.000 mg, Zink 3.000 mg, Kupfer 500 mg, Jod 67 mg, Selen 10 mg, Kobalt 13 mg, Phytase 25.000 FYT, Aromastoffe 600 mg, Antioxidans 1.000 mg

Tab. 4.2: Charakterisierung der verwendeten polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte und Präbiotika

Produkt	Charakterisierung
Traubentrester (Anta [®] Ox E)	Zusammensetzung: Kombination aus Traubentrester und Traubenkernen Inhaltsstoffe: 24,4 % Rohfaser, 11,2 % Rohprotein, 6,7 % Rohfett, 4,9 % Rohasche, 2,0 % Calcium, 0,1 % Phosphor Gesamtflavonoidgehalt: 6 %
Hopfenextrakt (Anta [®] Phyt H)	Zusammensetzung: Hopfentreberpulver, Fließhilfsmittel Inhaltsstoffe: 21,8 % Rohfaser, 21,2 % Rohprotein, 1,3 % Rohfett, 8,6 % Rohasche Gesamtflavonoidgehalt: > 5 %
Grüner Tee (Anta [®] Ox Flavo GTE)	Zusammensetzung: hergestellt aus den Blättern von <i>Camellia sinensis</i> Inhaltsstoffe: Polyphenole 90 %, Flavonoide 70 %, EGCG 40 %
FOS (Anta [®] Sweet OptiFlow)	Inhaltsstoffe: 97 % Trockensubstanz, 94 % Gesamtzucker, 90,4 % FOS in der Trockensubstanz 6 % Fließhilfsmittel < 1 % Asche
Gluconsäure (PreAcid G)	Zusammensetzung: Calciumgluconat, Calciumlactat Inhaltsstoffe: 30,4 % Rohasche, 12,5 % Calcium, 0,4 % Natrium, 0 % Lysin, 0 % Methionin

Die hier dargestellten Charakteristika der zugesetzten Stoffe stammen von Datenblättern der Dr. Eckel GmbH (Niederzissen, Deutschland); FOS = Fructooligosaccharide; EGCG = Epigallocatechin-3-gallat

4.6 Methoden

Die Leistungs- und Schlachtparameter wurden in Kooperation mit der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Stangl von Herrn Tobias Gräber erhoben. Die Genexpressions- und Proteinexpressionsanalysen, die Nrf2-Aktivitätsmessung, die Enzymaktivitätsmessungen und die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren wurden am Institut für Tierernährung der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Die Analysen für die Androstenon-, Indol- und Skatolkonzentrationsmessungen wurden extern von der Universität Hohenheim unter der Leitung von Frau PD Dr. Ulrike Weiler durchgeführt. Alle Methoden sind in den folgenden Unterkapiteln ausführlich beschrieben.

4.6.1 RNA-Isolierung und -Konzentrationsbestimmung

Zur Isolierung der RNA aus den gewonnenen Leberproben wurde TRIzol® nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurden die Leberproben mit je 1 ml Trizol und einem Bead zur Gewebekomogenisation versetzt und für 5 min im TissueLyser bei 15 Hz geschüttelt. Anschließend wurde je Probe 200 µl Chloroform zugegeben und bei Raumtemperatur (RT) drei Minuten inkubiert.

Um die RNA zu fällen, wurde nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 13.600 g und 4 °C in einer HERAEUS Fresco 21 Centrifuge die klare, wässrige Phase in neue Eppendorf-Tubes überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Im Anschluss an eine 10 minütige Inkubation bei RT wurden die Proben 10 min bei 13.600 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt.

Zum Waschen der RNA-Pellets wurde 75 %iger Ethanol verwendet und anschließend 5 min bei 13.600 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und die RNA-Pellets getrocknet.

Zum Lösen der RNA wurde entsprechend der Größe der RNA-Pellets DEPC-Wasser hinzugegeben (25-50 µl) und danach die Proben für 10 min bei 60 °C und 900 rpm im Thermomixer inkubiert. Die RNA wurde bis zur Konzentrationsmessung bei -80 °C gelagert.

Die Konzentration der RNA wurde bei 260 nm in ng/µl am TECAN infinite M200 mithilfe der NanoQuant plateTM bestimmt. Dazu wurden je 2 µl einer Probe auf die Platte pipettiert, welche zuvor mit je 2 µl DEPC-Wasser kalibriert wurde. Um eine Aussage

über den Reinheitsgrad der RNA-Proben treffen zu können, wurde die Ratio aus den Absorptionen der Wellenlängen bei 260 nm und 280 nm gebildet. Eine Ratio von 2 stellt das optimale Ergebnis dar. Für den ersten Ebermastversuch wurde eine durchschnittliche Ratio von $1,97 \pm 0,08$ ermittelt. Die Integrität der RNA wurde mit einem 1 %igen Agarosegel verifiziert (siehe Kapitel 4.6.2).

4.6.2 RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten RNA wurde eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. 1,5 g Agarose wurden eingewogen und mit 150 ml 1x TAE-Puffer versetzt. Das Gel wurde anschließend kurz aufgekocht und bis zu einer Temperatur von 65 °C abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurden 2 µl GelRedTM Nucleic Acid Stain hinzu pipettiert. Das ausgehärtete Gel wurde im 1x TAE-Puffer äquilibriert. Vor dem Auftragen wurden die RNA-Proben (je 2 µl pro Probe) mit 2 µl 5x RNA-Ladepuffer und 8 µl DEPC-H₂O versetzt und für 3 min bei 65 °C und 900 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Nach dem Auftragen der Proben wurde die RNA-Gelelektrophorese bei 80 V durchgeführt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht. Das Gel zeigte die intakten Banden der 18S und 28S ribosomalen Untereinheiten.

4.6.3 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird durch das Enzym reverse Transkriptase einzelsträngige RNA in doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und benötigt zur cDNA-Synthese Primer. Die RNA wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit DEPC-Wasser verdünnt und anschließend mit 40 µl des Mastermixes versetzt, der neben den Primern auch Desoxynucleotide (dNTPs), einen fünffach Puffer, DEPC-Wasser und das Enzym selbst enthält (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mastermix je Reaktionsansatz

Reagenzien	Volumen in μl
DEPC-Wasser	24,9
5-fach Puffer	10
dNTPs; 10 mM	2,5
Oligo-dT-18 Primer; 100 pM	2
RevertAid TM Reverse Transkriptase; 200 U/ μl	0,6

DEPC = Diethylpyrocarbonat; dNTPs = Desoxynucleotide

4.6.4 Quantitative Real-Time-PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden die zu untersuchenden Zielgene durch eine DNA-Polymerase mit spezifischen Primern vervielfältigt. Dies erfolgt in drei Schritten, die sich zyklisch wiederholen. Zuerst wird die doppelsträngige DNA bei Temperaturen zwischen 94 und 96 °C denaturiert. Anschließend lagern sich die Primer bei spezifischen Temperaturen, die auf die Primer abgestimmt sind, an ihre homologen Bereiche innerhalb der Matrizen-DNA an (Annealing). Im dritten Schritt werden die Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase und dNTPs bei ca. 72 °C verlängert. Dies wird als Elongation bezeichnet. Die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge stehen im nächsten Zyklus zur weiteren Vervielfältigung zur Verfügung, so dass es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Ausgangs-DNA kommt.

Mit der RTD-PCR (*Real-time-detection* PCR) ist eine Quantifizierung der neu synthetisierten DNA möglich. Mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der sich in DNA-Doppelstränge einlagert, sobald diese gebildet werden, kann die Entstehung der neu synthetisierten DNA-Doppelstränge beobachtet werden. Nach jedem Elongationsschritt wird bei allen Proben das Fluoreszenzsignal gemessen.

Für die RTD-PCR wurde der KAPATMSYBR[®] FAST QPCR Mastermix for Bio-Rad iCyclerTM verwendet, der neben dem Fluoreszenzfarbstoff ebenfalls die DNA-Polymerase enthält. Für jede Probe wurden 18 μl Mastermix, bestehend aus DEPC-Wasser, KAPATM SYBR[®] FAST QPCR Mastermix und den entsprechenden Primern vorgelegt und anschließend 2 μl cDNA hinzu pipettiert. Die genaue Zusammensetzung des Mastermixes ist Tabelle 4.4 zu entnehmen. Außerdem wurde eine NTC (*none template control*) mitgeführt, bei der anstatt einer DNA-Probe 2 μl DEPC-Wasser hinzu pipettiert wurden. Diese Probe diente der Kontrolle und sollte während einer RTD-PCR nicht ansteigen.

Tab. 4.4: Zusammensetzung des qPCR-Mix je Reaktionsansatz

Reagenzien	Volumen in μl
DEPC-Wasser	7,2
KAPA TM SYBR [®] FAST QPCR Mastermix	10
Forward Primer (10 μM)	0,4
Reverse Primer (10 μM)	0,4
cDNA	2

DEPC = Diethylpyrocarbonat

Die Eigenschaften der verwendeten Primer sind in Tabelle 4.5 dargestellt.

Die Bestimmung der C_t -Werte (*cycle threshold*) erfolgte mit Hilfe der Rotor Gene Q Software. Mittels der Messung von Referenzgenen wurde durch die Berechnung eines Normalisierungsfaktors der drei stabilsten Referenzgene durch die Software GeNorm die relative mRNA-Konzentration der Zielgene berechnet (Tab. 4.6).

Tab. 4.5: Eigenschaften der verwendeten Primer

Gen	Primersequenz		Produktgröße (bp)	Annealingtemperatur (°C)	NCBI Gene Bank
Referenzgene					
ATP5G1	For: CAGTCACCTTGAGCCGGGCGA	Rev: TAGCGCCCCGGTGGTTTGC	94	64	NM_001025218.2
GPI	For: CACGAGCACCGCTCTGACCT	Rev: CCACTCCGGACACGCTTGCA	365	64	NM_214330.1
RPS9	For: GTCGCAAGACTTATGTGACC	Rev: AGCTTAAAGACCTGGGTCTG	327	60	XM_005664825.1
ACTB	For: GACATCCGCAAGCACCTCTA	Rev: ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	205	60	XM_003124280-3
SDHA	For: CTACGCCCCCGTCGCAAAGG	Rev: AGTTTGCCCCCAGGCGGTTG	380	64	DQ402993
Zielgene					
SOD	For: TCCATGTCCATCAGTTTGGA	Rev: CTGCCCAAGTCATCTGGTTT	250	60	NM_001190422.1
TXNR1	For: CTTTACCTTATTGCCCGGGT	Rev: GTTCACCGATTTTGTGGCC	162	60	NM_214154.2
GPX1a	For: GGCACAACGGTGCGGGACTA	Rev: AGGCGAAGAGCGGGTGAGCA	235	60	NM_214201.1
CYP1A1	For: CTGCCATCTTCTGCCTTGTA	Rev: GCTCTGGCCATTAGAGATCA	314	60	NM_214412.1

Gen	Primersequenz		Produktgröße (bp)	Annealingtemperatur (°C)	NCBI Gene Bank
HO-1	For: AGCTGTTTCTGAGCCTCCAA	Rev: CAAGACGGAAACACGAGACA	130	60	NM_001004027.1
NQO1	For: CCAGCAGCCCGGCCAATCTG	Rev: AGGTCCGACACGGCGACCTC	160	60	NM_001159613.1
PRDX6	For: GGCCGCATCCGTTTCCACGA	Rev: ACTGGATGGCAAGGTCCCGACT	280	60	NM_214408.1
UGT1A1	For: GATCCTTTCCTGCAACGCAT	Rev: GGAAGGTCATGTGATCTGAG	313	60	XM_003483779.1
SULT1A1	For: GAGATTCAGAAGATCCTGGAG	Rev: TCACAGCTCAGAGCGGAAG	282	60	NM_213765.1
SULT1B1	For: CCAAAGCAAGAAATTAAGAAGAT	Rev: GCATGAAAGGGGATTTGCTG	172	60	XM_003356955.1
SULT2A1	For: TCTGCCTGATTCTCTCCAAG	Rev: CTTGGCCTTGGACTTGAAGA	185	60	NM_001037150.1
MGST1	For: TTGGCGCGCGAATCTACCACA	Rev: TCCTCGGCTCCCTTCCCACTTA	239	60	NM_214300.1
GST	For: CCCAGCCTGCTGGCCAACTT	Rev: TGTCTGGGACACTCAGCCG	183	60	NM_214389.1
CYP2A19	For: CTTCAAAGGCTATGGCGTGG	Rev: GACATTGGAAACCGTTCGGC	214	60	NM_214417.1
CYP2E1	For: TCTCCATCTGGAAGCACATC	Rev: TAGTGGAGCAAGACCTCCTT	220	60	NM_214421.1

Gen	Primersequenz	Produktgröße (bp)	Annealingtemperatur (°C)	NCBI Gene Bank
CYP1A2	For: TCAAAGGCTCCTGCAATTCC Rev: AGGTTGATGGTCTTCTCCTG	159	60	NM_001159614.1

ATP5G1 = ATP-Synthase; GPI = Glucose-6-Phosphat-Isomerase; RPS9 = Ribosomal Protein 9; ACTB = β -Actin; SDHA = Succinat-Dehydrogenase; SOD = Superoxiddismutase; TXNR1 = Thioredoxinreduktase; GPX1a = Glutathionperoxidase 1a; CYP1A1 = Cytochrom P 450 1A1; HO-1 = Hänoxigenase 1; NQO1 = NADPH-Dehydrogenase; PRDX6 = Peroxiredoxin; UGT1A1 = Uridindiphosphatglucuronyltransferase 1A1; SULT1A1 = Sulfotransferase 1A1; SULT1B1 = Sulfotransferase 1B1; SULT2A1 = Sulfotransferase 2A1; MGST1 = mikrosomale Glutathion-S-Transferase; GST = Glutathion-S-Transferase; CYP2A19 = Cytochrom P 450 2A19; CYP2E1 = Cytochrom P 450 2E1; CYP1A2 = Cytochrom P 450 1A2; For = forward; Rev = reverse; bp = Basenpaare

Tab. 4.6: Durchschnittliche Expressionsstabilität der drei stabilsten Referenzgene

Gen	NCBI Gene Bank	M-Value
ACTB	NM_001167795	0,155
ATP5G1	NM_001025218.1	0,120
GPI	NM_214330.1	0,119

Das M-Value wurde mit der auf Microsoft Office Excel basierenden GeNorm Software berechnet; ACTB = β -Actin; ATP5G1 = ATP-Synthase; GPI = Glucose-6-Phosphat-Isomerase;

Anhand einer Verdünnungsreihe wurde die Effizienz der Primer bestimmt, d.h. es wurde überprüft, ob durch den jeweiligen Primer die Menge an doppelsträngiger DNA pro Zyklus verdoppelt werden kann. Dazu wurde ein cDNA-Pool hergestellt, der entsprechend 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 und 1:243 mit DEPC-Wasser verdünnt wurde. Mittels eines logarithmischen Kurvendiagramms der ermittelten C_T -Werte wurde die Effizienz der Primer mit folgender Formel berechnet:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Ein Wert von 2,00 stellt ein optimales Ergebnis dar. In Tabelle 4.7 ist die Effizienz der verwendeten Primer dargestellt.

Tab. 4.7: Effizienz der verwendeten Primer

Gen	Steigung	R ²	Effizienz
ATP5G1	-3,66	0,997	1,88
GPI	-3,83	0,990	1,83
RPS9	-3,63	0,998	1,88
ACTB	-3,57	0,996	1,91
SDHA	-3,45	0,978	1,95
SOD	-3,89	0,998	1,81
TXNR1	-4,28	0,945	1,71
GPX1a	-3,72	0,999	1,86
CYP1A1	-3,56	0,623	1,98
HO-1	-3,78	0,995	1,84
NQO1	-3,26	1,000	2,03
PRDX6	-3,42	0,998	1,96
UGT1A1	-3,15	0,989	2,08
SULT1A1	-3,57	0,995	1,91
SULT1B1	-3,59	0,996	1,90
SULT2A1	-3,69	0,999	1,87
GST-1	-3,66	0,998	1,88
GST	-4,09	0,998	1,76
CYP2A19	-3,37	0,999	1,98
CYP2E1	-4,03	0,999	1,77
CYP1A2	-3,58	0,998	1,90

ATP5G1 = ATP-Synthase; GPI = Glucose-6-Phosphat-Isomerase; ACTB = β -Actin; RPS9 = Ribosomal Protein 9; SDHA = Succinat-Dehydrogenase; SOD = Superoxiddismutase; TXNR1 = Thioredoxinreduktase; GPX1a = Glutathionperoxidase 1a; CYP1A1 = Cytochrom P 450 1A1; HO-1 = Hämoxygenase 1; NQO1 = NADPH-Dehydrogenase; PRDX6 = Peroxiredoxin; UGT1A1 = Uridindiphosphatglucuronyltransferase 1A1; SULT1A1 = Sulfotransferase 1A1; SULT1B1 = Sulfotransferase 1B1; SULT2A1 = Sulfotransferase 2A1; GST-1 = mikrosomale Glutathion-S-Transferase; GST = Glutathion-S-Transferase; CYP2A19 = Cytochrom P 450 2A19; CYP2E1 = Cytochrom P 450 2E1; CYP1A2 = Cytochrom P 450 1A2

4.6.5 DNA-Gelelektrophorese

Mittels einer DNA-Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte auf ihre Größe und Qualität überprüft. Es wurden 1,5 %ige Agarosegele verwendet. 2,25 g Agarose wurde eingewogen und mit 150 ml 1x TAE-Puffer versetzt. Die Lösung wurde aufgekocht bis das Gel klar war und auf 65 °C abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurden 3 µl GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain hinzu pipettiert. Das ausgehärtete Gel wurde für ca. 30 min in 1x TAE-Puffer äquilibriert. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 4 µl 5x Green GoTaq® Flexi Buffer (Gelladepuffer) versetzt. Nach dem Auftragen der Proben wurde die DNA-Gelelektrophorese bei 120 V durchgeführt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht.

4.6.6 Nuklearextraktion

Für die Nuklearextraktion wurde das Nuclear Extract Kit von Active Motif verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen.

150 mg Lebergewebe wurde eingewogen und mit 1x Hypotonic Buffer (3 ml/g Gewebe), angereichert mit 3 µl/g Dithiothreitol (DTT) und 3 µl/g Detergent, versetzt. Das Gewebe wurde mit dem Tissue Lyser homogenisiert und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 850 g 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues, gekühltes Eppendorf-Tube überführt und für die spätere Poolung der zytoplasmatischen Fraktion auf Eis aufbewahrt.

Zur Gewinnung der zytoplasmatischen Fraktion wurde das resultierende Pellet vorsichtig mit 500 µl Hypotonic Buffer resuspendiert, in ein neues Eppendorf-Tube überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Zu jeder Probe wurden 25 µl Detergent hinzugefügt und bei stärkster Einstellung 10 sek gevortext. Nach einer 30 sekündigen Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und in das Eppendorf-Tube, welches nach der ersten Zentrifugation aufbewahrt wurde, hinzugefügt (entspricht der zytoplasmatischen Fraktion). Die zytoplasmatische Fraktion wurde bei -80 °C gelagert.

Zur Gewinnung der nukleären Fraktion wurde das resultierende Pellet mit 50 µl Complete Lysis Buffer resuspendiert und 10 sek stark gevortext. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 150 rpm auf einem Schüttler wurde erneut 30 sek stark gevortext. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C

und der Überstand (entspricht der nukleären Fraktion) wurde in ein neues, gekühltes Eppendorf-Tube überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.6.7 Proteinbestimmung mit dem BC Assay Protein Quantitation Kit

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem BC Assay Protein Quantitation Kit von Uptima nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay, bei dem Cu^{2+} -Ionen durch Proteine in einem alkalischen Medium zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Der Assay beruht auf einer Farbkomplexbildung zwischen der Bicinchoninsäure und den Cu^+ -Ionen, dessen Absorption gemessen werden kann. Über eine Referenzkurve eines Standardproteins kann die Konzentration der zu bestimmenden Proteine berechnet werden. Dazu wurde zunächst eine Standardreihe mit fetalem Kälberserum (BSA) in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (0, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g/ml}$). Je 25 μl der Standards und der zuvor entsprechend verdünnten Proben wurden in einer Doppelbestimmung in die Kavitäten einer 96-Wellplatte pipettiert und 200 μl der Reaktionslösung (BCA: CuSO_4 = 50:1, v:v) hinzugefügt. Anschließend wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Mit dem Plattenreader TECAN infinite M200 wurde ein Absorptionsscan im Wellenlängenbereich von 540 nm bis 595 nm gemessen. Die Extinktion bei 562 nm ist proportional zur Proteinkonzentration. Die photometrische Messung erfolgte demnach bei 562 nm und mit Hilfe der Standardgeraden konnte die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

4.6.8 Elektrophoretischer Mobilitäts Shift Assay

Mit einem elektrophoretischen Mobilitäts Shift Assay (EMSA) können RNA- und DNA-bindende Proteine nachgewiesen werden. Die Methode beruht darauf, dass DNA-Protein-Komplexe durch Elektrophorese ein Polyacrylamidgel aufgrund des höheren Molekulargewichts langsamer durchlaufen als freie DNA-Moleküle. Bei einem EMSA werden DNA-Sequenzen markiert, an die das zu untersuchende Protein bindet. Diese Bindung kann mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dieser Methode die Nrf2-Bindungsaktivität untersucht.

Nrf2 liegt inaktiv im Zytosol gebunden an das Keap1 Protein vor. Durch einen entsprechenden Stimulus, wie ROS oder inflammatorische Zytokine wird Nrf2 aus dieser Bindung freigesetzt und transloziert in den Nukleus, um dort an ein sogenanntes *antioxidative response element* (ARE) seiner Zielgene zu binden, wodurch deren Transkription initiiert wird. Diese Bindungsreaktion kann mittels EMSA im Kernextrakt der Leberproben nachgewiesen werden.

Für die Durchführung des EMSA wurde das DIG Gel Shift Kit und das DIG Wash and Block Buffer Kit der Firma Roche genutzt und nach Herstellerangaben vorgegangen.

4.6.8.1 Hybridisierung der Oligonukleotide

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4.8 dargestellt. Da nur doppelsträngige Nukleotide an nukleäre Proteine binden, mussten die Einzelstrang-Nukleotide hybridisiert werden. Dazu wurden jeweils 20 µl der komplementären Oligonukleotide (100 ng/µl in TNE-Puffer) zusammen pipettiert und 10 min bei 95 °C inkubiert. Während des langsamen Abkühlens auf RT erfolgte die Hybridisierung. 2 µl des Mixes (200 ng) wurden entnommen und mit 8 µl sterilem H₂O versetzt.

Tab. 4.8: Eigenschaften der verwendeten Oligonukleotide für den EMSA

Gen	Sequenz	NCBI Gene Bank
<i>Schwein</i>		
pigNQO1- ARE-F:5'	CTACGTCTAGTCACAGTGA CTCAGCGAGATTCTGA	NM_001159613
pigNQO1- ARE-R:5'	TCAGAATCTCGCTGAGTCA CTGTGACTAGACGTAG	
<i>Mensch</i>		
hNQO1- ARE-F:5'	AAATCCGCAGTCACAGTGA CTCAGCAGAATCTGAG	NM_001025434
hNQO1- ARE-R:5'	CTCAGATTCTGCTGAGTCA CTGTGACTGCGGATT	

NQO1 = NADPH-Dehydrogenase; ARE = *antioxidative responsive element*

4.6.8.2 Markierung der Oligonukleotide mit Digoxigenein-11-ddUTP

Um die Banden später mittels Chemilumineszenz sichtbar machen zu können, mussten die Oligonukleotide markiert werden. Dies erfolgte mit Digoxigenin-ddUTP. 10 µl der doppelsträngigen Oligonukleotide wurden mit 4 µl 5x Markierungspuffer, 4 µl CoCl₂ Lösung, 1 µl DIG-ddUTP Lösung und 1 µl terminale Transferase (50 Units) versetzt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8) gestoppt. Um eine Endkonzentration von 8 ng/µl zu erhalten, wurden 3 µl steriles H₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl hinzu pipettiert. Die markierte DNA wurde anschließend 1:10 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

4.6.8.3 Gelelektrophorese und Blotting

Für die Nrf2/ARE-Bindungsreaktion wurde ein 6 %iges Polyacrylamidgel hergestellt. Dazu wurden 4,5 ml Polyacrylamid mit 24 ml sterilem H₂O, 1,5 ml 10x TBE, 300 µl 10 % APS und 30 µl TEMED versetzt.

Insgesamt 70 µg Protein pro Behandlungsgruppe wurden eingesetzt. Jede Probe wurde mit 4 µl Bindungspuffer, 1 µl Poly d(I-C) und 1 µl Poly L-Lysin versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 3 µl der markierten, 1:10 verdünnten DNA (2,4 ng) wurden die Proben 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Ladepuffer hinzu pipettiert und die Proben unmittelbar auf das Gel aufgetragen.

Zum spezifischen Nachweis der Nrf2/ARE-Bindung wurde eine Kompetition durchgeführt. Dazu wurden Proben aus jeder Behandlungsgruppe vor der eigentlichen Aufbereitung für den EMSA zuerst mit unmarkierter, humaner, doppelsträngiger DNA im 100-fachen Überschuss mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Probenaufbereitung wie oben beschrieben. Als Positiv-Kontrolle diente markierte, humane DNA. Die Negativ-Kontrolle enthielt kein Nuklearextrakt. Die Elektrophorese erfolgte in 0,5x TBE-Puffer bei 85 V. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proben in 0,5x TBE-Puffer bei 300 mA und einer Inkubationszeit von 60 min auf eine positiv geladene Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend erfolgte ein 3 minütiges *cross-linking* unter UV-Licht. Nach einem 2 stündigen Backvorgang bei 80 °C wurde die Membran 5 min in 20 ml 1x Waschpuffer gewaschen und anschließend für 60 min in 20 ml 1x Blockpuffer inkubiert. Nach der Blockierung wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 30 ml 1x Blockpuffer und 3 µl anti-DIG-AP Fab Fragment (polyclonal sheep, Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragment konjugiert mit alkalischer Phosphatase) inkubiert. Danach wurde die Membran zwei Mal 15 min mit 20 ml 1x Waschpuffer bei RT gewaschen.

4.6.8.4 Detektion mittels Chemilumineszenz

Damit die Banden sichtbar gemacht werden konnten, wurde die Membran 5 min in 7 ml 1x Detektionspuffer inkubiert und anschließend 5 min bei RT in 3 ml 1x Detektionspuffer und 30 µl Substrat Disodium 3-(4-methoxy-spiro {1, 2-dioxetane-3, 2-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphat (CSPD). Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 37 °C konnte die Membran mit dem G:Box-System

(Lumineszenzimager, SYNGENE) und dem GeneSnap Programm (SYNGENE) betrachtet und analysiert werden.

Es wurden pro durchgeführten EMSA jeweils 3 Tiere pro Gruppe gepoolt und auf das Gel aufgetragen.

4.6.9 Präparierung der verschiedenen Zellfraktionen

4.6.9.1 Mikrosomenfraktion

Für die Bestimmung der CYP2E1-Proteinexpression und -aktivität wurde die mikrosomale Fraktion der Leberproben benötigt. Ca. 150 mg Leber wurde eingewogen, mit 500 µl Homogenisationspuffer versetzt und im Tissue Lyser bei 30 Hz 10 min homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 4 °C und 10.000 g für 20 min zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C und 100.000 g für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer (0,05 mM Tris-HCl; 20 % Glycerol; 1 mM EDTA; 0,25 M Sucrose; pH 7,4) resuspendiert und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C eingefroren. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Kit, wie unter Punkt 4.6.7 bereits beschrieben, bestimmt.

4.6.9.2 Zytoplasmatische Fraktion

Für den SULT1A1- und SULT2A1-Assay und für die Proteinexpression der SULT2A1 wurde ebenfalls ca. 150 mg Leber eingewogen, mit 650 µl Homogenisationspuffer versetzt und im Tissue Lyser bei 30 Hz 10 min homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde für 60 min bei 4 °C und 105.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (entspricht der zytoplasmatischen Fraktion) entnommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Kit wie unter Punkt 4.6.7 beschrieben, bestimmt.

