

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Magnesium in der Natur	3
2.2 Chemie und Stereochemie	3
2.3 Biochemie	5
2.4 Physiologie	6
2.4.1 Magnesiumverteilung im Körper und auf zellulärer Ebene	6
2.4.2 Physiologische Funktionen von Magnesium	8
2.4.3 Magnesiumhomöostase und Regulation auf Zellebene	9
2.4.4 Solute Carrier Family 41 Member A1 (SLC41A1)	12
2.4.5 Solute Carrier Family 41 Member A2 u. A3 (SLC41A2 / SLC41A3)	13
2.4.6 Ancient Conserved Domain Protein Subtype 2 (ACDP2, CNNM2)	14
2.4.7 Magnesium-Transporter 1 (MagT1)	16
2.4.8 Tumor Suppressor Candidate 3 (TUSC3, N33)	17
2.4.9 Non-Imprinted in Prader-Willi/ Angelman Syndrome 1 (NIPA1)	18
2.4.10 Melastatin-Related Transient Receptor Potential Cation Channel 6 u. 7 (TRPM6 / TRPM7)	20
2.4.11 Magnesiumhomöostase, Metabolismus und Regulation im Körper	22
2.4.11.1 Absorption	22
2.4.11.2 Reabsorption	23
2.4.11.3 Magnesiumgleichgewicht des Körpers	26
2.4.11.4 Hormonelle Regulation des Magnesiumtransports und der Magnesiumhomöostase	26
2.4.12 Magnesiumdefizit des Körpers	31
2.5 Erkrankungen mit Magnesiumdefizit	34
2.5.1 Diabetes mellitus Typ II	35
2.5.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und Bluthochdruck	37
2.6 Bedeutung der Literatur für die eigene Fragestellung	40
3 Material und Methoden	42
3.1 In-vitro-Studie an Jurkat und JVM-13-Zellen	42
3.1.1 Zelllinien und Kulturmedium	42
3.1.2 Experimentelles Setup	43
3.1.3 Isolierung der Gesamt-RNA	44
3.1.4 Bestimmung der Quantität und Qualität der RNA	45
3.1.4.1 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	45

3.1.4.2	Messung mit dem Bioanalyzer von Agilent	45
3.1.5	cDNA-Synthese	46
3.1.6	Konventionelle PCR und Agarosegel-Elektrophorese	46
3.1.7	Quantitative RT-PCR	47
3.1.8	Berechnung der Genexpressions-Ct-Differenz	51
3.1.8.1	Allgemeine Kinetik der PCR	51
3.1.8.2	Relative Quantifizierung	54
3.1.8.3	Statistische Betrachtungen	56
3.2	In-vivo-Studie an <i>Diabetes-mellitus</i> -Patienten	58
3.2.1	Studienablauf und Probanden	58
3.2.2	Experimentelles Setup	58
3.2.2.1	Blutentnahme und Leukozytenisolierung	58
3.2.2.2	Isolierung der RNA	58
3.2.2.3	Qualitäts- und Quantitätsbestimmung, cDNA-Synthese, kPCR, Gelelektrophorese, qPCR	59
3.2.3	Magnesiumbestimmung im Plasma und in Leukozyten	59
3.3	Methodenoptimierung mit MIQE	61
3.3.1	MIQE	61
3.3.2	Bestimmung der Genexpressionsstabilität M der Housekeeping Gene mit „geNorm“	61
3.3.3	Vergleichende Berechnungen im Hinblick auf eine Optimierung des Housekeeping-Gens	64
4	Ergebnisse	65
4.1	Zellkulturversuch (in vitro)	65
4.1.1	Genexpressionsanalysen	67
4.1.1.1	Solute Carrier Family 41 Member A1 (<i>SLC41A1</i>)	68
4.1.1.2	Solute Carrier Family 41 Member A2 (<i>SLC41A2</i>)	69
4.1.1.3	Solute Carrier Family 41 Member A3 (<i>SLC41A3</i>)	70
4.1.1.4	Ancient Conserved Domain Protein Subtype 2 (<i>ACDP2</i> , <i>CNNM2</i>)	71
4.1.1.5	Melastatin-Related Transient Receptor Potential Cation Channel (<i>TRPM7</i>)	72
4.1.1.6	Magnesium Transporter Protein 1 (<i>MagT1</i>)	73
4.1.1.7	Non-Imprinted in Prader-Willi/ Angelman-Syndrom 1 (<i>NIPA1</i>)	74
4.1.1.8	Tumor Suppressor Candidate 3 (<i>TUSC3</i> , <i>N33</i>)	75
4.2	Studie an <i>Diabetes-mellitus</i> -Patienten (in vivo)	76
4.2.1	Phase 1 – Zusammenhang zwischen der <i>CNNM2</i> -Expression und dem Magnesiumstatus	77
4.2.1.1	Magnesiummessungen im Blut	77
4.2.1.2	Genexpressionsanalyse von <i>CNNM2</i>	79
4.2.2	Phase 2 – Einfluss einer Mg-Supplementierung auf die <i>CNNM2</i> -Expression und den Magnesiumstatus	85
4.2.2.1	Blutuntersuchung	85

4.2.2.2	Genexpressionsanalysen.....	87
4.3	Validierung und Optimierung des Housekeeping-Gens.....	88
4.3.1	Allgemeines zum Optimierungsverfahren	88
4.3.2	Quantitative und qualitative Analyse potentiell geeigneter Housekeeping-Gene mit der Analysesoftware „geNorm“.....	89
4.3.3	Vergleichende Berechnungen unter Verwendung optimierter HKGs.....	93
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	94
5	Diskussion	96
5.1	Dynamik und Diagnostik der Magnesiumhomöostase.....	96
5.2	Validierung Mg-sensitiver Gene im In-vitro-Zellversuch.....	98
5.3	<i>CNNM2</i> als Biomarker bei <i>Diabetes-mellitus</i> -Patienten.....	101
5.3.1	Validierung von <i>CNNM2</i> an einer Patientenkohorte	101
5.3.2	Magnesiumsupplementierung und Erfolgskontrolle mittels transkriptioneller Biomarker	105
5.3.3	Funktionelle Bedeutung der Biomarker <i>CNNM2</i> und <i>SLC41A1</i>	107
5.4	Optimierung der Analytik des Biomarkers <i>CNNM2</i> für die Routinediagnostik	109
5.5	Ausblicke	112
6	Zusammenfassung.....	113
7	Summary	115
8	Literaturverzeichnis.....	117
9	Anhang	148
9.1	Kulturmedium für Jurkat und JVM-13-Zellen	148
9.2	Bedingungen des Magnesiumversuchs in vitro	148
9.3	Reaktionsbedingungen der Konventionellen PCR.....	149
9.4	Reaktionsbedingungen der Quantitativen PCR (qPCR)	150
9.5	Methodenweiterentwicklung	152
9.6	Verwendete Internetseiten	152
	Abbildungsverzeichnis	153
	Tabellenverzeichnis	155
	Ein herzliches Dankeschön.....	157
	Selbständigkeitserklärung	158