

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
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
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>42</b>
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
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
4.1	Zeilkulturversuch (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, 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, 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
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>96</b>
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 Patientenkollektiv .....	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
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>113</b>
<b>7 Summary .....</b>	<b>115</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>9 Anhang .....</b>	<b>148</b>
9.1 Kulturmöglichkeiten 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
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>153</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>155</b>
<b>Ein herzliches Dankeschön.....</b>	<b>157</b>
<b>Selbständigkeitserklärung.....</b>	<b>158</b>