4.6.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteingemische innerhalb eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Während der Elektrophorese wandern die Proteine durch die Poren eines Polyacrylamidgels. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Proteinexpression des CYP2E1 und der SULT2A1 untersucht. Für SULT1A1 konnte kein geeigneter Antikörper gefunden werden. Für den Nachweis von CYP2E1 wurden 10 %ige- und für den Nachweis von SULT2A1 12,5 %ige Trenngele verwendet. CYP2E1 wurde in der mikrosomalen Fraktion und SULT2A1 in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen. Das 10 %ige Trenngel setzte sich aus 1,25 ml Acrylamid, 1,25 ml Trenngelpuffer, 2,45 ml Reinstwasser, 50 µl SDS, 50 µl APS und 2 µl TEMED zusammen, das 12,5 %ige aus 1,562 ml Acrylamid, 1,25 ml Trenngelpuffer, 2,138 ml Reinstwasser, 50 µl SDS, 50 µl APS und 2 µl TEMED. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Sammelgel, bestehend aus 150 µl Acrylamid, 375 µl Sammelgelpuffer, 950 µl Reinstwasser, 15 µl SDS, 15 µl APS und 2 µl TEMED, auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach dem Aushärten der Gele wurde die Elektrophoresekammer mit SDS-Laufpuffer befüllt und die Proben in die Taschen der Gele appliziert. Die Proben wurden zuvor mit dem entsprechenden Puffer verdünnt, so dass in jede Tasche 30 µg Protein geladen werden konnte. Außerdem wurden die Proben mit je 5 µl Probenauftragpuffer (Roti-Load®) versetzt, der die Proteine neutralisiert und damit eine Auftrennung nach der Ladung verhindert. Damit die Proteine der Größe nach aufgetrennt werden können, wurden sie für 5 min bei 95 °C denaturiert. Um nach dem durchgeführten Western Blot die entsprechenden Proteine zu identifizieren, wurden zwei Marker mitgeführt, die jeweils am Rand der Gele aufgetragen wurden (Broad Range Protein Molecular Weight Markers und PageRuler™ Prestained Protein Ladder). Die Auftrennung der Proben erfolgte im Sammelgel bei 100 V und 12 mA und wurde im Trenngel auf 200 V und 20 mA hochgestellt.

4.6.11 Western Blot

Mittels Western Blot können bestimmte Proteine aus dem in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemisch immunologisch nachgewiesen werden, indem sie auf eine Trägermembran übertragen werden, die mit spezifischen Antikörpern inkubiert wird. Nach der Auftrennung der Proben wurde das Gel aus der Apparatur gelöst und das Tank Blot System (BIO Rad Mini Trans-Blot® Cell) nach Herstellerangaben,

bestehend aus Fiber Pads, einer Nitrocellulosemembran (Bio Trace™ NT), Blotpapier und dem Gel, zusammengesetzt. Die genannten Komponenten wurden zuvor in frisch hergestelltem Transferpuffer getränkt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte für 1,5 h bei 100 V und 300 mA.

Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers der Proteine auf die Membranen wurden die Membranen für 2 min mit Ponceau S angefärbt. Damit alle freien Bindungsstellen auf den Membranen blockiert wurden, wurden die Membranen für ca. 1 h bei RT mit 5 % Milchpulver in TBST inkubiert. Nach einem drei mal 10-minütigen Waschschrift mit TBST, wurden die entsprechenden Antikörper auf die Membranen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Hybridisierung des ersten Antikörpers wurden die Membranen erneut drei Mal 10 min mit TBST gewaschen und anschließend für 1,5 h bei RT mit den entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert. Die Eigenschaften der verwendeten Antikörper sind Tabelle 4.9 zu entnehmen. Bevor die Membranen mit dem ECL-Kit (ECL Advance Western Blotting Detection Kit) für 5 min entwickelt wurden, wurden sie zunächst gründlich mit TBST gewaschen. Die Entwicklung beruht auf einer Chemilumineszenz-Reaktion. Eine an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase setzt ein in der ECL-Lösung enthaltenes Substrat um und emittiert Licht. Mit dem G:Box (Lumineszenzimager, SYNGENE) und dem Programm Gene Snap (SYNGENE) wurden die Membranen betrachtet und mit dem Programm Gene Tools (SYNGENE) ausgewertet. Für die Auswertung wurden die Membranen mit β -Actin (ACTB) inkubiert, einem Referenzprotein, das durch die Behandlungen unverändert bleibt.

Tab. 4.9: Eigenschaften der verwendeten Antikörper für den Western Blot

Protein	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
CYP2E1 (ca. 65 kDa)	Rabbit polyclonal anti-CYP2E1 (H-21) (sc-133491) 1:200	Anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004) 1:10.000
SULT2A1 (ca. 30 kDa)	Goat polyclonal anti-SULT2A1 (C-13) (sc-46528) 1:200	Anti-goat IgG-HRP (sc-2020) 1:10.000
ACTB (ca. 42 kDa)	Mouse monoclonal anti- β -Actin (ab6276) 1:5000	Anti-mouse IgG-HRP (ab6944) 1:10.000

sc = Santa Cruz Biotechnology, Inc. Deutschland; ab = Abcam, Cambridge, England; CYP = Cytochrom P450; SULT = Sulfotransferase; ACTB = β -Actin

4.6.12 Enzymaktivitätsmessungen mittels HPLC

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die verschiedenen polyphenolhaltigen Futterzusätze einen Einfluss auf die Aktivität bestimmter Enzyme des hepatischen Fremdstoffmetabolismus ausüben, wurde die Aktivität des CYP2E1, der SULT1A1 und der SULT2A1 mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) in den Leberproben der Eber gemessen.

4.6.12.1 CYP2E1-Assay

Die katalytische Aktivität von CYP2E1 kann durch die Hydroxylierung von *p*-Nitrophenol zu *p*-Nitrocatechol bestimmt werden. Dabei wurde wie bei Zamaratskaia *et al.* (2007) beschrieben vorgegangen (Abb. 4.1).

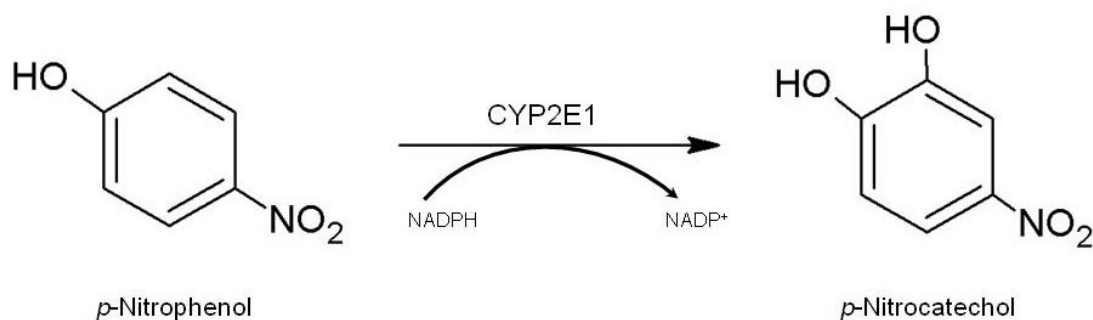


Abb. 4.1: Prinzip der CYP2E1-Reaktion

Nach Zamaratskaia *et al.* (2007)

Vor der Durchführung des Assays wurde für die Konzentrationsbestimmung des gebildeten *p*-Nitrocatechols in den Proben ein *p*-Nitrocatechol-Standard hergestellt. Dazu wurden zwei Stammlösungen angesetzt. 0,0498 g *p*-Nitrocatechol wurde in 25 ml Phosphatpuffer (analog zu den Proben) gelöst. Die Konzentration betrug demnach 1,992 mg/ml. Aus dieser Stammlösung wurde eine 1:20 Verdünnung hergestellt, so dass eine Konzentration von 99,6 µg/ml vorlag. Eine Kalibrierungskurve für die Auswertung des gebildeten *p*-Nitrocatechols wurde mit 1:50, 1:100, 1:200 und 1:400 Verdünnungen erstellt.

Vor dem Start des Assays wurde zunächst mit Testproben die optimale Proteinmenge und Inkubationszeit bestimmt. 0,1 mg, 0,2 mg bzw. 0,5 mg mikrosomales Protein (Gewinnung der Mikrosomenfraktion siehe Kapitel 4.6.9.1) wurde bei einem Endvolumen von 250 µl mit dem Inkubationspuffer (0,1 M Kaliumphosphat; 0,2 mM *p*-Nitrophenol; 1,0 mM NADPH; pH 6,8) versetzt. NADPH wurde erst zum Starten der Reaktion dazu gegeben. Nach Zugabe von NADPH wurden die Proben 15, 30 oder 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl 40 % Trichloressigsäure gestoppt. Anschließend wurde für 15 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Analyse in einer HPLC-Anlage entnommen und in ein Mikrovial für 200 µl pipettiert. Es wurde das LaChrom Elite® HPLC-System eingesetzt (Tab. 4.10). Bei einer Wellenlänge von 345 nm kann *p*-Nitrocatechol gemessen werden. Zur Messung von *p*-Nitrocatechol wurde ein UV-VIS Detektor (L-4250, LaChrom) verwendet. Als Fließmittel diente 0,1 % Trifluoressigsäure in 25 % Acetonitril. Die Flussrate wurde auf 1,0 ml/min eingestellt. 50 µl pro Probe wurden jeweils injiziert und bei 70 bar und 25 °C analysiert. Die gesamte Analysenzeit betrug 4 min. Nach einer Retentionszeit von 1,67 min konnte die Peakfläche von *p*-Nitrocatechol gemessen werden. Die Auswertung erfolgte über das Programm EZChrom Elite Version 3.3.1. Abbildung 4.2 zeigt ein beispielhaftes Chromatogramm des Standards und einer Testprobe.

Tab. 4.10: Verwendete Geräte der HPLC-Anlage für den CYP2E1-Assay

HPLC Komponenten	
Pumpe	L-7100 (LaChrom)
Säulenofen	Jet Stream Plus
Autosampler	L-7200 (LaChrom)
Detektor	UV-VIS Detector L-4250 (LaChrom)
	Wellenlänge: 345 nm
Säule	Hypersil ODS Säule 3µm, 60 mm-4,6 mm (MZ-Analysentechnik, 60.4,6.6043.N)
Vorsäule	HPLC LiChrospher-Kartusche RP 18e (5µm) 4 mm-4 mm

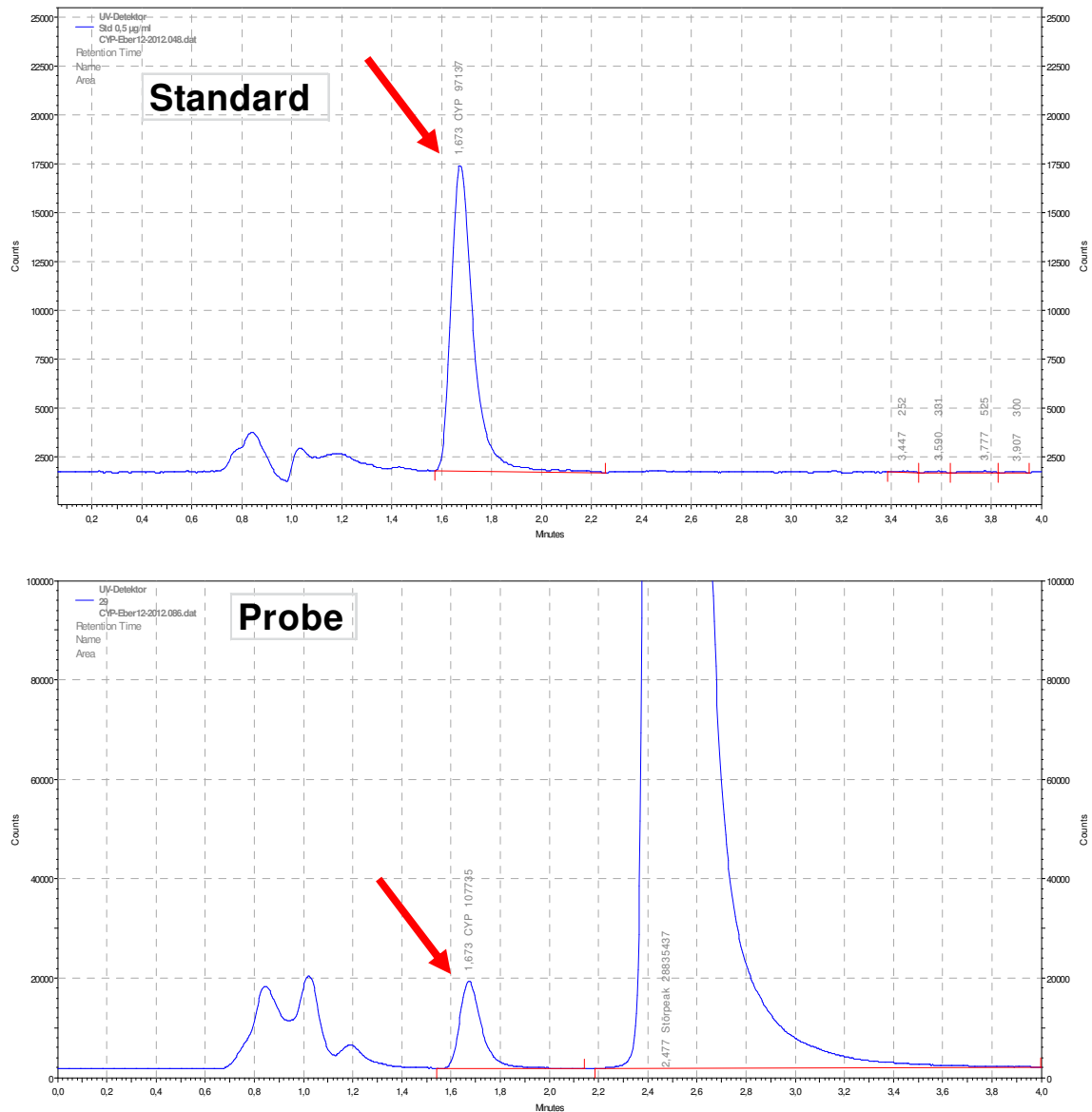


Abb. 4.2: Beispielhaftes Chromatogramm der HPLC-Analyse zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität in der mikrosomalen Leberfraktion von Ebern

Die eingezeichneten Pfeile zeigen den Retentionspeak von *p*-Nitrocatechol.

Beim Vergleich der ermittelten Aktivitäten der Testproben zeigte sich, dass 0,2 mg mikrosomales Protein und 15 min Inkubationszeit für den Assay geeignet sind.

Für die Durchführung des Assays wurden alle Proben auf eine Proteinmenge von 0,2 mg eingestellt und 15 min, wie oben beschrieben, inkubiert. Zur Überprüfung der Qualität der Methode wurden aus einer Leberprobe drei Inkubationsansätze erstellt und der Variationskoeffizient (VK) bestimmt (Tab. 4.11). Es wurde ein Variationskoeffizient (VK) von 2,9 % ermittelt.

Tab. 4.11: Qualitätsüberprüfung des CYP2E1-Assay - Dreifacher Ansatz aus einer Leberprobe

	Aktivität in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein/h	MW $\pm$ SD	VK
Inkubation 1	8,73	8,99 $\pm$ 0,26	2,9 %
Inkubation 2	9,01		
Inkubation 3	9,25		

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient

4.6.12.2 SULT1A1-Assay

Die katalytische Aktivität der Sulfotransferasen, in der vorliegenden Arbeit die der SULT1A1 und der SULT2A1, kann durch die Spaltung von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) zu 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat (PAP) mittels HPLC bestimmt werden (Xu *et al.* 2012). Das Prinzip der Reaktion veranschaulicht Abbildung 4.3.

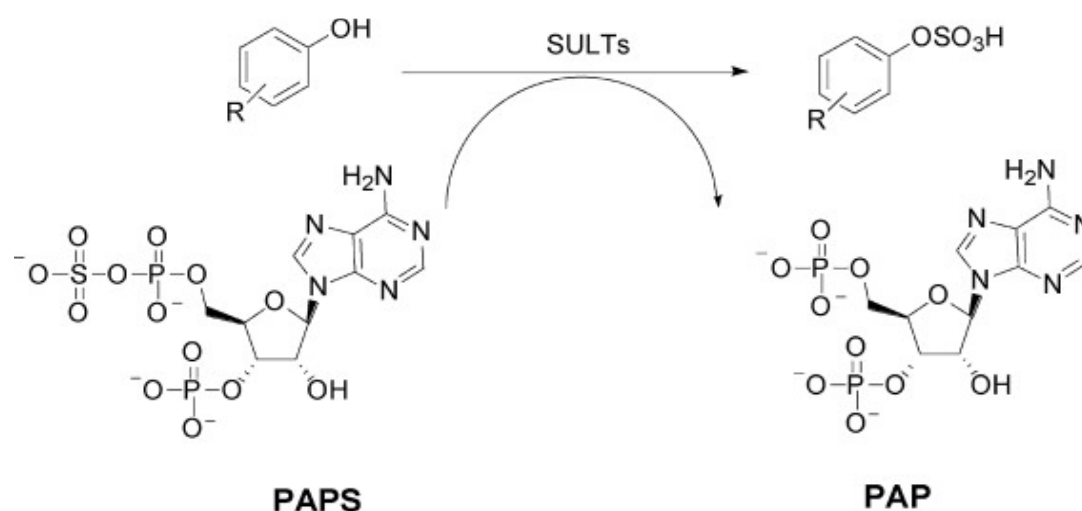


Abb. 4.3: Prinzip der Sulfotransferasen-Reaktion

Nach Xu *et al.* (2012)

Für die Messung der SULT1A1-Aktivität wurde das spezifische Substrat 2-Naphtol verwendet. Ist 2-Naphtol anwesend, spaltet SULT1A1 PAPS zu PAP und es entsteht

2-Naphtylsulfat. Über den Verbrauch von PAPS kann die SULT1A1-Aktivität bestimmt werden.

Zunächst wurde eine Stammlösung aus PAP hergestellt. 10 mg wurden in 1 ml Reinstwasser gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 23 mM. Aus dieser Stammlösung wurde eine 1:100 Verdünnung im Inkubationspuffer ohne Substrat hergestellt. Aus der Verdünnung wurde eine Kalibrierungskurve mit den Verdünnungen 1:25, 1:37,5, 1:50, 1:70 und 1:100 erstellt. Die Kalibration von PAP muss im selben Inkubationspuffer, der für die Proben verwendet wird, erfolgen, weil PAPS laut Herstellerangaben nur zu 60 % rein ist und der Inkubationspuffer deswegen bereits PAP enthält. Bevor der Assay mit allen Proben durchgeführt wurde, wurde die einsetzbare Proteinmenge getestet.

Vor Start der Reaktion wurde der Inkubationspuffer (50 mM PO_4 , 250 mM Sucrose, pH 6,2) mit PAPS (10 μM) und 2-Naphtol (100 μM) versetzt. Anschließend wurden 50 bzw. 100 μg zytosolisches Protein (Gewinnung siehe Kapitel 4.6.9.2) mit dem Inkubationspuffer auf ein Gesamtvolumen von 250 μl gebracht und für 30 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde 250 μl eiskalter Methanol hinzu pipettiert. Die Proben wurden sofort bei 4 °C für 10 min bei 12.000 g zentrifugiert und der Überstand in Mikrovials für die HPLC-Analyse überführt. Für die Analyse wurde das LaChrom Elite®HPLC-System genutzt (Tab. 4.12). PAP kann bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen werden. Für die Ermittlung von PAP wurde ein UV-VIS Detektor (L-4250, LaChrom) verwendet. Das Fließmittel bestand aus 75 mM KH_2PO_4 , 100 mM NH_4Cl , 1 mM 1-Octylamin (pH 4,55) und Methanol (85/15, v/v). Die Flussrate betrug für 5 min 1,2 ml, wurde von 5,1-15 min auf 2 ml erhöht und von 15,1-20 min wieder auf 1,2 ml/min verringert. Es wurden 50 μl pro Probe eingespritzt. Bei einer Flussrate von 1,2 ml/min ergab sich ein Druck von 118 bar, bei einer Flussrate von 2 ml/min ergab sich ein Druck von 206 bar. Die Temperatur des Säulenofens betrug 30 °C. Die gesamte Analyse dauerte 20 min. Nach einer Retentionszeit von 3,1 min konnte die Peakfläche für PAP gemessen werden. Die Auswertung erfolgte über die Standardkurve von PAP über das Programm EZChrom Elite Version 3.3.1. Abbildung 4.4 zeigt ein beispielhaftes Chromatogramm des Standards und einer Testprobe.

Tab. 4.12: Verwendete Geräte der HPLC-Anlage für den SULT1A1-Assay

HPLC Komponenten	
Pumpe	L-7100 (LaChrom)
Säulenofen	Jet Stream Plus
Autosampler	L-7200 (LaChrom)
Detektor	UV-VIS Detector L-4250 (LaChrom) Wellenlänge: 254 nm
Säule	Phenomex (00F-4605-E0) Kinetex 5u XB-C18 100A; 150x4,6mm
Vorsäule	HPLC LiChrospher-Kartusche RP 18e (5µm) 4 mm-4 mm

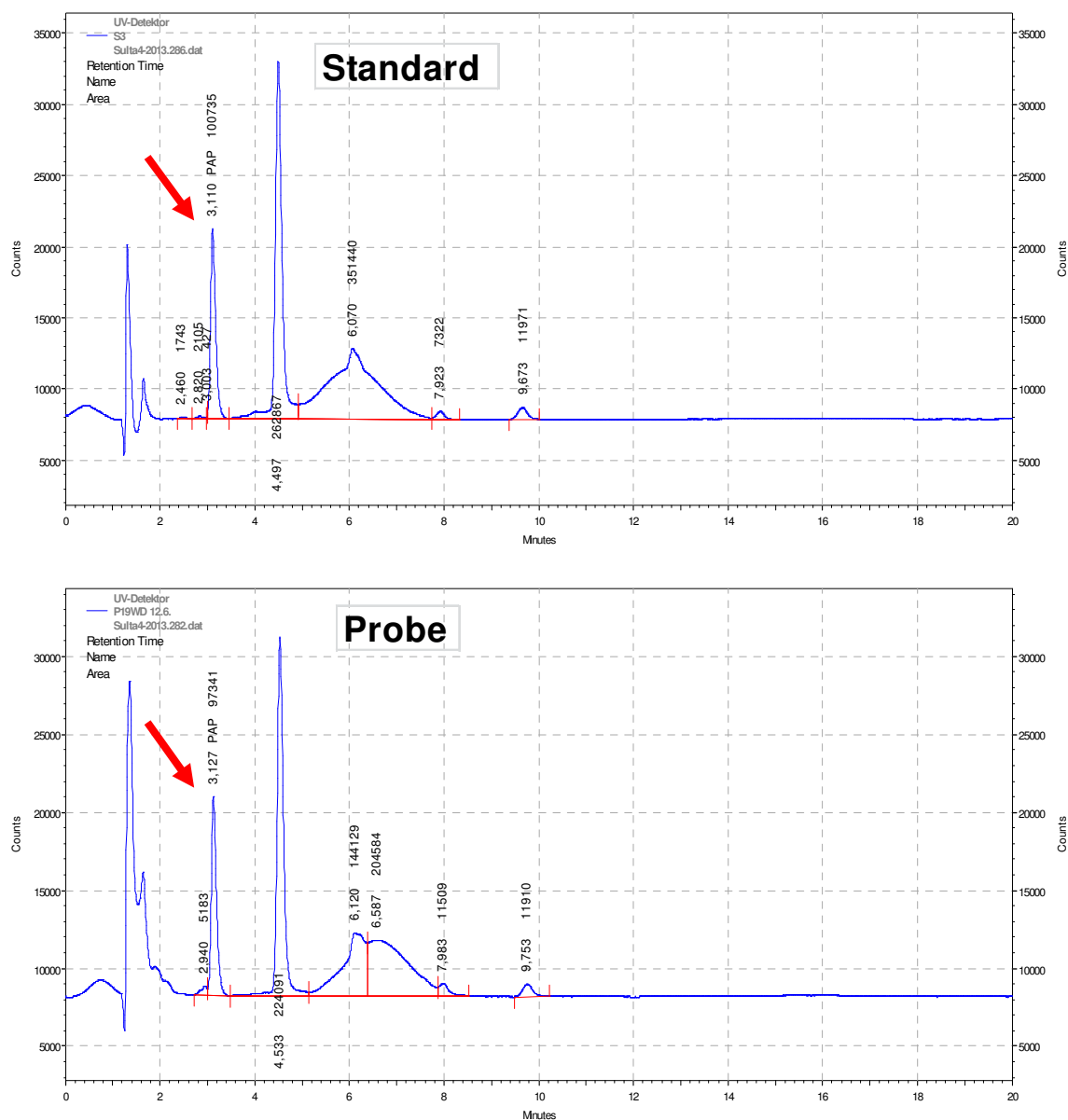


Abb. 4.4: Beispielhaftes Chromatogramm der HPLC-Analyse zur Bestimmung der SULT1A1-Aktivität im Leberzytosol von Ebern

Die eingezeichneten Pfeile zeigen den Retentionspeak von PAP.

Im Vergleich der eingesetzten Proteinmenge zeigte sich, dass 50 µg Protein für die Reaktion ausreichend sind

Alle Proben wurden auf einen Proteingehalt von 50 µg eingestellt und wie oben beschrieben 30 min inkubiert und analysiert. Zur Qualitätsüberprüfung der Messung wurde aus einer Probe ein dreifacher Inkubationsansatz erstellt und ein VK von 9,2 % ermittelt (Tab. 4.13). Zur Stabilitätsüberprüfung der inkubierten Proben wurden bereits inkubierte und gemessene Proben für 24 h bei -20 °C eingefroren und erneut gemessen. Hier zeigten sich keine Abweichungen in den Messwerten.

Tab. 4.13: Qualitätsüberprüfung des SULT1A1-Assay - Dreifacher Ansatz aus einer Leberprobe

	Aktivität in $\mu\text{mol/mg/h}$		MW $\pm$ SD	VK
Inkubation 1	107	}	117 $\pm$ 10,9	9,2 %
Inkubation 2	118			
Inkubation 3	128			

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient

4.6.12.3 SULT2A1-Assay

Für die Messung der SULT2A1-Aktivität wurde das spezifische Substrat Dehydroepiandrosteron (DHEA) verwendet. Bei Anwesenheit von PAPS wird DHEA durch SULT2A1 zu Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) umgewandelt. Über den Verbrauch von PAPS kann die SULT2A1-Aktivität bestimmt werden. Auch hier wurde methodisch nach Xu *et al.* (2012) vorgegangen.

Wie im SULT1A1-Assay wurde die PAP-Stammlösung (23 mM) genutzt und eine Verdünnungsreihe mit einer 1:25, 1:37,5, 1:50, 1:70 und 1:100 Verdünnung hergestellt. Auch hier erfolgte die Kalibration von PAP im Inkubationspuffer ohne Substrat. Vor Start der Reaktion wurde der Inkubationspuffer (50 mM PO_4 , 250 mM Sucrose, pH 6,2) mit PAPS (10 μM) und DHEA (2 μM) versetzt. Anschließend wurde vor der Messung aller Proben die geeignete Proteinmenge bestimmt. 50 bzw. 100 μg zytosolisches Protein wurden auf 250 μl mit dem Inkubationspuffer versetzt und bei 37 °C 30 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μl eiskaltem Methanol gestoppt. Die Proben wurden umgehend bei 4 °C für 10 min bei 12.000 g zentrifugiert und der Überstand in Mikrovials für die HPLC-Analyse überführt. Auch für diesen Assay wurde das LaChrom Elite[®] HPLC-System genutzt (Tab. 4.14). Mittels eines UV-VIS Detektors (L-4250, LaChrom) wurde PAP bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen. Für das Fließmittel wurde die gleiche Zusammensetzung wie im SULT1A1-Assay verwendet. Die Flussrate betrug 1,2 ml/min. Je 50 μl der Proben wurden bei einem Druck von 206 bar und 30 °C injiziert. Die Gesamtanalyse dauerte 16 min. Der Retentionspeak von PAP wurde nach 4,2 min gemessen. Die Auswertung erfolgte über die Standardkurve von PAP über das Programm EZChrom Elite Version 3.3.1. Abbildung 4.5 zeigt ein beispielhaftes Chromatogramm des Standards und einer Testprobe.

Tab. 4.14: Verwendete Geräte der HPLC-Anlage für den SULT2A1-Assay

HPLC Komponenten	
Pumpe	L-7100 (LaChrom)
Säulenofen	Jet Stream Plus
Autosampler	L-7200 (LaChrom)
Detektor	UV-VIS Detector L-4250 (LaChrom) Wellenlänge: 254 nm
Säule	LiChrospher60 select B 5 µm, 250 mm-4 mm (Merck, 50839)
Vorsäule	HPLC LiChrospher-Kartusche RP 18e (5µm) 4 mm-4 mm

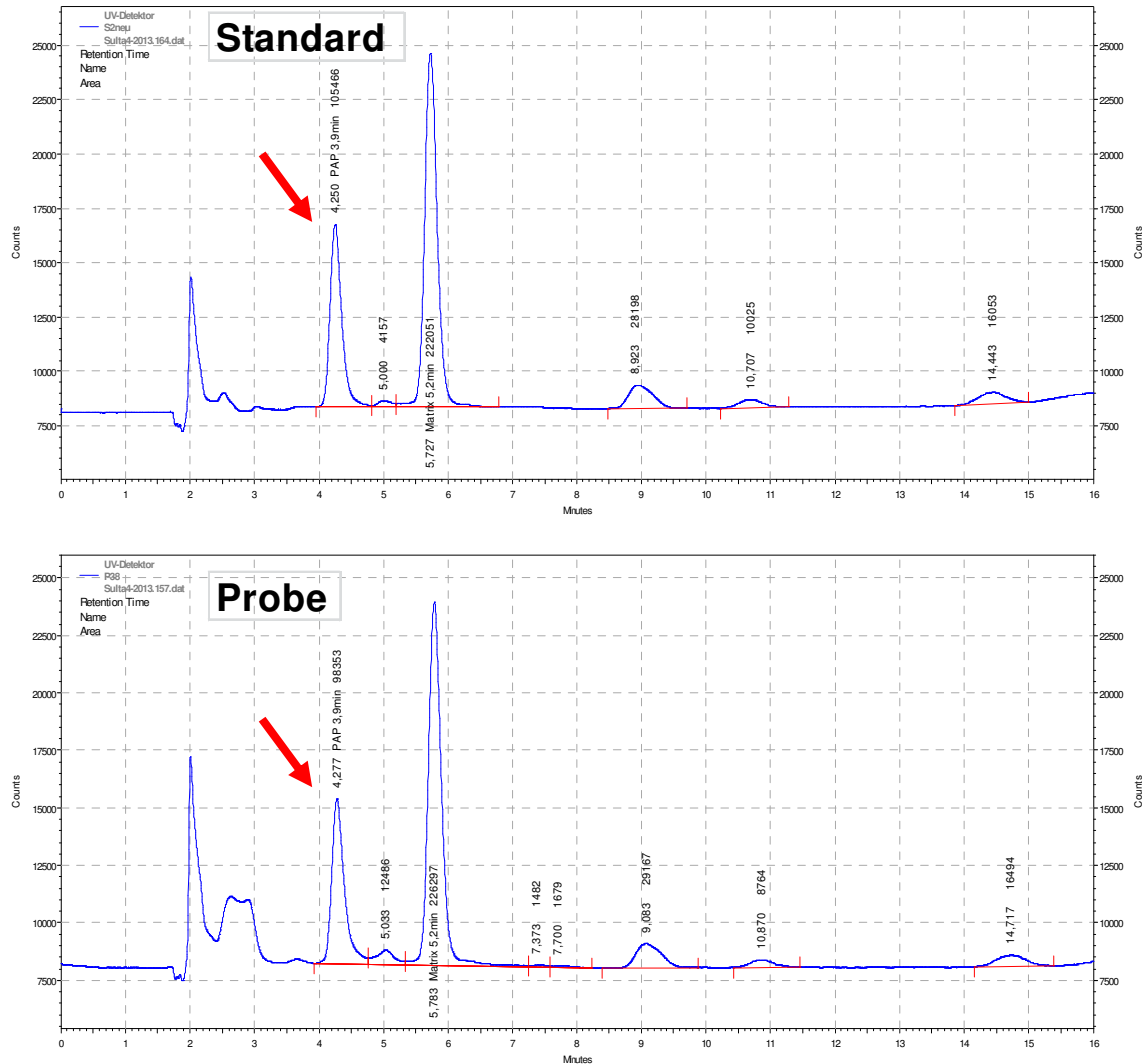


Abb. 4.5: Beispielhaftes Chromatogramm der HPLC-Analyse zur Bestimmung der SULT2A1-Aktivität im Leberzytosol von Ebern
Die eingezeichneten Pfeile zeigen den Retentionspeak von PAP.

Alle Proben wurden auf einen Proteingehalt von 50 µg eingestellt und, wie zuvor beschrieben, 30 min inkubiert und analysiert.

Zur Überprüfung der Qualität wurde aus einer Probe ein dreifacher Inkubationsansatz erstellt und nach der Analyse ein VK von 10 % berechnet (Tab. 4.15). Auch in diesem Assay wurde die Stabilität der inkubierten Proben überprüft, in dem diese für 24 h bei -20 °C eingefroren und erneut gemessen wurden. Es gab keine Abweichungen zu den Messungen am vorherigen Tag, was zeigt, dass die Proben nach Beenden der Reaktion stabil sind.

Tab. 4.15: Qualitätsüberprüfung des SULT2A1-Assay - Dreifacher Ansatz aus einer Leberprobe

	Aktivität in $\mu\text{mol/mg/h}$	MW $\pm$ SD	VK
Inkubation 1	98,8	} 112 $\pm$ 11,2	10 %
Inkubation 2	118		
Inkubation 3	118		

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

4.6.13 pH-Messung im Kot

Für die pH-Wert Messung wurde wöchentlich Kot gesammelt. Die Sammlung der Kotproben erfolgte innerhalb von fünf Stunden nach der Morgenfütterung. In einem Gemisch von 2,5 g Kot und 10 ml destilliertem Wasser wurde der pH-Wert mit einem pH-Meter 211 (HANNA Instruments) ermittelt.

4.6.14 Bestimmung der Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren im Kot mittels Kapillar-Gaschromatographie

Für die Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren Essigsäure (C:2), Propionsäure (C:3), Isobuttersäure (iC:4), Buttersäure (C:4), Isovaleriansäure (iC:5) und Valeriansäure (C:5) mittels eines Gaschromatographen (Perkin Elmer, Clarius 580) wurde frischer Kot der Eber gesammelt und sofort in Flüssigstickstoff eingefroren und anschließend bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die Aufarbeitung erfolgte nach Stanier und Davies (1981). Als interner Standard wurde 308 mg Crotonsäure in einen 100 ml Kolben eingewogen, mit 5 ml ortho-Phosphorsäure versetzt und mit Reinstwasser bis zur Markierung aufgefüllt. Ca. 0,1 g Probe wurde eingewogen und mit 1 ml 5 % ortho-Phosphorsäure, inklusive dem internen Standard, versetzt und gut gewirbelt. Anschließend wurde bei 21.100 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und vor der Analyse nochmals für 5 Minuten bei 21.100 g und 4 °C zentrifugiert. Da kurzkettige Fettsäuren sehr flüchtig sind, wurden alle Arbeiten rasch und unter Kühlung durchgeführt. Vor dem Einspritzen musste beachtet werden, dass die Probe auf Raumtemperatur gebracht wurde, da der interne Standard sonst

nicht vollständig gelöst vorliegt. Bei der Gaschromatographie werden die Fettsäuren voneinander getrennt und mittels eines Flammenionisationsdetektors (FID) detektiert. Die verwendeten Geräte für die GC sind in Tabelle 4.16 dargestellt. Je 1 µl pro Probe wurden injiziert. Als Trägergas diente Helium. Das Trägergas wurde bei einem Strom von 3 ml/min mit einem Vordruck von 40 kPa/59,2 cm/sec durch die Säule geleitet. Die Temperatur betrug bis 0,5 min 65 °C und wurde dann mit 10 °C/min auf 120 °C erhöht. Diese Temperatur wurde 0,5 min lang gehalten und dann mit 40 °C/min auf 200 °C erhöht. Die 200 °C wurden 3 min gehalten.

Tab. 4.16: Verwendete Geräte des Gaschromatographen für die Bestimmung der Konzentration von flüchtigen Fettsäuren im Kot von Ebern

GC-Komponenten	
Säule	Macherey & Nagel, Katalog-Nr. 723340 Typ:Permabond FFAP-DF-0,25 Innen-Durchmesser: 0,32 mm Säulen-Länge: 10 m Filmdicke: 0,25 µm Säulennr.: MN-30004-83
Detektion	FID Temperatur: Injektor: 240 °C Detektor: 260 °C Brenngase: H ₂ : 45 ml/min Synth. Luft: 450 ml/min
Inlay	4 mm Focusliner; SGE liner+ Wolle

FID = Flammenionisationsdetektor

Die Fettsäuren wurden anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert. Um die Responsefaktoren zu bestimmen, wurde zuvor ein Kalibrationsgemisch erstellt (Tab. 4.17). Die Fläche des internen Standards (I.Std), der der Probe zugesetzt wurde, wurde in Bezug zur Fläche der Fettsäuren (FS) gesetzt und mit dem Responsefaktor (RS) und dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

$$\text{Berechnung: } \frac{\text{Fläche FS} \times c \text{ I.Std.}(\mu\text{g}) \times \text{RS}}{\text{Fläche I.Std.} \times E \text{ (g)} \times 1000} = \text{mg/g}$$

Tab. 4.17: Eigenschaften der verwendeten Fettsäuren

Fettsäure	Kalibrationsgemisch ($\mu\text{g/ml}$)	Retentionszeit (min)
Essigsäure (C:2)	1009	1,71
Propionsäure (C:3)	304	2,38
Isobuttersäure (iC:4)	34,3	2,60
Buttersäure (C:4)	204	3,16
Isovaleriansäure (iC:5)	26,9	3,52
Valeriansäure (C:5)	50,3	4,19
Crotonsäure	499	4,54

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen wurde eine gepoolte Probe an unterschiedlichen Messtagen analysiert und der VK für die einzelnen Fettsäuren bestimmt. Für C:2 und C:3 wurde ein VK von 3,3 %, für iC:4 von 4,7 %, für C:4 von 4,2 %, für iC:5 von 6,6 % und für C:5 von 5,2 % ermittelt. Einige Proben wurden aus der gleichen Aufarbeitung an einem anderen Messtag wiederholt. Die Ergebnisse haben sich mit einer hohen Wiederfindung bestätigt. Abbildung 4.6 zeigt ein beispielhaftes Chromatogramm des eingesetzten Standards und einer Testprobe.

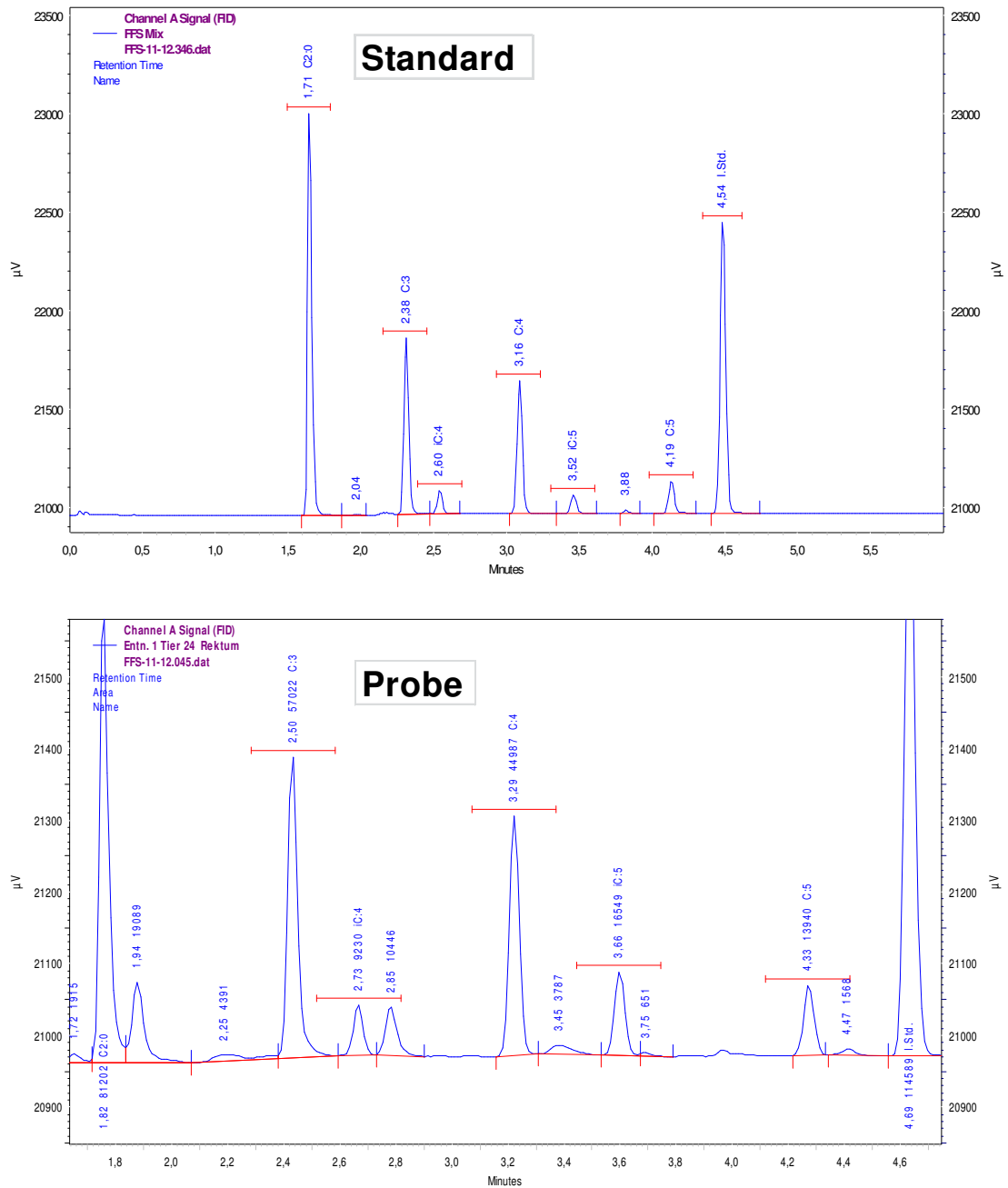


Abb. 4.6: Beispielhaftes Chromatogramm der GC-Analyse zur Bestimmung der Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren im Kot von Ebern

C:2 = Essigsäure; C:3 = Propionsäure; iC:4 = Isobuttersäure; C:4 = Buttersäure; iC:5 = Isovaleriansäure; C:5 = Valeriansäure

4.6.15 Enzymimmunologische Bestimmung von Androstenon im Fettgewebe

Die Androstenonkonzentration wurde nach der Methode von Claus *et al.* (1997) und nach einer modifizierten Aufarbeitung nach Weiler *et al.* (2013) mittels Mikrotiter-Enzymimmunoassay bestimmt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit einem spezifischen Antiserum gegen 5 α -Androst-16en-3on-CMO in einer Verdünnung von 1:10.000 beschichtet. Am Analysentag wurden die zuvor beschichteten Platten mit 2 % Rinderserumalbumin (BSA) abgesättigt.

Für die Analyse wurden die Rückenspeckproben der Eber in Würfel geschnitten und in der Mikrowelle bei 600 Watt 2 Minuten geschmolzen. Als Kontrolle diente Kastratenfett mit definierten Zusätzen von Androstenon. Die Konzentration der Kalibrierungskurve lag im Bereich von 0,2 μ g bis 2 μ g Androstenon pro g Fett. 50 μ l des geschmolzenen Fettes wurden in 450 μ l warmes Methanol (55 °C) überführt. Die Proben wurden abgekühlt und anschließend für 10 min bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Dadurch wurden die Lipide abgetrennt. Je 100 μ l des Überstandes wurden mit Puffer verdünnt. Mit dem Tracer, markiertes Androstenon (HRP-Konjugat), wurden die Proben auf die Platten überführt und bei 37 °C inkubiert. Freies, ungebundenes Androstenon wurde durch Abklopfen und Waschen der Platten entfernt. Als Enzymsubstrat wurde eine TMB-Lösung zugesetzt und mit einer H₂O₂-Lösung katalysiert. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 2 M H₂SO₄-Lösung abgestoppt und der Farbumschlag umgehend bei 450 nm photometrisch gemessen. Die Nachweisgrenze (NWG) für Androstenon liegt bei dieser Methode bei 0,027 μ g/g Fett. Die Nachweisgrenze wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$MW (0\text{-Probe}) + 3 SD = NWG$$

Diese Nachweisgrenze stimmt mit der von Claus *et al.* (1997) überein.

4.6.16 Bestimmung der Indol- und Skatolkonzentration im Fettgewebe mittels UPLC

Die Methode zur Bestimmung der Indol- und Skatolkonzentration im Fettgewebe beruht auf dem Verfahren nach Dehnhard *et al.* (1991) und Claus *et al.* (1993) und wurde für

die Messungen am UPLC-System (*Ultra performance liquid chromatography*) mit Fluoreszenzdetektion gering modifiziert. Bei der UPLC handelt es sich um eine Weiterentwicklung der HPLC. Hier werden kleinere Partikel und ein erhöhter Arbeitsdruck verwendet, wodurch eine höhere Geschwindigkeit bei der chromatographischen Trennung erreicht werden kann.

Die Rückenspeckproben der Eber wurden von Muskulatur und Schwarte befreit und in Würfel geschnitten. Je 2 g Fettgewebe wurden in ein 10 ml Reagenzglas überführt und bis zum Tag der Analyse bei -20 °C gelagert. Nach einer ca. einstündigen Auftauphase wurden die Proben bei 600 Watt für 2 min in der Mikrowelle geschmolzen. Je 100 mg des geschmolzenen Fettes wurden in Doppelbestimmung in Reagenzgläser pipettiert und das Gewicht notiert. Zu jeder Probe wurde 1 ml n-Hexan hinzu gegeben und kurz gemischt. Danach wurden die Proben mit einem 1 ml Acetonitril-Wasser-Gemisch (4:1) und 30 µl interner Standard (2-Methylindol; 0,2 mg/ml) versetzt. Um den Übertritt der Indole in die Acetonitril-Phase sicherzustellen, wurden die Proben für 30 Sekunden stark gevortext. Anschließend wurden die Proben 15 min zentrifugiert, um eine Phasentrennung zwischen dem lipophilen n-Hexan und der wässrigen Acetonitril-Phase zu erreichen. Nach Absaugen der Hexan-Phase wurde die Acetonitril-Phase in HPLC-Vials überführt. Die Messung erfolgte mit den in Tabelle 4.18 beschriebenen Geräten. Als Fließmittel diente 0,011 M Essigsäure:H₂O:Acetonitril:2-Propanol (0,063:55:30:15; v:v:v:v). Die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Je 5 µl Probe wurde eingespritzt. Für die Detektion wurde ein Fluoreszenzdetektor verwendet. Bei 275 nm konnte die Extinktion und bei 352 nm die Emission gemessen werden. Die Analysenzeit betrug 5 min. Die Nachweisgrenze für Indol liegt bei dieser Methode bei 0,40 ng/g Fett und für Skatol bei 0,82 ng/g Fett. Die Nachweisgrenzen wurden wie bei Dehnhardt *et al.* (1993) beschrieben bestimmt. Als Basis wurde das Grundrauschen der Basislinie berechnet, mit dem Faktor zwei multipliziert und mit dem Einspritzvolumen von 5 µl berechnet.

Tab. 4.18: Verwendete Geräte der UPLC-Anlage für die Bestimmung der Indol- und Skatolkonzentration im Fettgewebe

UPLC-Komponenten	
Autosampler	Dionex/ThermoFisher Ultimate 3000RS Autosampler
Pumpe	Dionex/ThermoFisher Ultimate 3000RS Pumpe
Detektor	Dionex/ThermoFisher Ultimate 3000RS Floureszenzdetektor
Software	Dionex/ThermoFisher Chromelion Software Version 7.1
Säule	Multospher 120 RP 18 3µm (125 x 2mm)

4.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm MiniTab13 (Minitab, Stage Collage, USA). Vor der Auswertung wurden die Daten mittels des Anderson-Darling Tests auf Normalverteilung überprüft. Konnte eine Normalverteilung nachgewiesen werden, wurden die Daten mittels einfaktorieller ANOVA analysiert. Wenn sich die Mittelwerte signifikant voneinander unterschieden, wurde ein multipler Mittelwertvergleich mit dem Fisher Test durchgeführt. Als Signifikanzgrenze galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($P < 0,05$). Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Kruskal-Wallis Test angewendet. Als Post-hoc Test wurde der Mann-Whitney Test verwendet. Auch hier galt als Signifikanzgrenze eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($P < 0,05$). Bei der Auswertung des pH-Werts im Kot wurde eine zweifaktorielle ANOVA (mit den Faktoren Behandlung, Zeit, Behandlung und Zeit) und anschließend Fisher Test durchgeführt ($P < 0,05$). Daten, die eine hohe Streuung ($> \text{Faktor } 2$) aufwiesen, wurden vor der Durchführung der ANOVA logarithmiert. Alle Daten sind in der vorliegenden Arbeit als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben. Als Ausreißer wurden Werte außerhalb der zweifachen SD vom Mittelwert definiert.

5 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Versuche zum Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten und Präbiotika zur Reduzierung von Ebergeruch durchgeführt. In einem ersten Versuch sollte untersucht werden, ob eine Fütterung mit einem Zusatz von 1 % Traubentrester, Hopfenextrakt oder grünem Tee über den Nrf2-Signalweg in der Leber den Androstenon-, Indol- und Skatolgehalt im Rückspeck der Eber reduzieren kann. Dazu wurde die relative mRNA-Konzentration von Nrf2-Zielgenen gemessen. Außerdem wurde die Expression und Aktivität von Enzymen, die in den Androstenon- und Skatolmetabolismus involviert sind, bestimmt. Im zweiten Versuchskomplex wurde der Einfluss von 0,5 % Fructooligosacchariden und 1 % Gluconsäure in der Jungebermast auf den Indol- und Skatolgehalt im Rückenspeck und die Konzentration von flüchtigen Fettsäuren im Kot der Eber untersucht. In den folgenden Unterkapiteln sollen die Ergebnisse der beiden Ebermastversuche dargestellt werden.

5.1 Ebermastversuch 1

5.1.1 Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf Leistungs- und Schlachtparameter von Ebern

Zu Beginn der Mittelmast (50-80 kg) unterschied sich das Startgewicht der Eber zwischen den einzelnen Gruppen nicht. Während des ersten Mastabschnitts konnten signifikante Einflüsse durch die Zulage der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte im Futter auf die tägliche Zunahme, die Futteraufnahme und den Futteraufwand der Tiere festgestellt werden ($P < 0,05$; Tab. 5.1). Die Lebendmassezunahme war durch den Zusatz von grünem Tee im Vergleich zu allen anderen Gruppen niedriger ($P < 0,05$). Eber dieser Gruppe zeigten im Vergleich zu den Gruppen, denen Traubentrester bzw. Hopfenextrakt zugesetzt wurden, eine verminderte Futteraufnahme ($P < 0,05$). Im Vergleich zur Kontrolle unterschied sich die tägliche Futteraufnahme durch den Zusatz von grünem Tee nicht signifikant. Jedoch konnte ein erhöhter Futteraufwand durch den Zusatz von grünem Tee im Vergleich zu den anderen Gruppen beobachtet werden ($P < 0,05$).

Zu Beginn des letzten Mastabschnittes (80-110 kg) wiesen die Eber, deren Futter mit grünem Tee zugesetzt war, im Vergleich zu den Tieren, die einen Zusatz von Hopfenextrakt erhielten, ein geringeres Startgewicht auf ($P < 0,05$). Im Vergleich der anderen Gruppen zeigten sich keine weiteren Einflüsse der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte auf das Gewicht. Die tägliche Lebendmassezunahme war durch den Zusatz von grünem Tee im Vergleich zu den anderen Gruppen im letzten Mastabschnitt erniedrigt ($P < 0,05$). Im Gegensatz dazu konnten durch den Zusatz von Traubentrester bzw. Hopfenextrakt im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Unterschiede bei der täglichen Lebendmassezunahme beobachtet werden. Weiterhin führte der Zusatz von grünem Tee im Vergleich zu den Gruppen, denen Traubentrester bzw. Hopfenextrakt zugesetzt wurden, zu einer verminderten täglichen Futteraufnahme ($P < 0,05$). Im Vergleich zur Kontrolle konnte keine signifikante Verminderung in der Futteraufnahme durch grünen Tee festgestellt werden. Der Futteraufwand war auch in diesem Mastabschnitt durch den Zusatz von grünem Tee am höchsten, unterschied sich jedoch nur im Vergleich zur Gruppe, deren Ration Traubentrester enthielt, signifikant ($P < 0,05$).

Über die gesamte Mastperiode von 50-110 kg führte die Zugabe von grünem Tee im Futter der Jungeber im Vergleich zu den Gruppen, denen Traubentrester bzw. Hopfenextrakt zugesetzt waren, zu einem niedrigeren Endgewicht ($P < 0,05$). Im Vergleich zur Kontrolle konnte keine signifikante Verminderung des Endgewichts festgestellt werden. Hier zeigte sich nur eine numerische Reduzierung. Im Vergleich zu allen Gruppen nahmen die Eber, die grünen Tee in ihrer Ration erhielten, täglich weniger Futter auf ($P < 0,05$). Dementsprechend zeigten Eber dieser Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen eine verminderte tägliche Lebendmassezunahme ($P < 0,05$). Der Zusatz von Hopfenextrakt führte in der Gesamtbetrachtung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer erhöhten täglichen Lebendmassezunahme, die statistisch nicht abgesichert werden konnte.

Tab. 5.1: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf Leistungsparameter von Ebern in der Mittel- und Endmast

	Kontrolle	Trauben- trester	Hopfenextrakt	Grüner Tee
Mittelmast 50-80 kg (29 Tage)				
StG (kg)	54,9 ± 5,1	54,4 ± 4,5	54,9 ± 4,9	54,3 ± 5,6
LMZ (g/T)	1022 ± 145 ^b	1069 ± 103 ^b	1136 ± 168 ^b	886 ± 156 ^a
FuA (g/T)	2466 ± 275 ^{ab}	2475 ± 168 ^b	2629 ± 287 ^b	2243 ± 310 ^a
FA (kg/kg)	2,43 ± 0,14 ^b	2,33 ± 0,18 ^b	2,33 ± 0,10 ^b	2,55 ± 0,14 ^a
Endmast 80-110 kg (24 Tage)				
StG (kg)	84,5 ± 8,7 ^{ab}	85,4 ± 6,5 ^{ab}	87,8 ± 9,1 ^b	80,0 ± 9,4 ^a
LMZ (g/T)	845 ± 116 ^b	913 ± 112 ^b	920 ± 139 ^b	736 ± 88,5 ^a
FuA (g/T)	2831 ± 262 ^{ab}	2955 ± 233 ^b	3017 ± 247 ^b	2651 ± 314 ^a
FA (kg/kg)	3,38 ± 0,29 ^{ab}	3,27 ± 0,38 ^b	3,32 ± 0,35 ^{ab}	3,63 ± 0,48 ^a
Gesamte Mastperiode 50-110 kg (53 Tage)				
EG (kg)	104 ± 10,3 ^{ab}	107 ± 6,9 ^b	110 ± 11,0 ^b	98 ± 10,6 ^a
LMZ (g/T)	942 ± 121 ^b	998 ± 172 ^b	1039 ± 132 ^b	818 ± 106 ^a
FuA (g/T)	2632 ± 256 ^{ab}	2692 ± 172 ^b	2804 ± 255 ^b	2428 ± 306 ^a
FA (kg/kg)	2,79 ± 0,14 ^b	2,70 ± 0,18 ^b	2,70 ± 0,14 ^b	2,97 ± 0,16 ^a

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; n = 12 Tiere pro Gruppe; ^{abcd} Mittelwerte ohne gleiche Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede (P<0,05; Fisher Test); StG = Startgewicht; LMZ = Lebendmassezunahme; FuA = Futteraufnahme; FA = Futteraufwand; EG = Endgewicht

Die Schlachtparameter des ersten Ebermastversuchs sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Ein niedrigeres Schlachtgewicht konnte durch den Zusatz von grünem Tee im Vergleich zu den Gruppen, denen Traubentrester bzw. Hopfenextrakt zugesetzt wurden, festgestellt werden (P<0,05). Im Vergleich zur Kontrollgruppe unterschieden sich die Gruppen nicht. Der Magerfleischanteil war in allen Gruppen gleich. Eber der Gruppe mit zugesetztem grünem Tee wiesen im Vergleich zu den anderen Gruppen ein signifikant erniedrigtes Fleischmaß auf (P<0,05). Das Speckmaß war durch die Zugabe von grünem Tee im Vergleich zur Gruppe mit Zusatz von Hopfenextrakt verringert (P<0,05). Zwischen den anderen Gruppen wurden keine Unterschiede im Speckmaß beobachtet.

Tab. 5.2: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf Schlachtparameter von Ebern

	Kontrolle	Trauben- trester	Hopfenextrakt	Grüner Tee
SG (kg)	81,1 ± 8,2 ^{ab}	82,5 ± 5,6 ^b	84,6 ± 8,8 ^b	74,5 ± 9,1 ^a
MFA (%)	58,6 ± 1,9	58,3 ± 1,7	57,3 ± 1,8	58,0 ± 2,4
FM (mm)	52,2 ± 4,6 ^b	52,2 ± 5,2 ^b	52,5 ± 6,8 ^b	46,5 ± 4,2 ^a
SM (mm)	12,8 ± 1,9 ^{ab}	13,2 ± 1,7 ^{ab}	14,4 ± 2,0 ^b	12,3 ± 2,7 ^a

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; n = 12 Tiere pro Gruppe; ^{abcd} Mittelwerte ohne gleiche Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede (P<0,05; Fisher Test); SG = Schlachtgewicht; MFA = Magerfleischanteil; FM = Fleischmaß; SM = Speckmaß

5.1.2 Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Genexpression von Nrf2-Zielgenen in der Leber von Ebern

5.1.2.1 Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration von ausgewählten Nrf2-Zielgenen in der Leber

Im Lebergewebe wurde die Genexpression unterschiedlicher Nrf2-Zielgene untersucht. In Tabelle 5.3 ist die relative mRNA-Konzentration der Glutathionperoxidase (GPX1), der Glutathion-S-Transferase (GST), der mikrosomalen Glutathion-S-Transferase (MGST1), der Superoxiddismutase (SOD) der Hämoxxygenase (HO-1), der NADPH-Dehydrogenase (NQO1), des Peroxiredoxin (PRDX6) und der Thioredoxinreduktase (TXNR1) dargestellt. Die Analyse der Nrf2-Zielgene zeigte Unterschiede durch den Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte in der relativen mRNA-Konzentration. Die Zugabe von Traubentrester erhöhte die relative mRNA-Konzentration der NQO1 und der TXNR1 signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (P<0,05). Bei den anderen Genen konnte eine Steigerung der relativen mRNA-Konzentration durch den Zusatz von Traubentrester aufgrund der hohen Streuung statistisch nicht abgesichert werden. Durch die Fütterung der Diät mit einem Zusatz von Hopfenextrakt wurde die relative mRNA-Konzentration der SOD, der NQO1, der TXNR1 und von PRDX6 signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert (P<0,05). Alle der untersuchten Nrf2-Zielgene

wurden durch den Zusatz von grünem Tee im Futter der Jungeber im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant hochreguliert ($P < 0,05$).

Tab. 5.3: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die relative mRNA-Konzentration von ausgewählten Nrf2-Zielgenen in der Leber von Ebern

Gen	Kontrolle	Traubentrester	Hopfenextrakt	grüner Tee
GPX1	1 ± 0,43	2,73 ± 2,52	2,6 ± 2,82	5,41 ± 2,59 *
GST	1 ± 0,59	2,02 ± 1,27	1,3 ± 0,6	2,81 ± 1,5 *
MGST1	1 ± 0,37	2,71 ± 2,45	2,13 ± 1,49	5,01 ± 2,57 *
SOD	1 ± 0,66	2,3 ± 2,28	2,57 ± 1,14 *	6,12 ± 3,94 *
HO-1	1 ± 0,52	1,16 ± 0,7	1,19 ± 0,65	3,14 ± 1,41 *
NQO1	1 ± 0,56	3,57 ± 3,93 *	3,85 ± 2,47 *	16,2 ± 14,8 *
PRDX6	1 ± 0,43	1,98 ± 1,27	2,14 ± 1,18 *	12,5 ± 11,6 *
TXNR1	1 ± 0,55	2,53 ± 1,58 *	2,78 ± 1,73 *	5,85 ± 3,28 *

Dargestellt sind Mittelwerte ± SD; n = 12 Tiere pro Gruppe; * kennzeichnen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (* = $P < 0,05$; Fisher Test); die Kontrolle wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection PCR* quantifiziert und mittels Referenzgenen mit der GeNorm Software normalisiert; GPX1 = Glutathionperoxidase; GST = Glutathion-S-Transferase; MGST1 = mikrosomale Glutathion-S-Transferase; SOD = Superoxiddismutase; HO-1 = Hämoxygenase; NQO1 = NADPH-Dehydrogenase; PRDX6 = Peroxiredoxin; TXNR1 = Thioredoxinreduktase

5.1.2.2 Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration von Nrf2-Zielgenen des Cytochrom P450 Enzymsystems in der Leber

Auch einzelne Gene des Cytochrom P450 Enzymsystems in der Leber werden über Nrf2 reguliert. Deswegen sollte der Einfluss der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte auf ausgewählte CYP450 Gene untersucht werden. Durch den Zusatz von Traubentrester zum Futter der Jungeber wurde die relative mRNA-Konzentration von CYP1A1 und von CYP2E1, ein Hauptenzym im Skatolmetabolismus, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant hochreguliert ($P < 0,05$; Tab. 5.4). Durch den Zusatz des Hopfenextraktes wurde die relative mRNA-Konzentration von UGT1A1 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesteigert ($P < 0,05$). Wie im vorherigen Kapitel beschrieben wurde auch hier die relative mRNA-Konzentration aller untersuchten Gene durch den Zusatz von grünem Tee im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ($P < 0,05$).

Tab. 5.4: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die relative mRNA-Konzentration von Nrf2-Zielgenen des Cytochrom P450 Enzymsystems in der Leber von Ebern

Gen	Kontrolle	Traubentrester	Hopfenextrakt	grüner Tee
CYP1A1	1 ± 0,83	2,63 ± 3,33	3,65 ± 3,91	13,7 ± 15,5 *
CYP1A2	1 ± 0,89	8,74 ± 7,78 *	2,29 ± 2,29	28,5 ± 38,3 *
CYP2A19	1 ± 1,06	2,72 ± 3,04	8,94 ± 4,68	86,2 ± 79,3 *
CYP2E1	1 ± 0,61	3,59 ± 1,94 *	1,57 ± 1,54	15,2 ± 13,3 *
UGT1A1	1 ± 0,79	2,73 ± 3,19	2,71 ± 2,56 *	23,5 ± 21,3 *

Dargestellt sind Mittelwerte ± SD; n = 12 Tiere pro Gruppe; * kennzeichnen signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollgruppe (* = P<0,05; Fisher Test); die Kontrolle wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection PCR* quantifiziert und mittels Referenzgenen mit der GeNorm Software normalisiert; CYP = Cytochrom P450; UGT1A1 = UDP-Glucuronosyltransferase 1A1

5.1.2.3 Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration von Nrf2-Zielgenen des Sulfotransferasen-Systems in der Leber

Tabelle 5.5 zeigt die relative mRNA-Konzentration der Sulfotransferasen SULT1A1, SULT1B1 und SULT2A1. Wie bei den zuvor beschriebenen Genen führte auch hier der Zusatz von grünem Tee bei allen drei Sulfotransferasen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Erhöhung der relativen mRNA-Konzentration (P<0,05). Durch die Zugabe von Traubentrester im Futter der Jungeber wurde die relative mRNA-Konzentration der SULT1B1 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesteigert (P<0,05). Der Zusatz von Hopfenextrakt führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Steigerung der relativen mRNA-Konzentration der SULT1B1 (P<0,05). Für SULT1A1 und SULT2A1 konnten keine statistischen Effekte durch den Zusatz von Traubentrester oder Hopfenextrakt beobachtet werden.

Tab. 5.5 Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die relative mRNA-Konzentration von Nrf2-Zielgenen des Sulfotransferasen-Systems in der Leber von Ebern

Gen	Kontrolle	Traubentrester	Hopfenextrakt	grüner Tee
SULT1B1	1 ± 0,59	3,21 ± 2,43 *	4,08 ± 2,74 *	8,47 ± 5,99 *
SULT1A1	1 ± 1,09	4,12 ± 4,78	1,24 ± 0,93	15,2 ± 17,5 *
SULT2A1	1 ± 0,34	3,32 ± 2,97	1,67 ± 1,45	6,63 ± 5,74 *

Dargestellt sind Mittelwerte ± SD; n = 12 Tiere pro Gruppe; * kennzeichnen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (* = P<0,05; Fisher Test); die Kontrolle wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection PCR* quantifiziert und mittels Referenzgenen mit der GeNorm Software normalisiert; SULT = Sulfotransferase

5.1.3 Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Nrf2-Bindungsaktivität im Leberkernextrakt von Ebern

Zur Überprüfung der Hypothese, dass der Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte im Futter der Jungeber zu einer Nrf2-Aktivierung im Leberkernextrakt führt, wurden mehrere elektrophoretische Mobilitäts Shift Assays (EMSA) durchgeführt. Abbildung 5.1 zeigt ein repräsentatives Bild einer EMSA-Analyse. Für jede Analyse wurden je 70 µg Protein des Nuklearextraktes von drei Tieren pro Gruppe gepoolt. Die Spuren 3 bis 6 in Abbildung 5.1 zeigen die verschiedenen Behandlungsgruppen. Zu erkennen ist, dass bereits in der Kontrollgruppe ein Komplex aus Nrf2 und DNA gebildet wurde (Spur 3). Im Vergleich zwischen den Gruppen ist die Nrf2/ARE-Bindung in der Gruppe, der grüner Tee zugesetzt wurde, am stärksten (Spur 6). Da es sich bei einem EMSA um eine semiquantitative Analyse handelt, kann keine quantitative Aussage über die Nrf2-Aktivierung getroffen werden.

Als Nachweis, dass es sich bei der in der Abbildung dargestellten Bande um die Nrf2/ARE-Bindung handelt, wurde eine positive Kontrolle mit einer markierten humanen ARE-Sequenz inkubiert (Spur 2). Außerdem wurde eine Kompetition durchgeführt, bei der zusätzlich in 100-facher Konzentration unmarkierte, humane DNA mit inkubiert wurde. Die Abnahme der Signalintensität beim Kompetitionsversuch bestätigt, dass die markierte Bande die Nrf2/ARE-Bindung darstellt (Spur 7-10).

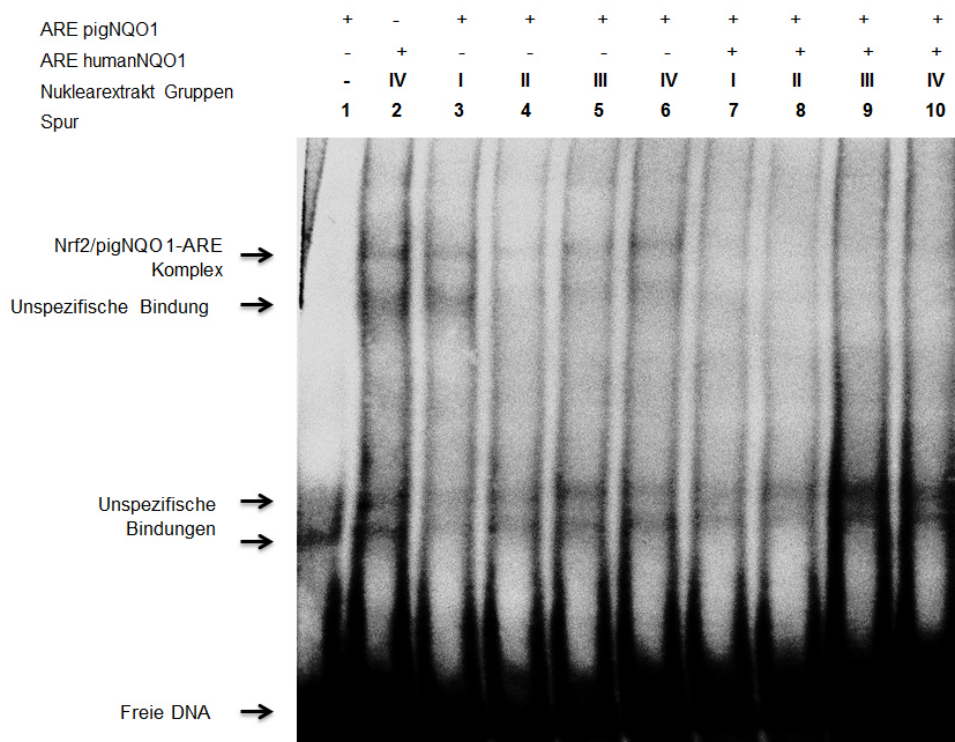


Abb. 5.1: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf die Nrf2-Bindungsaktivität im Leberkernextrakt von Ebern

Dargestellt ist ein beispielhaftes EMSA-Bild aus mehreren Untersuchungen; pro Gruppe wurden 3 Tiere gepoolt; I = Kontrolle; II = Traubentrester; III = Hopfenextrakt; IV = grüner Tee; Spur 1 = Negativkontrolle; Spur 2 = Kontrolle (Inkubation mit humanNQO1); Spur 3-6 = Inkubation mit pigNQO1; Spur 7-10 = Kompetition (Inkubation mit pigNQO1 und 100x unmarkierter humanNQO1)

5.1.4 Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die relative Proteinkonzentration von Enzymen des hepatischen Fremdstoffmetabolismus in Ebern

Zur Validierung der Ergebnisse der quantitativen PCR wurde die relative Proteinkonzentration von ausgewählten Genen des Androstenon- und Skatolmetabolismus bestimmt. Durch die Bestimmung der relativen Proteinkonzentration von CYP2E1 und SULT2A1 konnte bestätigt werden, dass die erhöhte relative mRNA-Konzentration durch den Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte mit einer erhöhten Proteinkonzentration assoziiert war. Allerdings fielen die Effekte auf Proteinebene wesentlich schwächer aus als auf Ebene der mRNA. Der Zusatz von Hopfenextrakt erhöhte die relative Proteinkonzentration des

CYP2E1 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant auf das 1,8-fache ($P < 0,05$). In den anderen Gruppen konnte ein Anstieg im Vergleich zur Kontrolle statistisch nicht mehr abgesichert werden (Abb. 5.2).

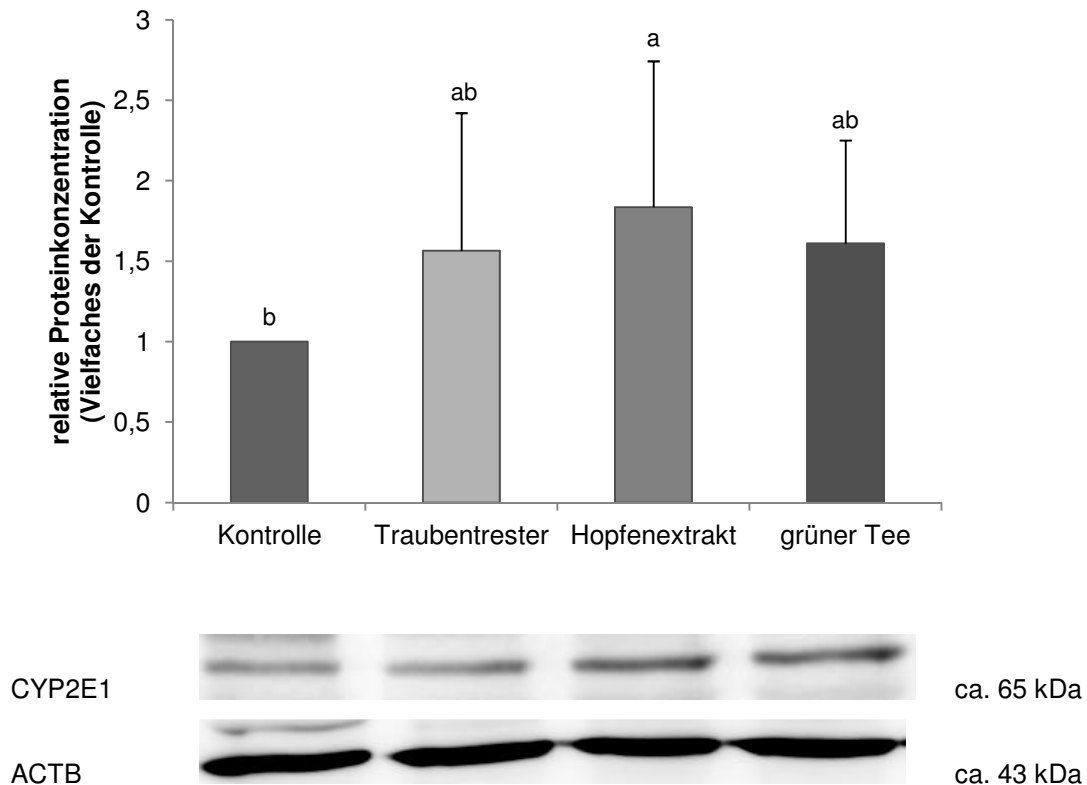


Abb. 5.2: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf die relative Proteinkonzentration des CYP2E1 in der Lebermikrosomenfraktion von Ebern

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD; $n = 6$ Tiere pro Gruppe; ^{abcd} Mittelwerte ohne gleich Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($P < 0,05$; Fisher Test); die Kontrolle wurde 1 gesetzt; die relativen Proteinkonzentrationen wurden mittels dem Referenzprotein β -Actin normalisiert; repräsentativer Blot des CYP2E1 und des ACTB; CYP = Cytochrom P450; ACTB = β -Actin

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde die relative Proteinkonzentration der SULT2A1 in der zytosolischen Leberfraktion durch den Zusatz von Traubentrester im Futter der Jungeber auf das 2,6-fache gesteigert ($P < 0,05$; Abb. 5.3). Der Zusatz von Hopfen erbrachte im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Unterschied in der relativen Proteinkonzentration. Durch die Zugabe von grünem Tee wurde die relative Proteinkonzentration der SULT2A1 im Vergleich zur Kontrollgruppe auf das 2,5-fache erhöht ($P < 0,05$; Abb. 5.3).

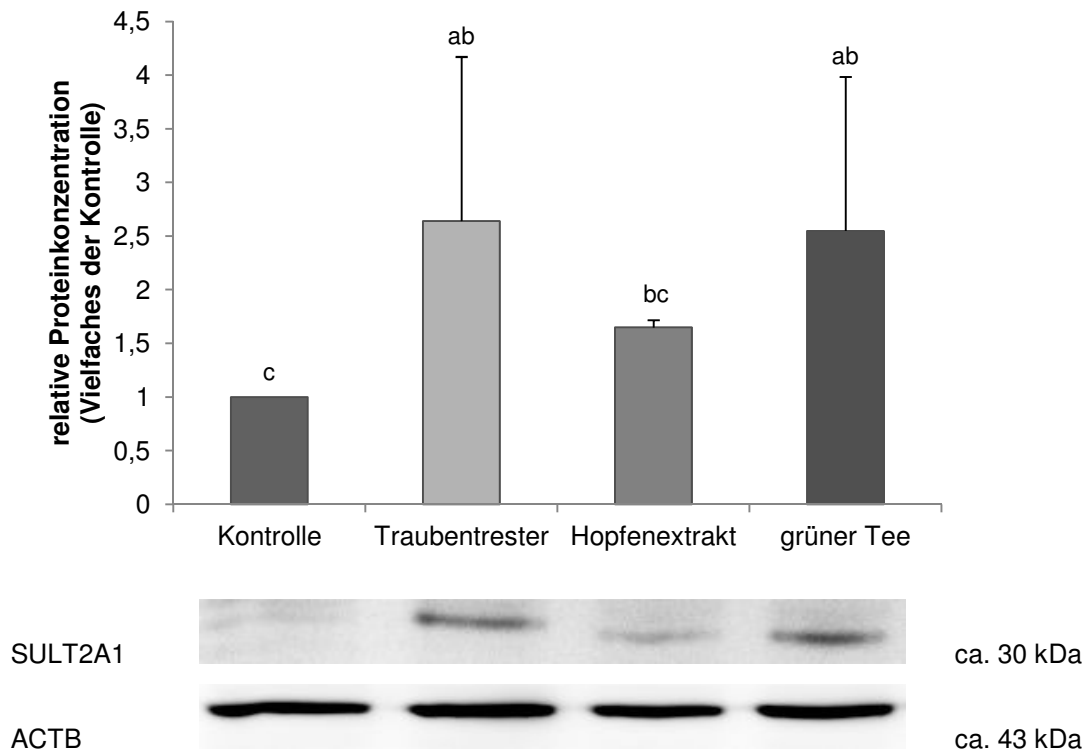


Abb. 5.3: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf die relative Proteinkonzentration der SULT2A1 im Leberzytosol von Ebern

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD; n = 6 Tiere pro Gruppe; ^{abcd} Mittelwerte ohne gleich Hochbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($P < 0,05$; Fisher Test); die Kontrolle wurde 1 gesetzt; die relativen Proteinkonzentrationen wurden mittels dem Referenzprotein β -Actin normalisiert; repräsentativer Blot der SULT2A1 und des ACTB; SULT = Sulfotransferase; ACTB = β -Actin

5.1.5 Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Aktivitäten von Enzymen des hepatischen Fremdstoffmetabolismus in Ebern

Zur Validierung der vorherigen Ergebnisse sollte die Aktivität des CYP2E1, der SULT1A1 und der SULT2A1 im Lebergewebe der Eber bestimmt werden. Wie aus Tabelle 5.6 hervorgeht, haben die zugesetzten polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte im Futter der Jungeber die Aktivität von CYP2E1, SULT1A1 und SULT2A1 in der Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant beeinflusst.

Tab. 5.6: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Aktivität von Enzymen des hepatischen Fremdstoffmetabolismus von Ebern

	CYP2E1-Aktivität (pmol/min/mg)	SULT1A1-Aktivität (μmol/min/mg)	SULT2A1-Aktivität (μmol/min/mg)
Kontrolle	769 $\pm$ 244	2,56 $\pm$ 0,78	2,46 $\pm$ 0,95
Traubentrester	774 $\pm$ 201	2,93 $\pm$ 0,46	2,39 $\pm$ 0,57
Hopfenextrakt	787 $\pm$ 323	2,64 $\pm$ 0,86	1,81 $\pm$ 0,62
Grüner Tee	835 $\pm$ 234	3,03 $\pm$ 1,01	2,29 $\pm$ 0,77

Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SD; n = 12 Tiere pro Gruppe; die CYP2E1-Aktivität wurde über die Umwandlung von *p*-Nitrophenol zu *p*-Nitrocatechol bestimmt; die Aktivität der SULT1A1 und der SULT2A1 wurde über den Verbrauch von PAPS zu PAP ermittelt

5.1.6 Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Androstenon-, Indol- und Skatolkonzentration im Rückenspeck von Ebern

Um die Hypothese zu überprüfen, dass der Androstenon- und Skatolmetabolismus in der Leber über den Nrf2-Signalweg durch die Fütterung beeinflusst werden kann, wurde die Konzentration von Androstenon, Indol und Skatol im Rückenspeck der Eber bestimmt. In Tabelle 5.7 sind die Konzentrationen der untersuchten Parameter dargestellt. Der Androstenongehalt im Rückenspeck wurde durch die zugesetzten polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant beeinflusst (Tab. 5.7). Auf die Indolkonzentration im Rückenspeck hatten die zugesetzten polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte im Futter der Jungeber ebenfalls keinen Einfluss. Die Skatolkonzentration wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe durch den Zusatz von Traubentrester, Hopfenextrakt und grünen Tee signifikant erhöht ($P < 0,05$). Zwischen den Behandlungsgruppen unterschied sich die Skatolkonzentration nicht signifikant.

Tab. 5.7: Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten im Futter auf die Androstenon-, Indol- und Skatolkonzentration im Rückenspeck von Ebern

Gruppe	Androstenon (µg/g)	Indol (ng/g)	Skatol (ng/g)
Kontrolle	1,24 ± 0,65	43 ± 25,4	61,3 ± 54 ^b
Traubentrester	1,29 ± 0,59	37,3 ± 12,4	167 ± 139 ^a
Hopfenextrakt	0,84 ± 0,73	31 ± 12,3	185 ± 163 ^a
Grüner Tee	1,06 ± 0,74	32,7 ± 12,6	148 ± 119 ^a

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; n = 12 Tiere pro Gruppe; ^{abcd} Mittelwerte ohne gleiche Hochbuchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede (P<0,05; Mann-Whitney Test)

5.3 Ebermastversuch 2

5.3.1 Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf Leistungs- und Schlachtparameter von Ebern

Wie im ersten Ebermastversuch wurden für die Leistungsparameter des zweiten Ebermastversuches das Startgewicht, die tägliche Lebendmassezunahme, die tägliche Futteraufnahme, der Futteraufwand und das Endgewicht der Eber erfasst. Die untersuchten Leistungsparameter des zweiten Ebermastversuches sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst. Zu Versuchsbeginn unterschied sich das Startgewicht der Eber zwischen den Gruppen nicht. Im Vergleich zur Gruppe, in der dem Futter Fructooligosaccharide (FOS) und Gluconsäure zugesetzt wurde, konnte in der Gruppe, bei der dem Futter nur Gluconsäure zugegeben wurde, eine erhöhte tägliche Lebendmassezunahme festgestellt werden ($P < 0,05$). Die Lebendmassezunahme dieser Gruppe unterschied sich von der Kontrollgruppe und der Gruppe, der FOS zugesetzt war, nicht signifikant. Bei der täglichen Futteraufnahme zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Futteraufwand war im Vergleich zur Kontrollgruppe in keiner der Behandlungsgruppen signifikant verändert. Ein signifikanter Unterschied im Futteraufwand konnte aber zwischen der Gruppe, der Gluconsäure zugegeben wurde und der Gruppe, der FOS und Gluconsäure zugesetzt wurde, festgestellt werden ($P < 0,05$). Die kombinierte Zugabe der präbiotischen Zusatzstoffe führte dabei zu einem höheren Futteraufwand als die alleinige Zugabe von Gluconsäure. Das Endgewicht der Eber unterschied sich zwischen den Behandlungsgruppen nicht.

Tab. 5.8: Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf Leistungsparameter von Ebern

	Kontrolle	FOS	Gluconsäure	FOS + Gluconsäure
Versuchszeitraum 85-120 kg (32 Tage)				
StG (kg)	83,3 ± 5,4	84,3 ± 4,5	84,2 ± 7,3	84,3 ± 6,4
LMZ (g/T)	879 ± 101 ^{ab}	925 ± 175 ^{ab}	955 ± 88,4 ^b	851 ± 71,1 ^a
FuA (g/T)	2658 ± 236	2722 ± 294	2782 ± 204	2658 ± 213
FA (kg/kg)	3,07 ± 0,15 ^{ab}	2,99 ± 0,35 ^{ab}	2,92 ± 0,17 ^b	3,13 ± 0,13 ^a
EG (kg)	111 ± 7,7	114 ± 7,3	115 ± 8,8	112 ± 7,8

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; n = 12 Tiere pro Gruppe; ^{abcd} Mittelwerte ohne gleiche Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede (P<0,05; Fisher Test); FOS = Fructooligosaccharide; StG = Startgewicht; LMZ = Lebendmassezunahme; FuA = Futteraufnahme; FA = Futteraufwand; EG = Endgewicht

Für die Schlachtparameter wurden das Schlachtgewicht, der Magerfleischanteil, das Fleischmaß und das Speckmaß erfasst. Auch das Schlachtgewicht der Eber unterschied sich zwischen den Gruppen nicht. Ebenso zeigten sich beim Magerfleischanteil keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei den Tieren, die über ihr Futter einen Zusatz von FOS erhielten, ein signifikant höherer Wert für die Dicke des Muskelfleisches ermittelt werden (P<0,05; Tab. 5.9). Eber der Gruppe, die eine Zugabe von Gluconsäure erhielten, zeigten im Vergleich zur Gruppe, der FOS zugesetzt wurden, ein signifikant vermindertes Fleischmaß auf (P<0,05). Zwischen den anderen Gruppen wurden keine Unterschiede im Fleischmaß beobachtet. Ebenso unterschied sich das Speckmaß zwischen den Gruppen nicht. In Tabelle 5.9 sind die Schlachtparameter der Eber des zweiten Versuchskomplexes zusammengefasst.

Tab. 5.9: Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf Schlachtparameter von Ebern

	Kontrolle	FOS	Gluconsäure	FOS + Gluconsäure
SG (kg)	88,5 ± 6,5	90,6 ± 5,8	91,8 ± 7,3	88,3 ± 7,0
MFA (%)	60,8 ± 1,4	59,9 ± 3,1	59,6 ± 1,4	60,7 ± 1,7
FM (mm)	53,3 ± 3,6 ^b	57,6 ± 6,6 ^a	52,9 ± 3,3 ^b	54,6 ± 2,5 ^{ab}
SM (mm)	10,4 ± 1,6	12,4 ± 3,1	12,4 ± 2,5	10,8 ± 1,9

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; ^{abcd} Mittelwerte ohne gleiche Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede (P<0,05; Fisher Test); FOS = Fructooligosaccharide; SG = Schlachtgewicht; MFA = Magerfleischanteil; FM = Fleischmaß; SM = Speckmaß

5.3.2 Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf den pH-Wert und die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren im Kot von Ebern

Um zu überprüfen ob der Zusatz der präbiotisch wirksamen Stoffe einen Einfluss auf die mikrobielle Aktivität im Darm ausübt, wurden der pH-Wert und die flüchtigen Fettsäuren im Kot der Eber bestimmt. Der pH-Wert wurde wöchentlich ermittelt. Über den Versuchszeitraum von 32 Tagen stieg der pH-Wert im Faeces in allen Behandlungsgruppen bis zum 25. Versuchstag an und wurde von einem Abfall bis zum Tag der Schlachtung begleitet. In der Kontrollgruppe war dieser Anstieg im Vergleich zum ersten Messzeitpunkt signifikant (P<0,05). Zwischen den Behandlungsgruppen konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im pH-Wert beobachtet werden. Laut zweifaktorieller ANOVA bestand keine Wechselwirkung zwischen der Behandlung und dem Messzeitpunkt. Es gab zwar einen Zeiteffekt (P<0,05), nicht aber einen Behandlungseffekt. Tabelle 5.10 zeigt den pH-Wert der Behandlungsgruppen über den Versuchszeitraum von 32 Tagen.

Tab. 5.10: Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf den pH-Wert im Kot von Ebern im Verlauf über den Versuchszeitraum

Versuchstag	Kontrolle	FOS	Gluconsäure	FOS + Gluconsäure
4	6,62 ± 0,27 ^b	6,56 ± 0,37 ^{ab}	6,63 ± 0,24	6,68 ± 0,22
11	6,68 ± 0,3 ^b	6,48 ± 0,3 ^{ab}	6,56 ± 0,35	6,65 ± 0,38
18	6,7 ± 0,43 ^b	6,73 ± 0,25 ^a	6,66 ± 0,4	6,76 ± 0,41
25	7,07 ± 0,46 ^a	6,76 ± 0,42 ^a	6,82 ± 0,48	6,98 ± 0,49
32	6,55 ± 0,31 ^b	6,37 ± 0,5 ^b	6,71 ± 0,38	6,69 ± 0,43

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; n = 12 Tiere pro Gruppe; ^{abcd} Mittelwerte ohne gleiche Hochbuchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede (P<0,05; Fisher Test); FOS = Fructooligosaccharide

Die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren wurde gaschromatographisch im Kot der Eber, der einen Tag vor der Schlachtung gesammelt wurde, bestimmt. Die Gesamtfettsäurekonzentration unterschied sich zwischen den Gruppen nicht. Der kombinierte Zusatz von FOS und Gluconsäure führte im Vergleich zur alleinigen Zugabe von FOS zu einem Anstieg der Isovaleriansäurekonzentration (P<0,05; Tab. 5.11). Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden keine Unterschiede durch die Zusätze der Präbiotika im Futter auf die flüchtigen Fettsäuren im Kot beobachtet. In Übereinstimmung damit konnte kein signifikanter Unterschied im pH-Wert zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen am Ende des Versuchszeitraumes festgestellt werden (Tab. 5.11).

Tab. 5.11: Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf die flüchtigen Fettsäuren und den pH-Wert im Kot von Ebern

	Kontrolle	FOS	Gluconsäure	FOS + Gluconsäure
SCFA (mmol/kg)				
C:2	307 ± 77,7	330 ± 42,1	295 ± 70,8	296 ± 60
C:3	110 ± 25,1	122 ± 22,9	129 ± 60	119 ± 32,5
iC:4	13,1 ± 4,08	10,8 ± 1,92	11 ± 2,13	13,2 ± 3,62
C:4	80,6 ± 29,7	91,1 ± 22,8	68 ± 19,4	84,7 ± 31,6
iC:5	18,8 ± 6,8 ^{ab}	14,2 ± 3,04 ^a	15,1 ± 4,05 ^{ab}	19,5 ± 5,92 ^b
C:5	13,9 ± 4,76	12,4 ± 2,79	12,4 ± 5,07	14,3 ± 4,43
Gesamt-SCFA (mmol/kg)				
	543 ± 126	581 ± 89	529 ± 146	546 ± 123
pH-Wert				
	6,55 ± 0,31	6,37 ± 0,50	6,71 ± 0,38	6,69 ± 0,43

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD, bezogen auf die Trockenmasse; n =12 Tiere pro Gruppe; ^{abcd} Mittelwerte ohne gleiche Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede (P<0,05; Fisher Test); FOS = Fructooligosaccharide; SCFA = *short chain fatty acid* (kurzkettige Fettsäure) C:2 = Essigsäure; C:3 = Propionsäure; iC:4 = Isobuttersäure; C:4 = Buttersäure; iC:5 = Isovaleriansäure; C:5 = Valeriansäure

5.3.3 Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf die Indol- und Skatolkonzentration im Rückenspeck von Ebern

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte durch den Zusatz von Gluconsäure und dem kombinierten Zusatz von FOS und Gluconsäure eine erhöhte Indolkonzentration im Rückenspeck der Jungeber beobachtet werden (P<0,05; Tab. 5.12). Die Gruppe, der FOS zugesetzt wurden, zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Indolkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe und den anderen Behandlungsgruppen. Der Skatolgehalt im Rückenspeck der Eber unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.

Tab. 5.12: Einfluss von präbiotischen Zusatzstoffen im Futter auf die Indol- und Skatolkonzentration im Rückenspeck von Ebern

Gruppe	Indol (ng/g)	Skatol (ng/g)
Kontrolle	22,1 ± 8,85 ^b	79,1 ± 41,9
FOS	31,4 ± 17,2 ^{ab}	66,2 ± 56,8
Gluconsäure	38,7 ± 18 ^a	108 ± 102
FOS + Gluconsäure	49,7 ± 35,2 ^a	93,8 ± 62,2

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD; n = 12 Tiere pro Gruppe; ^{abcd} Mittelwerte ohne gleiche Hochbuchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede (P<0,05; Mann-Whitney Test); FOS = Fructooligosaccharide

6 Diskussion

6.1 Bedeutung von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten für die Jungebermast im Bezug auf Ebergeruch

Mit der Entdeckung der Komponenten Androstenon und Skatol, die für den unerwünschten Ebergeruch verantwortlich sind, wuchs ein starkes Interesse innerhalb der Schweinemast an der Erforschung der Reduzierung von Ebergeruch, um auch Eberfleisch genusstauglich und damit vermarktungsfähig zu machen. Da aus tierschutzrechtlichen Gründen ab dem 1. Januar 2019 eine Kastration von Ferkeln nicht mehr ohne Betäubung erfolgen darf, wird derzeit intensiv nach Alternativen gesucht, um trotz des Verbots weiterhin ein genusstaugliches Produkt anbieten zu können. Die Verminderung von Ebergeruch stellt ein zentrales Ziel in der Schweinemast dar. Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente sollten eine mögliche Strategie entwickeln um den unerwünschten Ebergeruch durch die Fütterung zu vermindern.

Zahlreiche Publikationen haben gezeigt, dass Ebergeruch durch die Fütterung von präbiotisch wirksamen Pflanzenbestandteilen positiv beeinflusst werden kann (Claus *et al.* 1994; Claus *et al.* 2003; Hansen *et al.* 2006; Zamaratskaia *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Rasmussen *et al.* 2012b; Vhile *et al.* 2012). Die Untersuchungen beschränken sich dabei zumeist auf die Verminderung der Skatolkonzentration im Fettgewebe von Ebern. Die Androstenonkonzentration ist nach wie vor schwer zu beeinflussen, auch wenn erstmals eine Androstenonreduktion durch die Verfütterung von Zichorienwurzeln erreicht werden konnte (Rasmussen *et al.* 2012b). Auf diesem Gebiet besteht weiterhin großer Forschungsbedarf. Androstenon und Skatol werden über den hepatischen Fremdstoffmetabolismus abgebaut. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass der Abbau der beiden unerwünschten Stoffe durch eine Anregung des Fremdstoffmetabolismus in der Leber beschleunigt werden könnte. Ein beschleunigter Abbau könnte in einer reduzierten Einlagerung von Androstenon und Skatol im Fettgewebe resultieren. Nrf2, ein wichtiger Transkriptionsfaktor für den Fremdstoffmetabolismus, reguliert die Expression von zytoprotektiven und antioxidativ wirksamen Enzymen (Lee *et al.* 2005). Zielgene von Nrf2 sind unter anderen Gene, die in den Androstenon- und Skatolmetabolismus involviert sind (Babol *et al.* 1998a; Sinclair *et al.* 2005; Sinclair *et al.* 2006). Der Zusammenhang vom Einsatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten aus Traubentrester, Hopfen oder grünem Tee,

den molekularen Mechanismen des Nrf2-Signalwegs und dem Androstenon- und Skatolmetabolismus in der Leber, wurde bisher nicht untersucht. Deshalb war es das Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit, erstmals zu untersuchen, ob durch den Zusatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten zum Futter von unkastrierten, männlichen Schweinen, die Konzentration an Androstenon und Skatol im Rückenspeck, die für den Ebergeruch verantwortlich sind, vermindert werden können. Da bekannt ist, dass Polyphenole den Transkriptionsfaktor Nrf2 in der Leber aktivieren und dadurch Gene des Fremdstoffmetabolismus aktiv werden (Chen *et al.* 2000; Shen *et al.* 2005; Soyalan *et al.* 2011; Bak *et al.* 2012; Han *et al.* 2012), die ebenfalls in den Abbau von Androstenon und Skatol in der Leber involviert sind (Babol *et al.* 1998a; Sinclair *et al.* 2005; Sinclair *et al.* 2006), wurde postuliert, dass der Zusatz von polyphenolreichen Pflanzenextrakten im Futter, den Nrf2 in der Leber der Eber aktivieren kann und es dadurch zu einem gesteigerten Abbau von Androstenon und Skatol kommt. In der vorliegenden Arbeit wurden Extrakte aus Traubentrester, Hopfen und grünem Tee eingesetzt. Diese Pflanzenextrakte wurden bewusst gewählt, da sie reich an Polyphenolen sind und in der Literatur zahlreiche positive Eigenschaften auf den Organismus beschrieben wurden (Li *et al.* 2001; Terra *et al.* 2009; Xia *et al.* 2010; Ellinger *et al.* 2011; Bak *et al.* 2012; Gessner *et al.* 2012; Krajka-Kuzniak *et al.* 2013; Ohno *et al.* 2013; Newsome *et al.* 2014; Yousaf *et al.* 2014).

6.1.1 Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf die Mastleistung

Die untersuchten Leistungsparameter des Ebermastversuches umfassten das Startgewicht, die tägliche Lebendmassezunahme, die tägliche Futteraufnahme, den Futteraufwand und das Endgewicht. Der Futteraufwand errechnet sich aus dem Quotienten der täglichen Zunahme und der täglichen Futteraufnahme. In Studien wurde gezeigt, dass der Zusatz von Traubentrester zum Futter den Futteraufwand der Tiere verbessern kann. Gessner *et al.* (2013) konnten einen verbesserten Futteraufwand durch den Zusatz von 1 % Traubentrester bei Ferkeln beobachten. Eine Studie der eigenen Arbeitsgruppe bestätigte diese Untersuchung und zeigte, dass der Zusatz von 1 % Traubentrester den Futteraufwand bei Ferkeln signifikant verbessern kann (Fiesel *et al.* 2014). Der Effekt von Traubentrester auf Leistungsparameter scheint spezieübergreifend zu sein. So wurde in einer Untersuchung mit Broilern die Futterverwertung durch den Zusatz von Traubentrester zum Futter der Tiere ebenfalls

verbessert (Viveros *et al.* 2011; Chamorro *et al.* 2013). Im Gegensatz zu den genannten Studien konnte in der vorliegenden Arbeit ein verminderter Futteraufwand durch den Zusatz von 1 % Traubentrester im Futter der Jungeber statistisch nicht abgesichert werden. Auch auf die Schlachtparameter hatte der Einsatz von Traubentrester in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss. Grund dafür kann das Alter der Versuchstiere sein. Bei Gessner *et al.* (2013) und Fiesel *et al.* (2014) wurden Ferkel betrachtet. In der vorliegenden Arbeit wurden Eber ab 50 kg betrachtet. Der Effekt scheint bei jungen Tieren stärker auszufallen, da sich beispielsweise die Enzymausstattung im Darm zwischen Ferkeln und älteren Tieren unterscheidet.

Die tägliche Lebendmassezunahme war im Vergleich zu allen Gruppen in der Gruppe, die 1 % Hopfenextrakt zugesetzt bekam, am höchsten. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe (Fiesel *et al.* 2014) zeigen zudem, dass der Zusatz von 1 % Hopfenextrakt zum Futter von Ferkeln den Futteraufwand signifikant verbessern kann. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar kein signifikanter Unterschied im Futteraufwand zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die Hopfenextrakt zugesetzt bekam, erreicht werden, dennoch kann die erhöhte durchschnittliche, tägliche Lebendmassezunahme als positiv für die Mast betrachtet werden. Nach aktuellem Kenntnisstand existieren in der Literatur keine weiteren Studien zum Einfluss eines Hopfenextraktes auf die Leistungsdaten von Tieren.

Der Einsatz von grünem Tee scheint für die Praxis nicht geeignet zu sein. Eber, die einen Zusatz von 1 % grünem Tee erhielten, zeigten im Vergleich der Gruppen über den gesamten Mastzeitraum eine schlechtere tägliche Lebendmassezunahme und ein vermindertes Endgewicht. Verantwortlich dafür war die schlechte Akzeptanz des Futters, was in einem erhöhten Futteraufwand resultierte, der wirtschaftlich betrachtet einen Nachteil für die Ebermast darstellt. Grüner Tee enthält viele Bitterstoffe, die die schlechte Akzeptanz des Futters erklären könnten. Auch die Schlachtparameter wurden durch den Einsatz von grünem Tee tendenziell verschlechtert. Zwar unterschieden sich diese nicht signifikant zur Kontrollgruppe, jedoch zeigten sich zwischen den Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede. So erreichten die Eber, die grünen Tee erhielten im Vergleich zu den Ebern, die Traubentrester oder Hopfen zugesetzt bekamen, ein signifikant niedrigeres End- und Schlachtgewicht. Auch das Fleisch- und Speckmaß war in der Gruppe, in der grüner Tee zugesetzt wurde im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen signifikant vermindert. Nach aktuellem Kenntnisstand existieren nur wenige Studien über den Einfluss von grünem Tee auf die Leistungsdaten von Tieren. Während in einer Untersuchung von Augustin *et al.* (2008)

kein Einfluss von grünem Tee auf die Leistungsdaten von Ferkeln festgestellt werden konnte, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit deutlich, dass ein Zusatz von 1 % grünem Tee das Fressverhalten der Schweine negativ beeinflusst. Der Unterschied kann im bitteren Geschmack von grünem Tee begründet liegen. Die eingesetzte Dosis war in der vorliegenden Arbeit höher als bei Augustin *et al.* (2008).

6.1.2 Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf den Nrf2-Signalweg in der Leber

Polyphenole können den Nrf2-Signalweg in der Leber aktivieren (Chen *et al.* 2000; Shen *et al.* 2005; Soyalan *et al.* 2011; Han *et al.* 2012). Durch MAPKs oder PI3K wird Nrf2 entweder direkt oder Cysteinreste von Keap1 phosphoryliert, so dass Nrf2 aus der Bindung mit Keap1 freigesetzt wird und in den Nukleus translozieren kann (Yu *et al.* 2000; Wakabayashi *et al.* 2004; Tkachev *et al.* 2011). Im Nukleus bindet Nrf2 an eine ARE-Sequenz im Promotorbereich von Zielgenen und aktiviert so deren Transkription (Tkachev *et al.* 2011). In der Literatur existieren viele molekulare Untersuchungen mit isolierten Polyphenolen in der Zellkultur oder bei Nagern. Studien über natürlich vorkommende polyphenolreiche Futtermittel und dem Nrf2-Signalweg bei Nutztieren sind selten. In der vorliegenden Arbeit wurden keine isolierten Polyphenole, sondern Pflanzenextrakte aus Traubentrester, Hopfen und grünem Tee verwendet. Um zu überprüfen, ob ein Zusatz von Traubentrester, Hopfenextrakt oder grünem Tee zum Futter der Eber die Nrf2-abhängige Genexpression in der Leber beeinflusst, wurde die relative mRNA-Konzentration verschiedener Nrf2-Zielgene mittels quantitativer *realtime* PCR (qPCR), sowie die Nrf2-Bindungsaktivität untersucht. Den Zusammenhang zwischen einer potentiellen Nrf2-Aktivierung und dem Androstenon- und Skatolmetabolismus bildete die Analyse von Nrf2-Zielgenen, die in den Abbau von Androstenon und Skatol involviert sind, mittels qPCR, sowie die Proteinexpressionanalyse und die Aktivitätsmessung von ausgewählten Enzymen des Androstenon- und Skatolmetabolismus.

Mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte durch den Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte zum Futter ein Anstieg der Expression von Nrf2-abhängigen Zielgenen in der Leber der Eber festgestellt werden. Als Nrf2-Zielgene wurden die Glutathionperoxidase (GPX1), die Superoxiddismutase (SOD), die Hämoxigenase (HO-1), die Thioredoxinreduktase (TXNR1), die antioxidativ wirksam

sind, sowie die Glutathion-S-Transferase (GST), die mikrosomale Glutathion-S-Transferase (MGST1), die NADPH-Dehydrogenase (NQO1) und das Peroxiredoxin (PRDX6), die zytoprotektiv und in den Phase II-Metabolismus involviert sind, ausgewählt. Es zeigte sich im Vergleich der Behandlungsgruppen deutlich, dass der Zusatz von grünem Tee den stärksten Effekt auf die relative mRNA-Konzentration von allen untersuchten Nrf2-Zielgenen hatte. Die erhöhte Expression der hier untersuchten Gene deutet auf einen Schutz vor inflammatorischen Schäden hin. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind proinflammatorisch wirksam und produzieren vor allem oxidativen Stress. Sie werden über die oben beschriebenen antioxidativ wirksamen Gene neutralisiert und vermindert (Kim *et al.* 2010). Die zugesetzten polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte könnten demnach durch die gesteigerte Transkription von antioxidativ wirksamen Genen proinflammatorische Zustände im Tier vorbeugen. Besonders wirksam scheint ein Zusatz von grünem Tee zu sein, da in dieser Gruppe die stärksten Effekte beobachtet werden konnten.

Über eine Aktivierung von Zielgenen kann in der Regel indirekt auf eine Aktivitätssteigerung des Transkriptionsfaktors selbst geschlossen werden. Zur Überprüfung wurde in der vorliegenden Arbeit ein elektrophoretischer Mobilitäts Shift Assay (EMSA) durchgeführt, mittels dem eine Nrf2/ARE-Bindungsreaktion nachgewiesen werden kann. Es handelt sich dabei um eine semiquantitative Analyse, d.h. mit dieser Methode kann nachgewiesen werden, ob eine Nrf2/ARE-Bindung stattgefunden hat. Quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind dabei nur subjektiv festzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits in der Kontrollgruppe eine Nrf2/ARE-Bindung nachgewiesen. Nrf2 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der durch viele Reize aktiviert werden kann (Tkachev *et al.* 2011). Dies kann erklären, warum bereits in der Kontrollgruppe eine Nrf2/ARE-Bindung nachgewiesen wurde. Nichtsdestotrotz lässt auch der EMSA durch die stärkere Signalintensität der Bande in der Gruppe, die einen Extrakt aus grünem Tee erhielten, im Vergleich zu den anderen Gruppen vermuten, dass der Zusatz von grünem Tee zum Futter der Jungeber die stärkste Aktivierung von Nrf2 in der Leber hervorgerufen hat. Daher kann angenommen werden, dass alle untersuchten Gene in der Leber durch die polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte über eine Nrf2-Aktivierung hochreguliert wurden, da alle Zielgene in der Gruppe, die eine Zulage von grünem Tee erhielten, ebenfalls am stärksten beeinflusst wurden.

Eine Nrf2-Aktivierung wird in der Literatur größtenteils als günstig angesehen. Durch eine Aktivierung durch oxidativen Stress, Xenobiotika oder Polyphenole werden antioxidative Enzyme und Enzyme des Fremdstoffmetabolismus aktiviert, die die

zytoprotektive Kapazität der Zelle steigern (Itoh *et al.* 1999). Dies stellt für den Organismus einen gesundheitlichen Vorteil dar. In der Literatur wird beschrieben, dass eine Nrf2-Aktivierung oft mit einer Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B einhergeht, der einen Hauptregulator in der proinflammatorischen Genexpression darstellt (Baeuerle und Henkel 1994; Nair *et al.* 2008; Kim *et al.* 2010). Eine Aktivitätsverminderung von NF- κ B wird in vielen Fällen als günstig angesehen, da dadurch Entzündungsreaktionen verringert werden. Somit könnten durch den Zusatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten in der Schweinemast Entzündungsprozesse im Tier vermindert werden. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass der Zusatz eines Traubenextraktes im Futter von Ferkeln inflammatorische Zustände im Darm der Tiere verbessern kann (Gessner *et al.* 2013; Fiesel *et al.* 2014). In den Studien wurde eine signifikante Verminderung der relativen mRNA-Konzentration von NF- κ B-Zielgenen durch den Zusatz von 1 % Traubentrester im Futter von Ferkeln in der Darmmucosa nachgewiesen. Eine vorherige Zellkulturstudie zeigte zudem, dass der Zusatz von Traubentrester zum Medium von Caco2-Zellen, eine durch TNF α -induzierte NF- κ B-Transaktivierung signifikant vermindern kann (Gessner *et al.* 2012).

Für die erhöhte Expression von antioxidativ wirksamen und zytoprotektiven Genen über den Nrf2-Signalweg sind in der vorliegenden Arbeit höchstwahrscheinlich die Polyphenole der zugesetzten Pflanzenextrakte verantwortlich. Trauben enthalten Proanthocyanidine, Catechine und Gallensäuren (Auger *et al.* 2004). Proanthocyanidine aus Trauben können die Expression von Nrf2-abhängigen Genen aktivieren (Bak *et al.* 2012), was die erhöhte Expression von NQO1 und TXNR1 in der vorliegenden Arbeit durch die Zulage von Traubentrester erklären kann. Traubenextrakten wird zudem eine antioxidative Aktivität durch das Abfangen von freien Radikalen und der Inhibierung der Lipidoxidation zugeschrieben (Xia *et al.* 2010). Xanthohumol ist eines der bedeutsamsten Flavonoide im Hopfen. Über eine Nrf2-Aktivierung wird die Transkription von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus durch Xanthohumol induziert (Krajka-Kuzniak *et al.* 2013). Hopfen enthält neben Xanthohumol Proanthocyanidine und weitere Flavonoide (Wang *et al.* 2014). Dietz *et al.* (2013) konnten aufzeigen, dass eine durch Xanthohumol ausgelöste, erhöhte NQO1-Aktivität in der Leber bei Ratten, durch die Gabe eines Hopfenextraktes noch stärker ausfiel als die alleinige Gabe von Xanthohumol. Die Aktivität der GST in der Leber wurde in der genannten Studie nur durch einen Hopfenextrakt und nicht durch Xanthohumol alleine induziert. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die zytoprotektiven Effekte nicht nur durch Xanthohumol alleine hervorgerufen werden

(Dietz *et al.* 2013). Es ist sehr wahrscheinlich, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit die erhöhte relative mRNA-Konzentration von SOD, NQO1, PRDX6 und TXNR1 durch den Zusatz des Hopfenextraktes unter anderem durch Xanthohumol hervorgerufen wurde.

In der Literatur wird beschrieben, dass die positiven Eigenschaften von grünem Tee größtenteils auf den hohen Gehalt an Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) zurückzuführen sind (Shen *et al.* 2005; Jiang *et al.* 2012; Newsome *et al.* 2014). EGCG ist ein Flavonoid, das zur Gruppe der Catechine gehört. Wie in Kapitel 2.2.3 bereits beschrieben, wurde durch verschiedene Studien gezeigt, dass EGCG durch die Aktivierung von MAPKs die Translokation von Nrf2 in den Zellkern induziert, wodurch die Expression von Nrf2-abhängigen Genen stimuliert wird (Chen *et al.* 2000; Newsome *et al.* 2014). Laut Herstellerangaben liegt im verwendeten Produkt der vorliegenden Arbeit ein EGCG Gehalt von mindestens 40 % vor (Tab. 4.2). Deswegen kann vermutet werden, dass der Effekt des Zusatzes von grünem Tee in der vorliegenden Arbeit größtenteils durch EGCG über den Nrf2-Signalweg hervorgerufen wurde. Da der Effekt von grünem Tee auf die relative mRNA-Konzentration im Vergleich zu den anderen Gruppen wesentlich stärker ausfiel, ist zum Einen denkbar, dass EGCG eine stärkere Aktivierung hervorruft als die Polyphenole der anderen zugesetzten Pflanzenextrakte und zum Anderen weitere Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die in den hepatischen Fremdstoffmetabolismus involviert sind. Neben Nrf2, spielen Transkriptionsfaktoren wie der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR), CAR (*constitutive androstane receptor*), PXR (*pregnane X receptor*) und FXR (*farneosid X receptor*) eine wichtige Rolle im Fremdstoffmetabolismus (Xu *et al.* 2005). Shen *et al.* (2005) konnten mittels einer Microarray Analyse zeigen, dass neben der Regulierung von Nrf2-abhängigen Genen durch EGCG auch Nrf2-unabhängige Gene reguliert werden, wodurch diese Annahme bekräftigt wird.

6.1.3 Einfluss von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten auf den Androgenon- und Skatolmetabolismus in der Leber

Der Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit lag im Zusammenhang zwischen dem Einfluss der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte, dem Nrf2-Signalweg und der Reduzierung des Ebergeruchs. Um diesen Zusammenhang herzustellen, wurde neben der Genexpression von ausgewählten Nrf2-Zielgenen, die Proteinexpression von CYP2E1 und SULT2A1, die Aktivität von CYP2E1, SULT1A1 und SULT2A1 in der

Leber sowie der Androstenon-, Indol- und Skatolgehalt im Fettgewebe der Eber gemessen. Die oben genannten Enzyme wurden ausgewählt, weil CYP2E1 und SULT1A1 die wichtigsten Enzyme im Metabolismus von Skatol und SULT2A1 im Androstenonmetabolismus darstellen (Babol *et al.* 1998a; Lin *et al.* 2004; Sinclair *et al.* 2005; Sinclair *et al.* 2006; Matal *et al.* 2009; Wiercinska *et al.* 2012). In einer Phase I Reaktion wird Skatol durch CYP2E1 zu verschiedenen Metaboliten abgebaut, die anschließend in einer Phase II Reaktion durch SULT1A1 konjugiert werden. Analog zum Skatolmetabolismus, werden die durch eine Phase I Reaktion entstandenen Metabolite aus Androstenon in einer Phase II Reaktion durch SULT2A1 konjugiert. Durch diese Reaktionen steigt ihre Wasserlöslichkeit, so dass die Metabolite über die Niere ausgeschieden werden können (Babol *et al.* 1998b). In der vorliegenden Arbeit wurden für die Analyse der Genexpression mittels qPCR Gene für die Cytochrom P450 Enzyme 1A1, 1A2, 2A19 und 2E1, sowie für die UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) ausgewählt. Neben der Entgiftung von Xenobiotika ist die Cytochrom P450 Familie für viele weitere Mechanismen verantwortlich. So wird der Arachidonsäuremetabolismus, die Eicosanoidsynthese, die Cholesterol-, Sterol- und Gallensäuresynthese, die Steroidsynthese und der -Katabolismus sowie die Synthese und der Metabolismus von Vitamin D₃ über CYP450 Enzyme reguliert (Nebert und Russell 2002). Alle CYP450 Enzyme wurden durch grünen Tee signifikant hochreguliert. CYP2A19 stellt neben CYP2E1 eines der wichtigsten Enzyme im Phase I Metabolismus von Skatol dar (Babol *et al.* 1998a; Matal *et al.* 2009; Wiercinska *et al.* 2012). Bei beiden Enzymen wurde die relative mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe durch den Zusatz von grünem Tee signifikant erhöht. Für die Sulfotransferasen wurden die Nrf2-Zielgene SULT1B1, SULT1A1 und SULT2A1 untersucht. Auch hier erhöhte der Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte im Vergleich zur Kontrollgruppe die relative mRNA-Konzentration. Durch die Zulage von grünem Tee war die Steigerung bei allen drei Genen signifikant.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen zusammenfassend, dass durch einen Zusatz von grünem Tee zum Futter von Jungebern Phase I und Phase II Enzyme in der Leber auf mRNA-Ebene hochreguliert werden können. Im Vergleich mit den Ergebnissen der qPCR-Analyse der zuvor beschriebenen Nrf2-Zielgene ist deutlich erkennbar, dass bei den CYP450- und UGT-Genen eine wesentlich stärkere Induktion durch grünen Tee stattgefunden hat. Grund dafür könnte die Induktion weiterer Transkriptionsfaktoren sein. Viele nukleäre Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle im hepatischen Fremdstoffmetabolismus (Xu *et al.* 2005).

Zwar konnte eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Konzentration von relevanten Nrf2-Zielgenen in der Leber nachgewiesen werden, der Effekt auf die

Proteinkonzentration der untersuchten Enzyme war jedoch wesentlich geringer ausgeprägt als auf Ebene der Transkription. Während auf mRNA Ebene eine 5-80-fache Erhöhung der relativen mRNA-Konzentration der Nrf2-Zielgene durch die polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte beobachtet wurde, wurde die relative Proteinkonzentration der untersuchten Enzyme nur auf das 1,5-2-fache der Kontrollgruppe erhöht. Zur Validierung der Ergebnisse wurde die Enzymaktivität von CYP2E1, SULT1A1 und SULT2A1 gemessen. Bei diesen Analysen konnte keine Veränderung in der Enzymaktivität durch die verschiedenen Zusätze beobachtet werden. Das vermehrt exprimierte Transkript wurde demnach nicht in ein aktives Enzym umgesetzt. Die in der qPCR gemessene mRNA-Konzentration muss das tatsächlich synthetisierte Protein nicht direkt widerspiegeln, da posttranskriptionale Modifizierungen wie mRNA-Stabilisierung und posttranslationale Modifizierungen wie Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung das Protein beeinflussen können (Tsai und O'Malley 1994; Day und Tuite 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Polyphenole der zugesetzten Pflanzenextrakte zwar die Gen- und zum Teil die Proteinexpression der Enzyme beeinflussen, diese jedoch durch posttranskriptionale und posttranslationale Modifizierungen so verändert werden, dass die vermehrt exprimierte mRNA nicht in ein aktives Enzym umgesetzt wird. Dies könnte erklären, warum keine Aktivitätsveränderung zwischen den Behandlungsgruppen nachgewiesen werden konnte und die Erhöhung der relativen Proteinkonzentration durch die polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte im Vergleich zur relativen mRNA-Konzentration wesentlich geringer ausfiel. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich mit Studien von Rasmussen *et al.* (2011) und Brunius *et al.* (2012), in denen eine erhöhte CYP2E1 mRNA-Expression in der Leber von Schweinen nicht mit einer erhöhten Aktivität des Enzyms einherging. Für CYP2E1 wird vermutet, dass die mRNA posttranskriptional modifiziert wird (Kocarek *et al.* 2000). Es wurde nachgewiesen, dass die CYP2E1 mRNA eine oder mehrere Merkmale enthält, die eine effiziente Translation verhindern. Diese sekundären Strukturen befinden sich in der 5' untranslatierten Region (UTR). Eine Deletion der terminalen Region der 5'UTR führt zu einer erhöhten CYP2E1 Proteinsynthese, was darauf hindeutet, dass Strukturen in dieser Region die effiziente Übersetzung der mRNA verhindern (Kocarek *et al.* 2000). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit lässt diese Annahme ebenfalls vermuten. Die erhöhte relative mRNA-Konzentration von CYP2E1 durch die polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte spiegelte sich nicht in einer gleichermaßen erhöhten relativen Proteinkonzentration wider. Zudem konnten Tambyrajah *et al.* (2004) nachweisen, dass Androstenon in der Lage ist, die CYP2E1 Promotoraktivität zu vermindern, wodurch die gebildete mRNA dementsprechend nicht effektiv translatiert wird. Tiere mit

einem hohen Androstenongehalt im Fettgewebe haben vermutlich deswegen eine niedrige CYP2E1-Expression. Der Androstenongehalt der Eber in der vorliegenden Arbeit lag in allen Gruppen noch über dem Grenzwert von 0,5-1 µg/g Fettgewebe und unterschied sich auch nicht signifikant zwischen den Gruppen. Es kann vermutet werden, dass auch die CYP2E1-Hemmung durch Androstenon dazu beigetragen hat, dass die vermehrt gebildete mRNA nicht in aktives Protein umgesetzt wurde. Zwar wurde die relative Proteinkonzentration von CYP2E1 durch den Zusatz des Hopfenextraktes noch signifikant auf das 1,8-fache gesteigert, doch unterschied sich die CYP2E1-Aktivität in dieser Gruppe zur Kontrolle nicht mehr signifikant. Von Zamaratskaia *et al.* (2007) wurde nachgewiesen, dass Androstenon die CYP2E1-Aktivität durch Bindung an die gleiche Substratbindungsstelle hemmen kann. Auch dies kann dazu beigetragen haben, dass keine Steigerung der Aktivität trotz erhöhter mRNA im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte.

Die Aktivität der SULT1A1 kann durch schwarzen, grünen und Oolong Tee gehemmt werden (Nishimuta *et al.* 2007). Es wird vermutet, dass Catechine für diese Hemmung verantwortlich sind (Nishimuta *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde durch den Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte relative mRNA-Konzentration von SULT1A1 durch grünen Tee nachgewiesen, nicht aber eine Aktivitätssteigerung. Die Aktivität von SULT1A1 unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. Eine Hemmung konnte im Rahmen dieser Arbeit also nicht nachgewiesen werden. Demzufolge sind auch für SULT1A1 posttranskriptionale und posttranslationale Modifizierungen wahrscheinlich, die dazu geführt haben, dass die vermehrt gebildete mRNA nicht in ein aktives Protein umgesetzt wurde.

Auch für SULT2A1 wird vermutet, dass die Produktion auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Sinclair *et al.* (2006) konnten in einer Untersuchung zeigen, dass die SULT2A1 mRNA-Konzentration bei Schweinen um das 2,8-fache höher war als die Proteinkonzentration. Auch dieses Ergebnis deckt sich mit dem der vorliegenden Arbeit, da die durch den Zusatz von grünem Tee erhöhte SULT2A1 mRNA-Konzentration mittels Western Blot nicht bestätigt werden konnte.

Die Beobachtung, dass die für den Androstenon- und Skatolmetabolismus relevanten Enzyme in ihrer Aktivität nicht beeinflusst wurden, deckt sich mit den Ergebnissen der Androstenon- und Skatolmessung im Rückenspeck der Eber. Es wurde keine Verminderung durch den Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte erreicht, obwohl alle bedeutsamen Gene in ihrer mRNA-Expression hochreguliert wurden. Daraus kann abgeleitet werden, dass der Abbau von Androstenon und Skatol

offensichtlich durch einen Zusatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten nicht beeinflusst werden kann. Die Hypothese, dass die polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte über den Nrf2-Signalweg den Androstenon- und Skatolgehalt im Fettgewebe vermindern, konnte somit im Rahmen dieser Experimente nicht verifiziert werden.

Allerdings konnte von Rasmussen *et al.* (2012b) erstmals nachgewiesen werden, dass durch den Zusatz von 10 % getrockneten Zichorienwurzeln zum Futter von Ebern zwei Wochen vor der Schlachtung die Androstenonkonzentration im Fettgewebe vermindert werden konnte. Die Autoren vermuten, dass diese Reduktion durch eine Induzierung der 3 β -HSD hervorgerufen wurde, da in der Leber eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression der durch den Zusatz der Zichorienwurzeln beobachtet werden konnte. Die 3 β -HSD reduziert Androstenon in einer Phase I Reaktion zu β -Androstenol (Doran *et al.* 2004, Kim *et al.* 2013). *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass das Sesquiterpenlacton Lactucin aus Zichorienwurzeln die 3 β -HSD- und die SULT2A1 mRNA hochreguliert (Rasmussen und Ekstrand 2014). Es wird jedoch nicht ausgeschlossen, dass weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe für die Hochregulation verantwortlich sind. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Genexpression von Enzymen, die wichtig für den Androstenonmetabolismus sind, durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sehr komplex reguliert werden (Rasmussen und Ekstrand 2014). Es ist bekannt, dass neben Nrf2 weitere Transkriptionsfaktoren in den Androstenon- und Skatolmetabolismus involviert sind (Gray und Squires 2013). Für die Transkriptionsfaktoren CAR, PXR und FXR wurde die Aktivierung von Phase I und Phase II Enzymen in primären Schweinehepatozyten nachgewiesen, die die Androstenon- und Skatolkonzentration beeinflussen können (Sinclair *et al.* 2006; Gray und Squires 2013). PXR scheint bei Schweinen ein bedeutender Rezeptor im hepatischen Fremdstoffstoffwechsel zu sein. Es wurde nachgewiesen, dass PXR die CYP2A19-Expression hochreguliert. Außerdem wurde die Androstenonkonzentration durch eine Transaktivierung von PXR signifikant reduziert. Eine Transaktivierung von FXR, der eigentlich hauptsächlich für die Gallensäuresynthese und dem Gallensäuremetabolismus verantwortlich ist, führte zu einer erhöhten CYP2E1-Expression, die in einer erhöhten Produktion von 6-Hydroxyskatol resultierte. Eine gesteigerte 6-Hydroxyskatolproduktion deutet auf einen verbesserten Skatolabbau hin, da 6-Hydroxyskatol ein Hauptabbaustoff im Skatolmetabolismus darstellt (Gray und Squires 2013). Sinclair *et al.* (2006) konnten zeigen, dass CAR, PXR und FXR eine Rolle in der SULT2A1 Regulation spielen. Diese Beobachtungen zeigen, dass eine Behandlung, die zu einer Transaktivierung von CAR, PXR und FXR führt, in Hepatozyten den Abbau von Skatol und Androstenon erhöhen können (Gray und Squires 2013).

Es muss kritisch angemerkt werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, besonders die der qPCR-Analyse und der Androstenon-, Indol- und Skatolmessung von einer sehr hohen Streuung begleitet wurden. Ursächlich dafür kann die versuchsbedingt geringe Tieranzahl pro Gruppe gewesen sein. Ebergeruch stellt ein sehr individuelles Merkmal dar, auf das viele Faktoren einen Einfluss haben. Das Merkmal Ebergeruch kann zwischen verschiedenen Rassen und auch innerhalb einer Rasse stark variieren (Aldal *et al.* 2005). Starke Streuungen der Androstenon-, Indol- und Skatolkonzentrationen stellen deshalb keine Seltenheit dar. Weiterführende Untersuchungen sollten aus diesem Grund mit einer deutlich höheren Tieranzahl pro Behandlungsgruppe durchgeführt werden.

Entgegen der aufgestellten Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit die Skatolkonzentration im Rückenspeck trotz unveränderter Enzymaktivität durch den Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte überraschenderweise stark erhöht. Der Skatol- und Indolgehalt im Fettgewebe von Ebern kann auf vielen Stufen beeinflusst werden. Neben dem Alter und dem Geschlecht, können die Haltung und die Fütterung einen großen Einfluss auf die Bildung und den Abbau von Skatol und Indol ausüben (Wesoly und Weiler 2012). Es ist nachgewiesen, dass hygienische Haltungsbedingungen zu einer verminderten Einlagerung von Skatol im Fettgewebe der Tiere führen (Andersson *et al.* 1997). Es wird vermutet, dass Eber, die in unsauberen Verhältnissen gehalten werden, Skatol, das sich im ausgeschiedenen Kot befindet, passiv über die Atemwege aufnehmen und deswegen vermehrt Skatol im Fettgewebe einlagern (Lindermayer 2010). Aus diesem Grund ist bei der Ebermast besonders wichtig auf eine angemessene Stallhygiene zu achten. Dieser Sachverhalt scheint in der vorliegenden Arbeit nicht zu der erhöhten Skatolkonzentration im Fettgewebe beigetragen zu haben, da alle Gruppen gleich gehalten wurden und auf eine angemessene Stallhygiene geachtet wurde. Neben den Haltungsbedingungen spielt die Fütterung im Bezug auf den Skatolgehalt im Fettgewebe der Eber eine große Rolle. Der Einsatz von präbiotisch wirksamen Pflanzenbestandteilen kann den Skatolgehalt merklich vermindern (Claus *et al.* 1994; Claus *et al.* 2003; Zamaratskaia *et al.* 2006; Hansen *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Hansen *et al.* 2008; Vhile *et al.* 2012; Zammerini *et al.* 2012). Wie bereits erläutert, entsteht Skatol im Colon durch den bakteriellen Abbau von Tryptophan (Jensen *et al.* 1995). Quellen für Tryptophan im Dickdarm können abgestoßene Darmzellen oder schlecht verdauliche Proteine sein. Wenn genügend fermentierbare Kohlenhydrate im Dickdarm vorhanden sind, werden diese von den Mikroorganismen bevorzugt als Energiequelle genutzt. Solange diese verfügbar sind, wird die Proteolyse durch Bakterien reduziert und die Skatolproduktion

dementsprechend gesenkt. Sind die Kohlenhydrate allerdings leicht fermentierbar und dadurch schnell aufgebraucht, wechselt der saccharolytische zum proteolytischen Stoffwechsel und die Skatolsynthese steigt wieder an, da die Bakterien Tryptophan nun zur Energiegewinnung heranziehen und nicht in Bakterienprotein einbauen (Li *et al.* 2009). Deswegen kann angenommen werden, dass durch eine Veränderung der Tryptophanverfügbarkeit die Skatolbildung im Dickdarm beeinflusst werden kann (Claus *et al.* 1994). Ein Großteil der Polyphenole wird im Dünndarm nicht absorbiert und gelangt in den Dickdarm. Im Dickdarm werden Polyphenole von den Mikroorganismen als Energiequelle genutzt (Hervert-Hernandez *et al.* 2009). Skatol wird im Darm hauptsächlich durch *Clostridien* oder *Lactobacillen* synthetisiert (Yokoyama *et al.* 1977; Jensen *et al.* 1995). Denkbar ist, dass durch den Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte mehr unverdauliches Protein in den Darm gelangt ist, was zu einem erhöhten Tryptophangehalt im Dickdarm geführt hat, wodurch die Skatolsynthese durch die Bakterien gesteigert wurde. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass durch die unvollständige Absorption der Polyphenole der zugesetzten Pflanzenextrakte die Mikroflora der Eber im Colon derart beeinflusst wurde, dass hauptsächlich Bakterien stimuliert wurden, die für die Skatolsynthese verantwortlich sind. In einer Studie, in der Schweine vierzehn Tage lang ein Futter erhielten, dem 0,2 % Polyphenole aus Tee zugesetzt wurden, stieg der Gehalt an *Lactobacillen* im Faeces der Tiere signifikant an, während *Bacteroidacaen* vermindert wurden (Hara *et al.* 1995). Ebenso wurde in einem Zellversuch beobachtet, dass der Zusatz von Traubentrester das Wachstum des *Lactobacillus acidophilus* stimuliert (Hervert-Hernandez *et al.* 2009). In einer Untersuchung an Menschen, die zehn Tage lang täglich grünen Tee zu sich nahmen, wurde ebenfalls die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota zugunsten von probiotischen Bakterien verändert (Jin *et al.* 2012). Nach Jin *et al.* (2012) bestehen zwei Möglichkeiten, wie grüner Tee die Mikroflora im Darm beeinflusst. Zum einen ist möglich, dass grüner Tee als Präbiotikum wirkt und die entsprechenden probiotischen Bakterien selektiv im Wachstum stimuliert, zum Anderen können Inhaltsstoffe aus grünem Tee antibakterielle Eigenschaften aufweisen und so indirekt als Präbiotika wirken, indem pathogene Bakterien im Darm vermindert werden. Von Lee *et al.* (2006) konnte nachgewiesen werden, dass durch Tee-Polyphenole pathogene Bakterien im humanen Darm gehemmt werden, während probiotische Bakterien relativ unbeeinflusst auf die Behandlung reagieren. Aufgrund der Inhibierung der ungünstigen Bakterien, können die probiotischen Bakterien stärker wachsen. Durch Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe (Fiesel *et al.* 2014) wurde gezeigt, dass Pflanzenextrakte mikrobizid wirken können. Sowohl durch den Zusatz von 1 % Traubentrester als auch durch den Zusatz von 1 % Hopfenextrakt zum Futter von

Ferkeln wurde die Anzahl an Mikroorganismen im Kot vermindert. Eine Reduzierung von Mikroorganismen im Darm resultiert in einer verminderten Fermentation, wodurch die Bildung von flüchtigen Fettsäuren reduziert wird. Dadurch steigt die Apoptoserate im Darm, durch die mehr Tryptophan in den Darm gelangt. Die Konsequenz daraus ist ein Anstieg der Skatolproduktion im Darm, welches sich im Fettgewebe ablagert. Diese Möglichkeiten können den durch die polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte hervorgerufenen erhöhten Skatolgehalt im Rückenspeck der Eber im Rahmen der vorliegenden Arbeit erklären.

6.2 Bedeutung von Präbiotika für die Jungebermast im Bezug auf Ebergeruch

In der Literatur wird beschrieben, dass durch den Einsatz von präbiotisch wirksamen Pflanzenbestandteilen der Skatolgehalt im Fettgewebe von Ebern deutlich vermindert werden kann (Claus *et al.* 1994; Claus *et al.* 2003; Hansen *et al.* 2006; Zamaratskaia *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Byrne *et al.* 2008; Hansen *et al.* 2008; Vhile *et al.* 2012; Zammerini *et al.* 2012). Ein Präbiotikum ist ein unverdaulicher Nahrungsbestandteil, der die Darmflora positiv beeinflussen kann, in dem er das Wachstum oder die Aktivität von gesundheitsförderlichen Bakterien im Dickdarm stimuliert (Gibson und Roberfroid 1995). Mit dem zweiten Ebermastexperiment der vorliegenden Arbeit sollte das Ziel verfolgt werden, mit dem Einsatz von kommerziell erhältlichen präbiotischen Zusatzstoffen, über die Beeinflussung der Darmflora, den Skatolgehalt im Speck der Tiere zu reduzieren. Für diesen Versuch wurden Präparate mit präbiotisch wirksamen Fructooligosacchariden (FOS) und Gluconsäure eingesetzt.

6.2.1 Einfluss von Präbiotika auf die Mastleistung

Präbiotika können über die Beeinflussung der intestinalen Mikroflora die Leistungsdaten von Tieren verbessern. Ein Zusatz von 10 % Reisflocken erhöhte die Konzentration an *Bifidobakterien* im Darm von Ferkeln und verbesserte die Futterverwertung äquivalent zu konventionellen Diäten, die mit leistungsförderlichen Antibiotika supplementiert wurden (Herfel *et al.* 2013). Auch bei Broilern kann durch

den Zusatz von Präbiotika die intestinale Mikroflora so beeinflusst werden, dass sich die Leistung der Broiler verbessert (Mookiah *et al.* 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Veränderungen in den Leistungsparametern der Eber durch den Zusatz von 0,5 % FOS und 1 % Gluconsäure zum Futter beobachtet werden. In einem Versuch mit Ferkeln wurde eine verbesserte Wachstumsleistung durch die Zugabe von Gluconsäure zum Futter nach dem Absetzen der Ferkel beobachtet (Biagi *et al.* 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch den Einsatz von 1 % Gluconsäure zum Futter der Jungeber eine verbesserte Wachstumsleistung statistisch nicht abgesichert werden. Auffallend war, dass die Lebendmassezunahme durch die kombinierte Zugabe von FOS und Gluconsäure im Vergleich zur alleinigen Zugabe von Gluconsäure signifikant vermindert wurde. Auch der Futteraufwand verschlechterte sich im Vergleich zur Gluconsäuregruppe durch die kombinierte Gabe von FOS und Gluconsäure. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die kombinierte Gabe der präbiotischen Stoffe eher ungünstig ist, da FOS die positiven Effekte auf die Lebendmassezunahme und den Futteraufwand von Gluconsäure scheinbar unterdrücken. Im Vergleich mit der aktuellen Literatur konnte festgestellt werden, dass auch der Einsatz von anderen präbiotisch wirksamen Inhaltsstoffen, wie Inulin zu keiner überzeugenden Verbesserung der Mastleistung bei Schweinen führt (Lindermayer *et al.* 2012). Die Autoren schlussfolgern, dass sich der Mehrkostenaufwand im Bezug auf die Mastleistung nicht lohnt. Auch Vhile *et al.* (2012) konnten keinen Einfluss einer Fütterung einer Diät mit dem Zusatz von Topinambur, einer Wurzelknolle, die reichlich Inulin enthält, auf die Wachstumsleistung und die Schlachtkörperqualität nachweisen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte das Fleischmaß, das die Dicke der Muskelmasse angibt, durch den Zusatz der FOS signifikant verbessert werden. Der Zusatz von Gluconsäure und die kombinierten Gabe führte zu einem gleichen Niveau wie bei der Kontrollgruppe. Auch dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine kombinierte Gabe der beiden Präbiotika im Bezug auf die Mastleistung eher ungünstig ist. Die erfolgversprechendsten Ergebnisse scheinen durch den Einsatz von Gluconsäure erzielt werden zu können. Allerdings sollte die optimale Dosierung noch getestet werden, da mit 1 % Gluconsäure im Futter der Tiere eine Verbesserung der Lebendmassezunahme und des Futteraufwands statistisch nicht abgesichert werden konnte.

6.2.2 Einfluss von Präbiotika auf die Darmflora und die Skatolproduktion

Durch den Zusatz von 0,5 % FOS, 1 % Gluconsäure oder der Kombination der beiden Präbiotika zum Futter wurde in der vorliegenden Arbeit die Skatolkonzentration im Fettgewebe der Eber im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant beeinflusst. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu vielen Untersuchungen, in denen der Skatolgehalt im Speck von Schweinen durch den Zusatz von Präbiotika gesenkt werden konnte. So zeigten Lindermayer *et al.* (2012), dass die Anreicherung der Diät von Ebern mit 3 % sowie 10 % Inulin sechs Wochen vor der Schlachtung die Skatolkonzentration unter 50 ng/g Fett senkte. Vor allem durch die Zugabe von 10 % Inulin wies kein Eber mehr einen Skatolgehalt über 50 ng/g Fett auf, wobei einige Tiere sogar das Kastratenniveau von unter 30 ng/g Fett erreichten (Lindermayer *et al.* 2012). Auch der Zusatz von resistenter Kartoffelstärke kann die Skatolkonzentration im Fettgewebe von Ebern deutlich senken (Claus *et al.* 2003). Resistente Stärke kann aus physikalischen Gründen im Dünndarm nicht abgebaut werden, so dass sie im Dickdarm den Bakterien als Energiequelle zur Verfügung steht. So nutzen die Bakterien weniger Tryptophan, das von abgeschilferten Darmepithelzellen stammt zur Energiegewinnung und bilden dadurch weniger Skatol. Nach einer Fütterung mit 578 g rohe Kartoffelstärke/kg Trockenmasse des Futters für 19 Tage wurde ein Skatolgehalt von unter 0,8 ng/g Fett erreicht (Claus *et al.* 2003). Hansen *et al.* (2006) konnten mittels eines Fütterungsversuches zeigen, dass der Zusatz von 25 % unverarbeiteten oder getrockneten Zichorienwurzeln zum Futter von Ebern den Skatolgehalt im Fettgewebe deutlich senken kann. Bereits eine Woche nach dem Zusatz der Zichorienwurzeln wurde eine reduzierte Skatolkonzentration im Plasma und Fettgewebe nachgewiesen. Der Effekt blieb bis zu 9 Wochen bestehen. Die Reduzierung der Skatolkonzentration durch Zichorienwurzeln ist unabhängig von Geschlecht und Fütterungsdauer (Byrne *et al.* 2008). Zichorienwurzeln sind besonders reich an Inulin, weswegen die Skatolreduktion hauptsächlich auf Inulin zurückgeführt wird (Hansen *et al.* 2006). Diese Beobachtung konnte von Aluwé *et al.* (2013) bestätigt werden. Eber erhielten 10 Tage vor der Schlachtung einen Zusatz von 5 % getrocknetem Zichorienbrei und 5 % getrockneten Zichorienwurzeln. Der Skatolgehalt im Fettgewebe wurde in dieser Untersuchung ebenfalls signifikant vermindert. Auch ein Zusatz von Topinambur zum Futter kann die Skatolkonzentration in Faeces und Fettgewebe von Ebern deutlich senken (Vhile *et al.* 2012). Schon eine Woche nach dem Zusatz von 4-12 % Topinambur beobachteten die Forscher eine dosisabhängige

Senkung der Skatolkonzentration im Fettgewebe der Eber. All diese aufgeführten Studien lassen vermuten, dass der Einsatz von chemischen Verbindungen, die wie Inulin präbiotisch wirksam sind und in geringeren Dosierungen eingesetzt werden können, ebenfalls zu einer Reduzierung des Skatolgehalts im Fettgewebe von Ebern führt. In der vorliegenden Arbeit wurden für diesen Zweck Fructooligosaccharide und Gluconsäure eingesetzt. FOS sind Mehrfachzucker, die in den oberen Darmabschnitten nicht verdaut werden und den Bakterien so im Dickdarm als Energiequelle zur Verfügung stehen. Gluconsäure ist ein Oxidationsprodukt von Glucose und wird nur zu einem geringen Anteil absorbiert (Deppenmeier *et al.* 2002). Wie FOS, stellt Gluconsäure eine Energiequelle für Bakterien im Dickdarm dar. Howard *et al.* (1995) wiesen nach, dass der Zusatz von 3 g FOS/Tag bei Ferkeln die mikrobielle Fermentation stimuliert. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz von FOS den Tryptophanabbau vermindert und dadurch zu einer reduzierten Skatolbildung durch Bakterien führt (Xu *et al.* 2002). Skatol wird zum großen Teil durch *Clostridien* produziert. Nach Vhile *et al.* (2012) führt der Zusatz von Präbiotika vermutlich zu einem verminderten Wachstum von *Clostridien* und damit zur reduzierten Skatolproduktion im Darm. Zudem stimulieren Präbiotika das Wachstum von *Bifidobakterien* und *Lactobacillen* (Hansen *et al.* 2006). In der vorliegenden Arbeit führte der Zusatz von FOS oder Gluconsäure jedoch zu keiner Verminderung der Skatolkonzentration im Fettgewebe. Deutlich ist, dass in den aufgeführten Studien wesentlich größere Mengen an Präbiotika eingesetzt wurden. Daher ist sehr wahrscheinlich, dass der Einsatz von 0,5 % FOS und 1 % Gluconsäure zum Futter der Jungeber nicht ausreichend war, um den Skatolgehalt im Fettgewebe zu beeinflussen. Um zu überprüfen ob eine veränderte bakterielle Fermentation im Darm der Eber durch die Zulage der Präbiotika hervorgerufen wurde, wurde die Konzentration der SCFA im Kot bestimmt. Durch den Zusatz von Präbiotika im Futter wird im Normalfall die Produktion von SCFA im Darm der Tiere stimuliert und der pH-Wert gesenkt (Claus *et al.* 2003, Vhile *et al.* 2012, Mookiah *et al.* 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde kein Anstieg der Gesamt-SCFA-Konzentration im Kot festgestellt. Wenn die Konzentration an SCFA nicht ansteigt, wird die Apoptoserate der Darmepithelzellen nicht gesenkt. Die Menge an Tryptophan, das durch abgestoßene Darmepithelzellen in den Dickdarm gelangt, kann dadurch nicht reduziert werden, so dass die Bakterien es weiterhin zur Energiegewinnung heranziehen und dabei Skatol produzieren. Dies könnte für den unveränderten Skatolgehalt im Fettgewebe der Eber verantwortlich sein. Allerdings wurden in vielen Studien die SCFA nicht im Kot, sondern im Darminhalt von Caecum oder Colon bestimmt (Campos *et al.* 2012; Mookiah *et al.* 2014). Die Konzentration der SCFA steigt im Caecum und im proximalen Colon an, während die Konzentration im

Rektum wieder abnimmt. SCFA im Kot spiegeln den Gehalt im Darm nicht genau wieder (While *et al.* 2012). Organische Säuren werden im Darm über die Darmwand absorbiert. Erst wenn die intestinale Absorptionskapazität gesättigt ist, akkumulieren SCFA im Chymus (Biagi *et al.* 2006). Zudem sind SCFA, sobald sie mit Sauerstoff in Berührung kommen, sehr leicht flüchtig, weswegen die Bestimmung im Kot ungenau sein könnte.

Interessanterweise wurde die Indolkonzentration im Rückenspeck durch den Zusatz der präbiotischen Stoffe erhöht. Da Indol eine Vorstufe für Skatol darstellt, kann es ebenso zum Auftreten von Ebergeruch beitragen. In der vorliegenden Arbeit steigerte die Zugabe von 1 % Gluconsäure sowie die kombinierte Zugabe von 0,5 % FOS und 1 % Gluconsäure die Indolkonzentration im Fettgewebe signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Einfluss von FOS und Gluconsäure auf die Indolkonzentration im Rückenspeck der Eber scheint sich zu addieren. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit deckt sich zum Teil mit einer *in vitro* Untersuchung von Xu *et al.* (2002), in der 0,5-1,5 % FOS zu einem Medium einer Bakterienpopulation, wie sie im Darm von Schweinen vorkommt, zugesetzt wurde. Der Zusatz der FOS führte dabei zu einem signifikant erniedrigten Tryptophanabbau, wodurch eine signifikante Verminderung der Skatolkonzentration im Medium beobachtet werden konnte. Die Indolkonzentration wurde durch den Zusatz der FOS signifikant erhöht, während der pH-Wert signifikant erniedrigt wurde (Xu *et al.* 2002). Wie zuvor bereits erwähnt, kann Tryptophan durch viele verschiedene Bakterien zu Indol oder Indolessigsäure abgebaut werden, während die weitere Umwandlung zu Skatol hauptsächlich durch *Clostridien* und *Lactobacillen* hervorgerufen wird. Xu *et al.* (2002) schlussfolgern, dass die Inhibierung der Skatolproduktion durch ein verändertes Bakterienmilieu hervorgerufen wurde. Ein signifikanter Anstieg von *Bifidobakterien* wurde von einer signifikanten Hemmung von *E.coli* und *Clostridien* durch den Zusatz der FOS begleitet (Xu *et al.* 2002). In einer neueren Untersuchung konnten Rasmussen *et al.* (2012) in einem *in vivo* Versuch nachweisen, dass die Zugabe von 10 % Zichorienwurzeln zum Futter von Schweinen zu einer signifikanten Erhöhung der Indolkonzentration im Fettgewebe führte, während der Skatolgehalt unverändert blieb. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Auch in einer Untersuchung von Aluwé *et al.* (2013) wurde eine signifikant erhöhte Indolkonzentration durch den Zusatz von 5 % getrocknetem Zichorienbrei und 5 % getrockneten Zichorienwurzeln festgestellt. Dass sich die Bakterienflora durch den Einsatz von Präbiotika im Darm verändert, ist in zahlreichen Publikationen zu finden. So zeigten Jensen *et al.* (2013), dass durch den Zusatz von 25 % Lupinen zum Futter von Schweinen eine Woche vor der Schlachtung der Gehalt an *Campylobacter spp.* Bakterien im Caecum merklich reduziert werden konnte,

während *Bifidobakterien* im Wachstum und ihrer Aktivität gesteigert wurden. Lupine sind reich an Oligosacchariden und aus diesem Grund präbiotisch wirksam. Durch diese aufgeführten Studien wird deutlich, dass das Bakterienmilieu im Darm durch eine gezielte Fütterung mit Präbiotika positiv beeinflusst werden kann. Xu *et al.* (2002) gehen davon aus, dass durch den Zusatz von FOS mehr Indolbildner im Darm stimuliert werden. Diese Theorie könnte für das Ergebnis des zweiten Ebermastversuches der vorliegenden Arbeit ebenfalls zutreffen. Es ist möglich, dass die erhöhte Indolkonzentration durch die kombinierte Zugabe von FOS und Gluconsäure in der vorliegenden Arbeit trotz eines unveränderten pH-Wertes und einer unveränderten bakteriellen Fermentation durch eine veränderte Bakterienpopulation im Darm der Tiere hervorgerufen wurde. Eine Studie von Herfel *et al.* (2013) bestärkt die Annahme. In dieser Studie wurden *Bifidobakterien* im Darm durch den Zusatz von präbiotisch wirksamen Reisflocken zum Futter von Ferkeln signifikant erhöht, während keine gesteigerte bakterielle Fermentation im Darm nachgewiesen werden konnte. Die eingesetzte Dosis in der vorliegenden Arbeit scheint zu gering gewesen zu sein, um einen stärkeren Effekt und dadurch eine veränderte bakterielle Fermentation hervorzurufen.

6.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Vermeidung von Ebergeruch wird auch in Zukunft eine wichtige Rolle in der Schweinemast spielen. Durch das Verbot der betäubungslosen Kastration besteht weiterhin großer Forschungsbedarf in Möglichkeiten zur Verminderung von Ebergeruch. Die Fütterung von Jungebern stellt dabei einen wichtigen Ansatzpunkt dar. Die positive Beeinflussung des Skatolgehaltes im Fettgewebe durch den Einsatz von Präbiotika konnte in vielen Studien bewiesen werden. Eine zuverlässige Fütterungsmethode zur Reduzierung der Androstenonkonzentration konnte dagegen bisher nicht gefunden werden. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass die Androstenon- und Skatolkonzentration im Fettgewebe von Ebern über die Fütterung von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten nur schwer beeinflusst werden kann. Es wurde deutlich, dass der Zusatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten zum Futter Nr2-Zielgene auf mRNA-Ebene in der Leber hoch regulieren kann. Die stärksten Effekte wurden durch grünen Tee hervorgerufen, der allerdings von den Ebern nicht gerne angenommen wurde, was in verschlechterten Leistungs- und Schlachtdaten resultierte. Die dadurch verursachten

höheren Fütterungskosten würden die Wirtschaftlichkeit der Ebermast verschlechtern. Die starke Hochregulation der Nrf2-Zielgene auf Transkriptionsebene konnte sich zudem auf Protein- und Aktivitätsebene nicht widerspiegeln. Posttranskriptionale und posttranslationale Modifizierungen sowie der über dem Grenzwert liegende Androstenon- und Skatolmetabolismus können dafür verantwortlich sein. Insgesamt deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zwar darauf hin, dass über eine spezifische Fütterung mit polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten der Androstenon- und Skatolmetabolismus auf Ebene der Transkription und zum Teil auf Ebene der Translation beeinflusst werden kann, diese Beeinflussung jedoch keine Auswirkung auf die Aktivität von relevanten Enzymen im Androstenon- und Skatolmetabolismus und damit auf den Androstenon- und Skatolgehalt im Fettgewebe hat. So konnte die Hypothese, dass die polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte über den Nrf2-Signalweg die Androstenon- und Skatolkonzentration im Fettgewebe von Ebern reduzieren, im Rahmen der durchgeführten Versuche nicht bestätigt werden. Auf diesem Gebiet besteht weiterhin großer Forschungsbedarf. Neuere Untersuchungen geben beispielsweise Hinweise darauf, dass nicht nur der Skatolmetabolismus durch Androstenon, sondern auch der Androstenonmetabolismus durch Skatol beeinflusst werden kann (Rasmussen und Ekstrand 2014). Anhand der durchgeführten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte nicht verifiziert werden, dass Nrf2 in die transkriptionelle Regulation von Enzymen des Androstenon- und Skatolmetabolismus involviert ist, da bereits in der Kontrollgruppe eine Nrf2-Aktivierung nachgewiesen wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass Enzyme des Androstenon- und Skatolmetabolismus durch weitere Kernrezeptoren reguliert werden, die ebenfalls durch Polyphenole aktiviert werden können. Um den genauen molekularen Mechanismus zu verstehen, müssten neben Nrf2 weitere Transkriptionsfaktoren betrachtet werden. Es muss beachtet werden, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch den Zusatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten die Skatolkonzentration im Fettgewebe der Eber signifikant erhöht wurde, da entweder Skatolbildende Bakterien stimuliert wurden, oder die Tryptophanverfügbarkeit im Dickdarm durch eine unvollständige Absorption der Polyphenole erhöht wurde. Ein erhöhter Skatolgehalt könnte wiederum den Abbau von Androstenon hemmen (Rasmussen und Ekstrand 2014). Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen des ersten Ebermastversuches schlussfolgern, dass über die Fütterung von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten der Androstenon- und Skatolmetabolismus über den Nrf2-Signalweg nicht beeinflusst werden kann.

Trotz der gut begründeten Hypothese einer Skatolreduktion durch präbiotisch wirksame chemische Verbindungen, konnte dieses Ziel im Rahmen der vorliegenden

Arbeit nicht erreicht werden. Durch den Zusatz von FOS und Gluconsäure konnte keine verminderte Skatolkonzentration im Rückenspeck nachgewiesen werden. Auch die Konzentration der SCFA und der pH-Wert blieben durch die Behandlung unverändert. Im Vergleich mit der aktuellen Literatur deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass natürlich vorkommende Präbiotika wie Zichorienwurzeln, Topinambur oder resistente Stärke, den isolierten, chemischen Präbiotika in ihrer Wirksamkeit im Bezug auf Ebergeruch vorzuziehen sind. Es ist zudem sehr wahrscheinlich, dass die eingesetzte Dosis mit 0,5 % FOS und 1 % Gluconsäure zu niedrig gewählt wurde. Die, durch den Zusatz der Präbiotika erhöhte Indolkonzentration im Fettgewebe deutet darauf hin, dass das Bakterienmilieu im Darm der Jungeber verändert wurde. Dies ist ein Hinweis darauf, dass FOS und Gluconsäure einen Einfluss auf die im Darm vorkommenden Bakterien hatten, der Effekt jedoch nicht stark genug war, um die bakterielle Fermentation zu steigern und dadurch die Skatolproduktion zu reduzieren. Deswegen sollten in weiterführenden Untersuchungen höhere Konzentrationen (über 1 %) an FOS und Gluconsäure eingesetzt werden um einen präbiotischen Effekt zu erzielen. Versuchsbedingt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Analyse der SCFA nur im Kot durchgeführt werden. Eine Analyse der SCFA bietet sich eher im Colon an, da der Gehalt im Rektum abnimmt und SCFAs sehr leicht flüchtig sind. Auch eine Untersuchung auf molekularer Ebene könnte weitere wichtige Erkenntnisse im Metabolismus von Skatol erbringen. So konnten Rasmussen *et al.* (2011) zeigen, dass Zichorienwurzeln den hepatischen Skatolmetabolismus durch die Aktivierung von CYP450 Enzymen erhöhen können. Zusammengefasst konnte auch mit diesem Ebermastversuch die Hypothese, dass durch die Fütterung von chemisch definierten Präbiotika die Skatolkonzentration im Rückenspeck von Ebern gesenkt werden kann, nicht verifiziert werden.

7 Zusammenfassung

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Hypothese, dass der durch die beiden Leitkomponenten Androstenon und Skatol hervorgerufene Ebergeruch in unkastrierten, männlichen Schweinen über verschiedene Fütterungskonzepte vermindert werden kann. Androstenon ist ein Steroidhormon, das neben Testosteron im Hoden gebildet wird und als Pheromon wirkt. Skatol dagegen entsteht aus dem bakteriellen Abbau der Aminosäure Tryptophan im Darm der Eber. Da beide Stoffe lipophile Eigenschaften aufweisen, können sie im Fettgewebe der Eber akkumulieren. Ebergeruch stellt ein zentrales Problem in der Ebermast dar, da viele Verbraucher in Deutschland ebergeruchbelastetes Fleisch ablehnen. Da sich Ebergeruch erst mit dem Einsetzen der Pubertät der Schweine entwickelt, wurde dieses Problem durch die betäubungslose Kastration von Ferkeln bisher umgangen. Ab dem 1. Januar 2019 wird die betäubungslose Kastration von Ferkeln verboten, so dass nach möglichen Alternativen für die Schweinefleischproduktion gesucht werden muss. Androstenon und Skatol werden beide über den hepatischen Fremdstoffmetabolismus abgebaut. Aus Studien ist bekannt, dass der Fremdstoffmetabolismus durch die Fütterung beeinflusst werden kann. Die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus werden auf transkriptioneller Ebene über den Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (Nrf2) reguliert. Vielfache Studien konnten belegen, dass Nrf2 durch Polyphenole aktiviert werden kann. Der Einsatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten in der Jungebermast und deren Einfluss auf den Nrf2-Signalweg und den Androstenon- und Skatolmetabolismus wurde bisher nicht untersucht. Deshalb sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft werden, dass der Zusatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten zum Futter von Jungebern Nrf2 und seine Zielgene in der Leber aktiviert und dadurch der Abbau von Androstenon und Skatol beschleunigt wird und die Akkumulation der beiden Komponenten im Fettgewebe vermindert werden kann. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden 48 Jungeber in vier Gruppen eingeteilt und entweder mit einem bedarfsdeckenden Futter ohne Zulage oder mit einem Zusatz von jeweils 1 % Traubentrester, Hopfenextrakt oder grünem Tee für 53 Tage lang gefüttert. Mittels *realtime* PCR-Analyse wurde die relative mRNA-Konzentration der Nrf2-Zielgene GPX1, GST, MGST1, SOD, HO-1, NQO1, PRDX6, TXNR1, CYP1A1, CYP2A19, UGT1A1, CYP1A2, CYP2E1, SULT1B1, SULT1A1 und SULT2A1 in der Leber bestimmt. Der Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte führte zu einer Hochregulation der relativen mRNA-Konzentration der Nrf2-Zielgene. Die stärksten

Effekte wurden durch grünen Tee hervorgerufen. Es konnte eine Nrf2-Aktivierung im Leberkernextrakt nachgewiesen werden. Zur Validierung der Ergebnisse wurde die relative Proteinkonzentration von CYP2E1, das ein Hauptenzym im Skatolmetabolismus darstellt und von SULT2A1, das ein Hauptenzym im Androstenonmetabolismus darstellt, ermittelt. Die in der qPCR erhöhte relative mRNA-Konzentration spiegelte sich nicht in einer gleichermaßen erhöhten relativen Proteinkonzentration wider. Auf Proteinebene fielen die Effekte durch die polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte wesentlich geringer aus. Auf Enzymaktivitätsebene zeigten sich keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen. Es wurde keine Androstenonverminderung im Fettgewebe durch den Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte erreicht. Überraschenderweise wurde die Skatolkonzentration im Fettgewebe durch den Zusatz der polyphenolhaltigen Pflanzenextrakte sogar signifikant erhöht. Die Untersuchungen zeigen also, dass durch die Fütterung von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten der Abbau von Androstenon und Skatol nicht signifikant gesteigert werden kann.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese überprüft werden, dass chemisch definierte Präbiotika, die in geringeren Dosierungen als natürliche Präbiotika eingesetzt werden können, über eine gesteigerte bakterielle Fermentation im Darm die Skatolbildung und damit die Einlagerung von Skatol im Fettgewebe vermindern können. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden 48 Eber in vier Gruppen eingeteilt und entweder mit einem bedarfsdeckenden Futter ohne Zulage oder mit einem Zusatz von 0,5 % kurzkettige Fructooligosaccharide (FOS), 1 % Gluconsäure oder einer Kombination der beiden Präbiotika für 32 Tage gefüttert. Es konnte weder eine pH-Wert Veränderung, noch eine Veränderung der Konzentration der flüchtigen Fettsäuren im Kot der Eber durch die Fütterung von FOS und Gluconsäure nachgewiesen werden. Der Skatolgehalt im Fettgewebe wurde durch den Zusatz der Präbiotika nicht gesenkt. Offensichtlich waren die Konzentrationen der eingesetzten Präbiotika zu gering, um einen Einfluss auf die Produktion von Skatol zu bewirken.

Zusammengefasst konnte mit dieser Arbeit die Hypothese, dass Ebergeruch über die Fütterung mit polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten oder mit chemisch definierten Präbiotika vermindert werden kann, nicht verifiziert werden.

8 Summary

The main objective of the present study was to determine whether boar taint of entire male pigs can be decreased by using different feeding strategies. Boar taint is mainly caused by the key components androstenone and skatole. Androstenone is a steroid hormone, which is produced in testis in addition to testosterone and which acts as a pheromone. Skatole, however, originates from the amino acid tryptophane by bacterial degradation in the hindgut. Both components can accumulate in the fatty tissue of the boar, as they show lipophilic characteristics. Boar taint is a pivotal problem in boar fattening, because many consumers are confused by boar taint contaminated meat. This problem has been avoided by castration of piglets without anesthesia so far, since boar taint is only being developed with the onset of puberty of pigs. From January 1st 2019, the castration of piglets without anesthesia will be prohibited, so that it is necessary to look for possible alternatives for pork production. Androstenone and skatole both are being degraded via the hepatic metabolism of xenobiotic substances. It is known from studies that the hepatic metabolism of xenobiotic substances can be influenced by feeding. The enzymes of the metabolism of xenobiotic substances are regulated at transcriptional level by the transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Numerous studies have shown that Nrf2 can be activated by polyphenols. In the young boar fattening the use of plant extracts containing polyphenols and the influence on the Nrf2 pathway and androstenone- and skatole metabolism has not been investigated to date. Therefore the hypothesis in the first part of this study should be reviewed that adding plant extracts containing polyphenols to the diet of young boars leads to an activation of Nrf2 and its target genes in the liver. The degradation of androstenone and skatole is thus accelerated and the accumulation of androstenone and skatole in the fatty tissue is decreased. To verify this hypothesis 48 boars were splitted into four groups and were fed for 53 days either with nutritionally adequate diets without supplement or with 1% grape seed and grape marc meal extract, 1% spent hops or 1% green tea extract added to their food. By realtime PCR-analysis the relative mRNA concentration of Nrf2 target genes GPX1, GST, MGST1, SOD, HO-1, PRDX6, TXNR1, CYP1A1, CYP2A19, UGT1A1, CYP1A2, CYP2E1, SULT1B1, SULT1A1 and SULT2A1 was measured in the liver. The addition of plant extract containing polyphenols led to an upregulation of the relative mRNA concentration. The strongest effects were caused by green tea. It could be shown that Nrf2 activation took place in liver nuclear extract. To validate these findings the relative protein concentration of CYP2E1 and SULT2A1, key enzyme of the skatole- and

androstenone metabolism, was measured. The relative mRNA concentration was not reflected in the relative protein concentration. The effects of the plant extracts containing polyphenols were smaller at protein level. A difference in activity of the studied enzymes between the groups could not be determined in the present paper. In addition, a reduction of androstenone concentration was not achieved by adding plant extracts containing polyphenols. The skatole level was surprisingly even significantly increased by addition of the polyphenol-rich plant products in adipose tissue. So these investigations show that feeding of polyphenol-rich plant products does not increase the degradation of androstenone and skatole significantly.

The second part of this work should review whether selected chemical prebiotics, which can be used in lower doses than natural prebiotics, can reduce the synthesis of skatole and thereby decrease the accumulation of skatole in the adipose tissue via an increased bacterial fermentation in the hindgut. To verify this hypothesis 48 boars were splitted into four groups and were fed for 32 days either with a nutritionally adequate diet without supplements or with 0,5% fructooligosacchrides (FOS), 1% gluconic acid or a combination of both prebiotics added to their food. Neither the pH in feces nor the concentration of volatile fatty acids in feces of boars were influenced by feeding with supplements of FOS or gluconic acid. The skatole concentration in adipose tissue was not reduced by addition of prebiotics. The concentrations of the used prebiotics were obviously under dosed to influence the production of skatole.

In summary, the aim to reduce boar taint via feeding boars with supplements of plant extracts containing polyphenols or with selected chemical prebiotics could not be verified with the present study.

9 Literaturverzeichnis

- Aldal, I.**; Andresen, Ø.; Egeli, A. K.; Haugen, J-E.; Grodum, A.; Fjetland, O.; Eikaas, J. L. H. (2005): Levels of androstenone and skatole and the occurrence of boar taint in fat from young boars. In: *Livestock Production Science* 95, S. 121–129.
- Aluwé, M.**; Langendries, K C M; Bekaert, K. M.; Tuytens, F A M; De Brabander, D L; Smet, S. de; Millet, S. (2013): Effect of surgical castration, immunocastration and chicory-diet on the meat quality and palatability of boars. In: *Meat Sci* 94 (3), S. 402–407.
- Andersson, K.**; Brunius, C.; Zamaratskaia, G.; Lundström, K. (2012): Early vaccination with Improvac®: effects on performance and behaviour of male pigs. In: *Animal* 6 (1), S. 87–95.
- Andersson, K.**; Schaub, A.; Lundström, K.; Thomke, S.; Hansson, I. (1997): The effect of feeding system, lysine level and gilt contact on performance, skatole levels and economy of entire male pigs. In: *Livestock Production Science* 51, S. 131–140.
- Andresen, Ø.** (2006): Boar taint related compounds: Androstenone/skatole/other substances. In: *Acta Vet Scand* 48 (Suppl 1), S. S5.
- Auger, C.**; Gérain, P.; Laurent-Bichon, F.; Portet, K.; Bornet, A.; Caporiccio, B. *et al.* (2004): Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect. In: *J Agric Food Chem* 52 (16), S. 5297–5302.
- Augustin, K.**; Blank, R.; Boesch-Saadatmandi, C.; Frank, J.; Wolffram, S.; Rimbach, G. (2008): Dietary green tea polyphenols do not affect vitamin E status, antioxidant capacity and meat quality of growing pigs. In: *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 92 (6), S. 705–711.
- Babol, J.**; Squires, E. J.; Lundstrom, K. (1998b): Relationship between oxidation and conjugation metabolism of skatole in pig liver and concentrations of skatole in fat. In: *J Anim Sci* 76 (3), S. 829–838.
- Babol, J.**; Squires, E. J.; Lundström, K. (1998a): Hepatic metabolism of skatole in pigs by cytochrome P450E1. In: *J Anim Sci* 76, S. 822–828.

- Babol, J.;** Zamaratskaia, G.; Juneja, R.K; Lundström, K. (2004): The effect of age on distribution of skatole and indole levels in entire male pigs in four breeds: Yorkshire, Landrace, Hampshire and Duroc. In: *Meat Sci* 67, S. 351–358.
- Baeuerle, P. A.;** Henkel, T. (1994): Function and activation of NF-kappa B in the immune system. In: *Annu Rev Immunol* 12, S. 141–179.
- Bak, M-J.;** Jun, M.; Jeong, W-S. (2012): Procyanidins from Wild Grape (*Vitis amurensis*) Seeds Regulate ARE-Mediated Enzyme Expression via Nrf2 Coupled with p38 and PI3K/Akt Pathway in HepG2 Cells. In: *Int J Mol Sci* 13 (1), S. 801–818.
- Baumgartner, J. (2008):** Die Kastration männlicher Ferkel - Methoden und Bewertung. In: *Nutztierschutztagung Raumberg-Gruppenstein*.
- Baumgartner, J.;** Binder, R.; Hagmüller, W.; Hofbauer, P.; Iben, C.; Scala, U. S.; Winckler, C. (2004): Aktuelle Aspekte der Kastration männlicher Ferkel 2. Mitteilung: Alternativmethoden zur chirurgischen Kastration und zusammenfassende Bewertung. In: *Vet Med Austria/Wien Tierärztl Mschr* 91, S. 198–209.
- Biagi, G.;** Piva, A.; Moschini, M.; Vezzali, E.; Roth, F. X. (2006): Effect of gluconic acid on piglet growth performance, intestinal microflora, and intestinal wall morphology. In: *J Anim Sci* 84 (2), S. 370–378.
- Bonneau, M.;** Walstra, P.; Claudi-Magnussen, C.; Kempster, A. J.; Tornberg, E.; Fischer, K. *et al.* (2000): An international study on the importance of androstenone and skatole for boar taint: IV. Simulation studies on consumer dissatisfaction with entire male pork and the effect of sorting carcasses on the slaughter line, main conclusions and recommendations. In: *Meat Sci* 54 (3), S. 285–295.
- Bornhoeft, J.;** Castaneda, D.; Nemoseck, T.; Wang, P.; Henning, S. M.; Hong, M. Y. (2012): The protective effects of green tea polyphenols: lipid profile, inflammation, and antioxidant capacity in rats fed an atherogenic diet and dextran sodium sulfate. In: *J Med Food* 15 (8), S. 726–732.
- Byrne, D. V.;** Thamsborg, S. M.; Hansen, L. L. (2008): A sensory description of boar taint and the effects of crude and dried chicory roots (*Cichorium intybus* L.) and inulin feeding in male and female pork. In: *Meat Sci* 79 (2), S. 252–269.

- Campos, D.;** Betalleluz-Pallardel, I.; Chirinos, R.; Aguilar-Galvez, A.; Noratto, G.; Pedreschi, R. (2012): Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. In: *Food Chem* 135 (3), S. 1592–1599.
- Ceh, B.;** Kac, M.; Košir, I. J.; Abram, V. (2007): Relationships between Xanthohumol and Polyphenol Content in Hop Leaves and Hop Cones with Regard to Water Supply and Cultivar. In: *IJMS* 8 (9), S. 989–1000.
- Chamorro, S.;** Viveros, A.; Centeno, C.; Romero, C.; Arija, I.; Brenes, A. (2013): Effects of dietary grape seed extract on growth performance, amino acid digestibility and plasma lipids and mineral content in broiler chicks. In: *Animal* 7 (4), S. 555–561.
- Chen, C.;** Yu, R.; Owuor, E. D.; Kong, A. N. (2000): Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. In: *Arch Pharm Res* 23 (6), S. 605–612.
- Chen, G.;** Cue, R. A.; Lundstrom, K.; Wood, J. D.; Doran, O. (2008): Regulation of CYP2A6 protein expression by skatole, indole, and testicular steroids in primary cultured pig hepatocytes. In: *Drug Metab Dispos* 36 (1), S. 56–60.
- Chen, G.;** Zamaratskaia, G.; Andersson, K.; Lundström, K. (2007): Effect of raw potato starch and live weight on fat and plasma skatole, indole and androstenone levels measured by different methods in entire male pigs. In: *Food Chemistry* (101), S. 439–448.
- Claus, R.;** Dehnhard, M.; Herzog, A.; Bernal-Barragan, H.; Giménez, H. (1993): Parallel measurement of indole and skatole (3-methylindole) in feces and blood plasma of pigs by HPLC. In: *Livestock Production Science* 34, S. 115–126.
- Claus, R.;** Herbert, E.; Dehnhard, M. (1997): Comparative determination of the boar taint steroid androstenone in pig adipose tissue by a rapid enzyme immunoassay and an HPLC-method. In: *Archiv für Lebensmittelhygiene* 2, S. 27–30.
- Claus, R.;** Lösel, D.; Lacorn, M.; Mentschel, J.; Schenkel, H. (2003): Effects of butyrate on apoptosis in the pig colon and its consequences for skatole formation and tissue accumulation. In: *J Anim Sci* 81 (1), S. 239–248.

- Claus, R.;** Weiler, U.; Herzog, A. (1994): Physiological aspects of androstenone and skatole formation in the boar-A review with experimental data. In: *Meat Sci* 38 (2), S. 289–305.
- Das, B. N.;** Kim, Y-W.; Keum, Y-S. (2013): Mechanisms of Nrf2/Keap1-dependent phase II cytoprotective and detoxifying gene expression and potential cellular targets of chemopreventive isothiocyanates. In: *Oxid Med Cell Longev* 2013, S. 839409.
- Day, D. A.;** Tuite, M. F. (1998): Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. In: *J Endocrinol* 157 (3), S. 361–371.
- Dehnhard, M.;** Bernal-Barragan, H.; Claus, R. (1991): Rapid and accurate high-performance liquid chromatographic method for the determination of 3-methylindole (skatole) in faeces of various species. In: *J Chromatogr* 566 (1), S. 101–107.
- Deppenmeier, U.;** Hoffmeister, M.; Prust, C. (2002): Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 60, S. 233–242.
- Diaz, G. J.;** Skordos, K. W.; Yost, G. S.; Squires, E. J. (1999): Identification of phase I metabolites of 3-methylindole produced by pig liver microsomes. In: *Drug Metab Dispos* 27 (10), S. 1150–1156.
- Dietz, B. M.;** Hagos, G. K.; Eskra, J. N.; Wijewickrama, G. T.; Anderson, J. R.; Nikolic, D. *et al.* (2013): Differential regulation of detoxification enzymes in hepatic and mammary tissue by hops (*Humulus lupulus*) in vitro and in vivo. In: *Mol Nutr Food Res* 57 (6), S. 1055–1066.
- Dietz, B. M.;** Kang, Y-H.; Liu, G.; Egger, A. L.; Yao, P.; Chadwick, L. R. *et al.* (2005): Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* Inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. In: *Chem Res Toxicol* 18 (8), S. 1296–1305.
- Doran, E.;** Whittington, F. M.; Wood, J. D.; McGivan, J. D. (2004): Characterisation of androstenone metabolism in pig liver microsomes. In: *Chem Biol Interact* 147 (2), S. 141–149.
- Doran, E.;** Whittington, F. W.; Wood, J. D.; McGivan, J. D. (2002): Cytochrome P450IIE1 (CYP2E1) is induced by skatole and this induction is blocked by androstenone in isolated pig hepatocytes. In: *Chem Biol Interact* 140 (1), S. 81–92.

- Dunshea, F. R.;** Allison, J. R. D.; Bertram, M.; Boler, D. D.; Brossard, L.; Campbell, R. *et al.* (2013): The effect of immunization against GnRF on nutrient requirements of male pigs: a review. In: *Animal* 7 (11), S. 1769–1778.
- Dunshea, F. R.;** Colantoni, C.; Howard, K.; McCauley, I.; Jackson, P.; Long, K. A. *et al.* (2001): Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. In: *J Anim Sci* 79 (10), S. 2524–2535.
- Ellinger, S.;** Müller, N.; Stehle, P.; Ulrich-Merzenich, G. (2011): Consumption of green tea or green tea products: is there an evidence for antioxidant effects from controlled interventional studies? In: *Phytomedicine* 18 (11), S. 903–915.
- Europäische Kommission (2009):** Entscheidung der Kommission vom 11.5.2009 über die Erteilung einer Zulassung für das Tierarzneimittel "Improvac" gemäß der Verordnung (EG) Nr. 726/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates. Online verfügbar unter http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2009/2009051157528/dec_57528_de.pdf, zuletzt geprüft am 21.08.2014.
- Europäische Kommission (2010):** Europäische Erklärung über Alternativen zur chirurgischen Kastration bei Schweinen. Online verfügbar unter http://ec.europa.eu/food/animal/welfare/farm/docs/castration_pigs_declaration_de.pdf, zuletzt geprüft am 21.08.2014.
- Fàbrega, E.;** Velarde, A.; Cros, J.; Gispert, M.; Suarez, P.; Tibau, J.; Soler, J. (2010): Effect of vaccination against gonadotrophin-releasing hormone, using Improvac®, on growth performance, body composition, behaviour and acute phase proteins. In: *Livestock Science* 132 (1), S. 53–59.
- Fiesel, A.;** Gessner, D. K.; Most, E.; Eder, K. (2014): Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and fecal microbiota of weaned pigs. In: *BMC Veterinary Research* (accepted).
- Fredriksen, B.;** Johnsen, A. M. S.; Skuterud, E. (2011): Consumer attitudes towards castration of piglets and alternatives to surgical castration. In: *Res Vet Sci* 90 (2), S. 352–357.

- Fuchs, T.;** Nathues, H.; Koehrmann, A.; Andrews, S.; Brock, F.; Sudhaus, N. *et al.* (2009): A comparison of the carcass characteristics of pigs immunized with a 'gonadotrophin-releasing factor (GnRF)' vaccine against boar taint with physically castrated pigs. In: *Meat Sci* 83 (4), S. 702–705.
- Gessner, D. K.;** Fiesel, A.; Most, E.; Dinges, J.; Wen, G.; Ringseis, R.; Eder, K. (2013): Supplementation of a grape seed and grape marc meal extract decreases activities of the oxidative stress-responsive transcription factors NF- κ B and Nrf2 in the duodenal mucosa of pigs. In: *Acta Vet Scand* 55 (1), S. 18.
- Gessner, D. K.;** Ringseis, R.; Siebers, M.; Keller, J.; Kloster, J.; Wen, G.; Eder, K. (2012): Inhibition of the pro-inflammatory NF- κ B pathway by a grape seed and grape marc meal extract in intestinal epithelial cells. In: *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 96 (6), S. 1074–1083.
- Gibson, G. R.;** Roberfroid, M. B. (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. In: *J Nutr* 125 (6), S. 1401–1412.
- Gray, M. A.;** Squires, E. J. (2013): Effects of nuclear receptor transactivation on boar taint metabolism and gene expression in porcine hepatocytes. In: *J Steroid Biochem Mol Biol* 133, S. 110–119.
- Han, S. G.;** Han, S-S.; Toborek, M.; Hennig, B. (2012): EGCG protects endothelial cells against PCB 126-induced inflammation through inhibition of AhR and induction of Nrf2-regulated genes. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 261 (2), S. 181–188.
- Hansen, L.;** Mejer, H.; Thamsberg, S. M.; Byrne, D. V.; Roepstoff, A.; Karlsson, A. H. *et al.* (2006): Influence of chicory roots (*Cichorium intybus* L) on boar taint in entire male and female pigs. In: *Animal Science* 82 (3), S. 359–368.
- Hansen, L. L.;** Stolzenbach, S.; Jensen, J. A.; Henckel, P.; Hansen-Møller, J.; Syriopoulos, K.; Byrne, D. V. (2008): Effect of feeding fermentable fibre-rich feedstuffs on meat quality with emphasis on chemical and sensory boar taint in entire male and female pigs. In: *Meat Sci* 80 (4), S. 1165–1173.
- Hara, H.;** Orita, N.; Hatano, S.; Ichikawa, H.; Hara, Y.; Matsumoto, N. *et al.* (1995): Effect of tea polyphenols on fecal flora and fecal metabolic products of pigs. In: *J Vet Med Sci* 57 (1), S. 45–49.

- Hay, M.**; Vulin, A.; Génin, S.; Sales, P.; Prunier, A. (2003): Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days. In: *Applied Animal Behaviour Science* 82 (3), S. 201–218.
- He, C. H.**; Gong, P.; Hu, B.; Stewart, D.; Choi, M. E.; Choi, A. M.; Alam, J. (2001): Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. In: *J Biol Chem* 276 (24), S. 20858–20865.
- Herfel, T.**; Jacobi, S.; Lin, X.; van Heugten, E.; Fellner, V.; Odle, J. (2013): Stabilized rice bran improves weaning pig performance via a prebiotic mechanism. In: *J Anim Sci* 91 (2), S. 907–913.
- Hervet-Hernandez, D.**; Pintado, C.; Rotger, R.; Goni, I. (2009): Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. In: *Int J Food Microbiol* 136 (1), S. 119–122.
- Howard, M. D.**; Gordon, D. T.; Pace, L. W.; Garleb, K. A.; Kerley, M. S. (1995): Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides on colonic microbiota populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. In: *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21 (3), S. 297–303.
- Itoh, K.**; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y. *et al.* (1997): An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. In: *Biochem Biophys Res Commun* 236 (2), S. 313–322.
- Itoh, K.**; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Engel, J. D.; Yamamoto, M. (1999): Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. In: *Genes Dev* 13 (1), S. 76–86.
- Jensen, A. N.**; Hansen, L. L.; Baggesen, D. L.; Mølbaek, L. (2013): Effects of feeding finisher pigs with chicory or lupine feed for one week or two weeks before slaughter with respect to levels of *Bifidobacteria* and *Campylobacter*. In: *Animal* 7 (1), S. 66–74.
- Jensen, B. B.** (2006): Prevention of boar taint in pig production. Factors affecting the level of skatole. In: *Acta Vet Scand* 48 (Suppl I): S6, S. 1–4.

- Jensen, M. T.;** Cox, R. P.; Jensen, B. B. (1995): 3-Methylindole (skatole) and indole production by mixed populations of pig fecal bacteria. In: *Appl Environ Microbiol* 61 (8), S. 3180–3184.
- Jiang, J.;** Mo, Z-C.; Yin, K.; Zhao, G-J.; Lv, Y-C.; Ouyang, X-P. *et al.* (2012): Epigallocatechin-3-gallate prevents TNF- α -induced NF- κ B activation thereby upregulating ABCA1 via the Nrf2/Keap1 pathway in macrophage foam cells. In: *Int J Mol Med* 29 (5), S. 946–956.
- Jin, J-S.;** Touyama, M.; Hisada, T.; Benno, Y. (2012): Effects of green tea consumption on human fecal microbiota with special reference to Bifidobacterium species. In: *Microbiol Immunol* 56 (11), S. 729–739.
- Katkov, T.;** Gower, D. B. (1970): The biosynthesis of androst-16-enes in boar testis tissue. In: *Biochem J* 117 (3), S. 533–538.
- Kim, J.;** Cha, Y-N.; Surh, Y-J. (2010): A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. In: *Mutat Res* 690 (1-2), S. 12–23.
- Kim, J. M.;** Ahn, J. H.; Lim, K. S.; Lee, E. A.; Chun, T.; Hong, K. C. (2013): Effects of hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 polymorphisms on fat androstenone level and gene expression in Duroc pigs. In: *Anim Genet* 5 (44), S. 592–595.
- Kobayashi, A.;** Kang, M-I.; Okawa, H.; Ohtsuji, M.; Zenke, Y.; Chiba, T. *et al.* (2004): Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. In: *Mol Cell Biol* 24 (16), S. 7130–7139.
- Kocarek, T. A.;** Zangar, R. C.; Novak, R. F. (2000): Post-transcriptional regulation of rat CYP2E1 expression: role of CYP2E1 mRNA untranslated regions in control of translational efficiency and message stability. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 376 (1), S. 180–190.
- Krajka-Kuzniak, V.;** Paluszczak, J. Baer-Dubowska, W. (2013): Xanthohumol induces phase II enzymes via Nrf2 in human hepatocytes in vitro. In: *Toxicol In Vitro* 27 (1), S. 149–156.
- Lee, H. C.;** Jenner, A. M.; Low, C. S.; Lee, Y. K. (2006): Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. In: *Res Microbiol* 157 (9), S. 876–884.

- Lee, I-S.**; Lim, J.; Gal, J.; Kang, J. C.; Kim, H. J.; Kang, B. Y.; Choi, H. J. (2011): Anti-inflammatory activity of xanthohumol involves heme oxygenase-1 induction via NRF2-ARE signaling in microglial BV2 cells. In: *Neurochem Int* 58 (2), S. 153–160.
- Lee, J-M.**; Li, J.; Johnson, D. A.; Stein, T. D.; Kraft, A. D.; Calkins, M. J. *et al.* (2005): Nrf2, a multi-organ protector? In: *FASEB J* 19 (9), S. 1061–1066.
- Li, C.Y.**; Liu, J.X.; Wang Y.Z.; Wu, Y.M.; Wang, J.K.; Zhou, Y.Y. (2009): Influence of differing carbohydrate sources on L-tryptophan metabolism by porcine fecal microbiota studied in vitro. In: *Livestock Science* 120, S. 43–50.
- Li, W. G.**; Zhang, X. Y.; Wu, Y. J.; Tian, X. (2001): Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. In: *Acta Pharmacol Sin* 22 (12), S. 1117–1120.
- Li, Y.**; Paonessa, J. D.; Zhang, Y. (2012): Mechanism of chemical activation of Nrf2. In: *PLoS One* 7 (4), S. e35122.
- Lim, J. H.**; Park, H-S.; Choi, J-K.; Lee, I-S.; Choi, H. J. (2007): Isoorientin induces Nrf2 pathway-driven antioxidant response through phosphatidylinositol 3-kinase signaling. In: *Arch Pharm Res* 30 (12), S. 1590–1598.
- Lin, Z.**; Lou, Y.; Squires, J. E. (2004): Molecular cloning and functional analysis of porcine SULT1A1 gene and its variant: a single mutation SULT1A1 causes a significant decrease in sulfation activity. In: *Mamm Genome* 15 (3), S. 218–226.
- Lindermayer, H. (2010):** Zur Energie- und Nährstoffversorgung in der Jungebermast. Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft, ITE 2 - Schweinefütterung. Grub. Online verfügbar unter http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/ite/dateien/27539_eberempfehlungen.pdf, zuletzt geprüft am 21.08.2014.
- Lindermayer, H.**; Preißinger, W.; Propstmeier-LFL-Grub, G.; Schedle, K. (2012): Versuchsbericht VPS 28 Ebermast – Fütterungsversuch mit Lysinanehebung und Inulingaben zur Reduzierung des Ebergeruchs (Skatol). Bayer Landesanstalt für Landwirtschaft. Grub. Online verfügbar unter http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/ite/dateien/25518_versuchsbericht.pdf, zuletzt geprüft am 21.08.2014

- Lundström, K.;** Malmfors, B. Malmfors G.; Stern, H.; Petterson, H.; Mortenson, A. B.; Sorensen, S. E. (1988): Skatole, androstenone and taint in boars fed two different diets. In: *Livestock Production Science* (18), S. 55–67.
- Magalhaes, P. J.;** Carvalho, D. O.; Cruz, J. M.; Guido, L. F.; Barros, A. A. (2009): Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. In: *Nat Prod Commun* 4 (5), S. 591–610.
- Matal, J.;** Matuskova, Z.; Tunkova, A.; Anzenbacherova, E.; Anzenbacher, P. (2009): Porcine CYP2A19, CYP2E1 and CYP1A2 forms are responsible for skatole biotransformation in the reconstituted system. In: *Neuro Endocrinol Lett* 30 Suppl 1, S. 36–40.
- McMahon, M.;** Thomas, N.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Hayes, J. D. (2004): Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. In: *J Biol Chem* 279 (30), S. 31556–31567.
- Moi, P.;** Chan, K.; Asunis, I.; Cao, A.; Kan, Y. W. (1994): Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. In: *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91 (21), S. 9926–9930.
- Mookiah, S.;** Sieo, C. C.; Ramasamy, K.; Abdullah, N.; Ho, Y. W. (2014): Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. In: *J Sci Food Agric* 94 (2), S. 341–348.
- Nair, S.;** Doh, S. T.; Chan, J. Y.; Kong, A-N.; Cai, L. (2008): Regulatory potential for concerted modulation of Nrf2- and Nfkb1-mediated gene expression in inflammation and carcinogenesis. In: *Br J Cancer* 99 (12), S. 2070–2082.
- Nebert, D. W.;** Russell, D. W. (2002): Clinical importance of the cytochromes P450. In: *Lancet* 360 (9340), S. 1155–1162.
- Newsome, B. J.;** Petriello, M. C.; Han, S. G.; Murphy, M. O.; Eske, K. E.; Sunkara, M. *et al.* (2014): Green tea diet decreases PCB 126-induced oxidative stress in mice by up-regulating antioxidant enzymes. In: *J Nutr Biochem* 25 (2), S. 126–135.

- Nicolau-Solano, S. I.**; McGivan, J. D.; Whittington, F. M.; Nieuwhof, G. J.; Wood, J. D.; Doran, O. (2006): Relationship between the expression of hepatic but not testicular 3 - hydroxysteroid dehydrogenase with androstenone deposition in pig adipose tissue. In: *J Anim Sci* 84 (10), S. 2809–2817.
- Nioi, P.**; Nguyen, T.; Sherratt, P. J.; Pickett, C. B. (2005): The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. In: *Mol Cell Biol* 25 (24), S. 10895–10906.
- Nishimuta, H.**; Ohtani, H.; Tsujimoto, M.; Ogura, K.; Hiratsuka, A.; Sawada, Y. (2007): Inhibitory effects of various beverages on human recombinant sulfotransferase isoforms SULT1A1 and SULT1A3. In: *Biopharm Drug Dispos* 28 (9), S. 491–500.
- Ohno, A.**; Kataoka, S.; Ishii, Y.; Terasaki, T.; Kiso, M.; Okubo, M. *et al.* (2013): Evaluation of Camellia sinensis catechins as a swine antimicrobial feed additive that does not cause antibiotic resistance. In: *Microbes Environ* 28 (1), S. 81–86.
- Pang, Y.**; Nikolic, D.; Zhu, D.; Chadwick, L. R.; Pauli, G. F.; Farnsworth, N. R.; van Breemen, R. B. (2007): Binding of the hop (*Humulus lupulus* L.) chalcone xanthohumol to cytosolic proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. In: *Mol Nutr Food Res* 51 (7), S. 872–879.
- Patterson, R. L. S. (1968)**: 5 α -androst-16-ene-3-one:—Compound responsible for taint in boar fat. In: *J Sci Food Agric* 19 (1), S. 31–38.
- Preinerstorfer A.**; Leithold, A.; Huber, G.; Krimberger, B.; Mösenbacher-Molterer, I. (2010): Erfahrungen zur Ebermast. In: *Nutztierschutztagung Raumberg-Grumpenstein*, S. 47–54.
- Rahman, I.**; Biswas, S. K.; Kirkham, P. A. (2006): Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. In: *Biochem Pharmacol* 72 (11), S. 1439–1452.
- Rasmussen, M. K.**; Brunius, C.; Ekstrand, B.; Zamaratskaia, G. (2012a): Expression of hepatic 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and sulfotransferase 2A1 in entire and castrated male pigs. In: *Mol Biol Rep* 39 (8), S. 7927–7932.
- Rasmussen, M. K.**; Brunius, C.; Zamaratskaia, G.; Ekstrand, B. (2012b): Feeding dried chicory root to pigs decrease androstenone accumulation in fat by increasing hepatic 3 β hydroxysteroid dehydrogenase expression. In: *J Steroid Biochem Mol Biol* 130 (1-2), S. 90–95.

- Rasmussen, M. K.**; Ekstrand, B. (2014): Regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and sulphotransferase 2A1 gene expression in primary porcine hepatocytes by selected sex-steroids and plant secondary metabolites from chicory (*Cichorium intybus* L.) and wormwood (*Artemisia* sp.). In: *Gene* 536 (1), S. 53–58.
- Rasmussen, M. K.**; Zamaratskaia, G.; Ekstrand, B. (2011): In vivo effect of dried chicory root (*Cichorium intybus* L.) on xenobiotica metabolising cytochrome P450 enzymes in porcine liver. In: *Toxicol Lett* 200 (1-2), S. 88–91.
- Rhodes, D. N. (1971)**: Consumer testing of bacon from boar and gilt pigs. In: *J Sci Fd Agri* 22 (9), S. 485–490.
- Roberfroid, M. B.**; van Loo, J. A.; Gibson, G. R. (1998): The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. In: *J Nutr* 128 (1), S. 11–19.
- Ruefer, C. E.**; Gerhauser, C.; Frank, N.; Becker, H.; Kulling, S. E. (2005): In vitro phase II metabolism of xanthohumol by human UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. In: *Mol Nutr Food Res* 49 (9), S. 851–856.
- Shen, G.**; Xu, C.; Hu, R.; Jain, M. R.; Nair, S.; Lin, W. *et al.* (2005): Comparison of (-)-epigallocatechin-3-gallate elicited liver and small intestine gene expression profiles between C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. In: *Pharm Res* 22 (11), S. 1805–1820.
- Shih, P-H.**; Yen, G-C. (2007): Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway. In: *Biogerontology* 8 (2), S. 71–80.
- Sinclair, P. A.**; Gilmore, W. J.; Lin, Z.; Lou, Y.; Squires, E. J. (2006): Molecular cloning and regulation of porcine SULT2A1: relationship between SULT2A1 expression and sulfoconjugation of androstenone. In: *J Mol Endocrinol* 36 (2), S. 301–311.
- Sinclair, P. A.**; Hancock, S.; Gilmore, W. J.; Squires, E. J. (2005): Metabolism of the 16-androstene steroids in primary cultured porcine hepatocytes. In: *J Steroid Biochem Mol Biol* 96 (1), S. 79–87.
- Sinclair, P. A.**; Squires, E. J. (2005): Testicular sulfoconjugation of the 16-androstene steroids by hydroxysteroid sulfotransferase: its effect on the concentrations of 5 α -androstenone in plasma and fat of the mature domestic boar. In: *J Anim Sci* 83 (2), S. 358–365.

- Soyalan, B.;** Minn, J.; Schmitz, H. J.; Schrenk, D.; Will, F.; Dietrich, H. *et al.* (2011): Apple juice intervention modulates expression of ARE-dependent genes in rat colon and liver. In: *Eur J Nutr* 50 (2), S. 135–143.
- Stanier, G.;** Davies, A. (1981): Effects of the antibiotic monensin and an inhibitor of methanogenesis on in vitro continuous rumen fermentations. In: *Br J Nutr* 45 (3), S. 567–578.
- Tambyrajah, W. S.;** Doran, E.; Wood, J. D.; McGivan, J. D. (2004): The pig CYP2E1 promoter is activated by COUP-TF1 and HNF-1 and is inhibited by androstenone. In: *Arch Biochem Biophys* 431 (2), S. 252–260.
- Tangney, C. C.;** Rasmussen, H. E. (2013): Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. In: *Curr Atheroscler Rep* 15 (5), S. 324.
- Taylor, P. W.;** Hamilton-Miller, M. T.; Stapleton, P. D. (2005): Antimicrobial properties of green tea catechins. In: *Food Sci Technol Bull.* (2), S. 71–81.
- Terra, X.;** Montagut, G.; Bustos, M.; Llopiz, N.; Ardèvol, A.; Bladé, C. *et al.* (2009): Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. In: *J Nutr Biochem* 20 (3), S. 210–218.
- Tkachev, V. O.;** Menshchikova, E. B.; Zenkov, N. K. (2011): Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. In: *Biochemistry Mosc* 76 (4), S. 407–422.
- Tsai, M. J.;** O'Malley, B. W. (1994): Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. In: *Annu Rev Biochem* 63, S. 451–486.
- van Wagenberg, C. P. A.;** Snoek, H. M.; van der Fels, J. B.; van der Peet-Schwering, C. M. C.; Vermeer, H. M.; Heres, L. (2013): Farm and management characteristics associated with boar taint. In: *Animal* 7 (11), S. 1841–1848.
- Venugopal, R.;** Jaiswal, A. K. (1998): Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. In: *Oncogene* 17 (24), S. 3145–3156.
- While, S. G.;** Kjos, N. P.; Sorum, H.; Overland, M. (2012): Feeding Jerusalem artichoke reduced skatole level and changed intestinal microbiota in the gut of entire male pigs. In: *Animal* 6 (5), S. 807–814.

- Viveros, A.;** Chamorro, S.; Pizarro, M.; Arija, I.; Centeno, C.; Brenes, A. (2011): Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. In: *Poult Sci* 90 (3), S. 566–578.
- Wakabayashi, N.;** Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Kang, M.-I.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M. *et al.* (2004): Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. In: *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101 (7), S. 2040–2045.
- Wang, H.;** Provan, G. J.; Helliwell, K. (2000): Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. In: *Trends in Food Science & Technology* 11, S. 152–160.
- Wang, X.;** Yang, L.; Yang, X.; Tian, Y. (2014): In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.). In: *J Sci Food Agri* 94 (8), S.1693-1700.
- Weiler, U.;** Götz, M.; Schmidt, A.; Otto, M.; Müller, S. (2013): Influence of sex and immunocastration on feed intake behavior, skatole and indole concentrations in adipose tissue of pigs. In: *Animal* 7 (2), S. 300–308.
- Wesoly, R.;** Weiler, U. (2012): Wirkung von Fütterungsmaßnahmen auf die Skatolbildung und die Skatoleinlagerung beim Schwein. In: *Züchtungskunde* 84 (5), S. 412–426.
- Whitehead, T. R.;** Price, N. P.; Drake, H. L.; Cotta, M. A. (2008): Catabolic Pathway for the Production of Skatole and Indoleacetic Acid by the Acetogen *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, and Swine Manure. In: *Applied and Environmental Microbiology* 74 (6), S. 1950–1953.
- Wiercinska, P.;** Lou, Y.; Squires, E. J. (2012): The roles of different porcine cytochrom P450 enzymes and cytochrome b5A in skatole metabolism. In: *Animal* 6 (5), S. 834–845.
- Wysocki, C. J.;** Beauchamp, G. K. (1984): Ability to smell androstenone is genetically determined. In: *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 81 (15), S. 4899–4902.
- Wysocki, C. J.;** Gilbert, A. N. (1989): National Geographic Smell Survey. Effects of age are heterogenous. In: *Ann N Y Acad Sci* 561, S. 12–28.
- Xia, E.-Q.;** Deng, G.-F.; Guo, Y.-J.; Li, H.-B. (2010): Biological activities of polyphenols from grapes. In: *Int J Mol Sci* 11 (2), S. 622–646.

- Xu, C.;** Li, Christina Y-T.; Kong, A-N. T. (2005): Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. In: *Arch Pharm Res* 28 (3), S. 249–268.
- Xu, J.;** Chen, Y.; Li, L.; Li, Z.; Wang, C.; Zhou, T.; Lu, W. (2012): An improved HPLC method for the quantitation of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate (PAP) to assay sulfotransferase enzyme activity in HepG2 cells. In: *J Pharm Biomed Anal* 62, S. 182–186.
- Xu, Z-R.;** Hu, C-H.; Wang, M-Q. (2002): Effects of fructooligosaccharide on conversion of L-tryptophan to skatole and indole by mixed populations of pig fecal bacteria. In: *J Gen Appl Microbiol* 48 (2), S. 83–90.
- Yamamoto, T.;** Suzuki, T.; Kobayashi, A.; Wakabayashi, J.; Maher, J.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. (2008): Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. In: *Mol Cell Biol* 28 (8), S. 2758–2770.
- Yang, F.;** de Villiers, W. J.; McClain, C. J.; Varilek, G. W. (1998): Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. In: *J Nutr* 128 (12), S. 2334–2340.
- Yokoyama, M. T.;** Carlson, J.R; Holdeman, L. V. (1977): Isolation and Characterisation of a Skatole-Producing *Lactobacillus* sp. from the Bovine Rumen. In: *Applied and Environmental Microbiology* 34 (6), S. 837–842.
- Yousaf, S.;** Butt, M. S.; Suleria, H. A. R.; Iqbal, M. J. (2014): The role of green tea extract and powder in mitigating metabolic syndromes with special reference to hyperglycemia and hypercholesterolemia. In: *Food Funct* 5 (3), S. 545–556.
- Yu, R.;** Chen, C.; Mo, Y. Y.; Hebbar, V.; Owuor, E. D.; Tan, T. H.; Kong, A. N. (2000): Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. In: *J Biol Chem* 275 (51), S. 39907–39913.
- Zamaratskaia, G.;** Chen, G.; Lundström, K. (2006): Effects of sex, weight, diet and hCG administration on levels of skatole and indole in the liver and hepatic activities of cytochromes P450E1 and P450A6 in pigs. In: *Meat Sci* 72 (2), S. 331–338.
- Zamaratskaia, G.;** Gilmore, W. J.; Lundström, K.; Squires, E. J. (2007): Effect of testicular steroids on catalytic activities of cytochrome P450 enzymes in porcine liver microsomes. In: *Food Chem Toxicol* 45 (4), S. 676–681.

- Zamaratskaia, G.;** Squires, E. J. (2009): Biochemical, nutritional and genetic effects on boar taint in entire male pigs. In: *Animal* 3 (11), S. 1508.
- Zammerini, D.;** Wood, J. D.; Whittington, F. M.; Nute, G. R.; Hughes, S. I.; Hazzledine, M.; Matthews, K. (2012): Effect of dietary chicory on boar taint. In: *Meat Sci* 91 (4), S. 396–401.
- Zanoli, P.;** Zavatti, M. (2008): Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. In: *J Ethnopharmacol* 116 (3), S. 383–396.
- Zhang, D. D.;** Hannink, M. (2003): Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. In: *Mol Cell Biol* 23 (22), S. 8137–8151.

ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation zum Thema **„Einsatz von polyphenolhaltigen Pflanzenextrakten und Präbiotika im Futter von Jungbern zur Verminderung von Ebergeruch“** selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ort, Datum

(Lisa-Marie Schütz)

Danksagung

Mein größter Dank richtet sich an Herrn **Prof. Dr. Klaus Eder**, der es mir ermöglicht hat am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie zu promovieren, was ein sehr großer Wunsch von mir war. Ich bedanke mich für die Vergabe des interessanten Themas und für die gute Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Außerdem möchte ich Herrn **Prof. Dr. Uwe Wenzel** für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ich bedanke mich bei Frau **Prof. Dr. Gabriele Stangl**, Herrn **Dr. Holger Kluge** und Herrn **Tobias Gräber** vom Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaft der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die gute Zusammenarbeit und für den stetigen wissenschaftlichen Austausch. Besonders Tobias möchte ich für seine Unterstützung danken. Bei der **Firma Dr. Eckel GmbH** aus Niederzissen möchte ich mich für die Futterzusätze und die gute und freundliche Zusammenarbeit bedanken. Außerdem danke ich Frau **PD Dr. Ulrike Weiler** und Herrn **Raffael Wesoly** vom Institut für Verhaltensphysiologie landwirtschaftlicher Nutztiere der Universität Hohenheim für die Durchführung der Androstenon-, Indol- und Skatolmessungen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei **Dr. Aline Couturier, Anja Fiesel, Frauke Frank, Dr. Denise Geßner, Birthe Gröne, Dr. Janine Keller, Anna Kynast, Anja Marx, Dr. Erika Most, Dr. Christine Rauer, Dr. habil. Robert Ringseis, Dr. Gaiping Wen und Dr. Xiaodan Zhou**, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Natürlich bedanke ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des **Instituts für Tierernährung und Ernährungsphysiologie**, die ich namentlich nicht alle auflisten konnte, vor allem dafür, dass ich so herzlich in die Arbeitsgruppe aufgenommen wurde und für die schöne Zeit am Institut, die mir sehr fehlen wird. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht mit euch allen zu arbeiten!

Meiner Familie, besonders **meinem Opa, meiner Schwester Lea, meinem Schwager Felix und meinem Bruder Jan-Peter** danke ich für die Unterstützung und dass sie immer für mich da waren, wenn ich sie brauchte. Ich danke meinem Neffen **Milo**, dass er mich in den letzten Zügen meiner Dissertation immer wieder zum Lachen gebracht hat. Genauso möchte ich all **meinen Freunden** danken, die ich nicht alle einzeln nennen kann, die so verständnisvoll waren und mich immer wieder motiviert haben. Ich bin so froh, so tolle Freunde zu haben! Dabei bedanke ich mich vor allem bei meinen fleißigen Korrekturlesern!

Von Herzen danke ich meinem Freund **Christoph**, der mich in meiner Promotionszeit immer unterstützt hat und durchweg Verständnis dafür hatte, wenn ich mal etwas gestresst, nicht gut gelaunt und vom Schreibtisch nicht wegzuholen war.

Zum Schluss möchte ich mich noch beim **Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft (BMEL)** für die Finanzierung des Projektes bedanken, ohne die meine Promotion so nicht möglich gewesen wäre.