

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Validierung magnesiumsensitiver Gene als Biomarker für den
intrazellulären Magnesiumstatus von
*Diabetes-mellitus-Typ-II-Patienten***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Katharina Kurth
Tierärztin aus Halle/Saale

Berlin 2012
Journal-Nr.: 3605

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

magnesium, deficiency, diabetes mellitus, cell culture, hypomagnesaemia,
biochemical markers, real time PCR, gene expression, ion transport

Tag der Promotion: 30.01.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-321-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

*M*einen *E*ltern

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

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[Mg] _{plasma}	Gesamtmagnesium im Plasma
[Mg ²⁺] _{intra}	freies intrazelluläres ionisiertes Magnesium
[Na ⁺] _{extra}	freies extrazelluläres ionisiertes Natrium
[Na ⁺] _{intra}	freies intrazelluläres ionisiertes Natrium
ACDP2	<i>Ancient Conserved Domain Protein Subtype 2</i> (engl.)
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADHSP	Autosomal dominante hereditäre spastische Paraplegie
ADRHH	Autosomal-dominante renale Hypomagnesiämie mit Hypokalziurie
Akt	aktivierte Proteinkinase B
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
ALR1	hefeeigener Magnesiumtransporter
ARIC	<i>Atherosclerosis Risk in Communities</i> (engl.)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pair</i> (engl.) ; Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i> (lat.) ; ungefähr, etwa
cAMP	<i>cyclic adenosinmonophosphat</i> (engl.) ; zyklisches Adenosinmonophosphat
CAP	<i>Catabolite Activator Protein, cAMP receptor protein</i> (engl.)
CaSR	<i>Ca²⁺/Mg²⁺ sensing receptor</i> (engl.)
CBS-Domäne	<i>cystathionine-β-synthase domain</i> (engl.) .
cDNA	<i>complementary DNA</i> (engl.) ; komplementäre DNS
CMF	<i>calcium magnesium free</i> (engl.)
CNNM2	<i>Ancient Conserved Domain Protein Subtype 2</i> (engl.)
CorA	Magnesium/Nickel/Kobalt-Transporter in Bakterien
CorC	Magnesium-und-Kobalt-Efflux-Protein in Bakterien
Ct (Cp)	<i>cycle threshold, crossing point</i> (engl.)
DNA	Deoxyribonucleic acid (engl.) Desoxyribonukleinsäure
DCT	<i>distal convoluted tubule</i> (engl.) ; distaler gewundener Tubulus
DEPC	Diethylidicarbonat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DT40	Zelllinie
E	Effizienz
EDTA	Tetraanion der Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
E _s	gemittelte Effizienz pro Gen
Fa.	Firma
FBN	Forschungsinstitut für Nutztierbiologie, Dummerstorf
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (engl.) ; fetales Kälberserum
FHHNC	Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (franz.)
GED	<i>Genexpression´s Ct Differenz</i> (engl.)
GLUT	Glucosetransporter

Abkürzungsverzeichnis

GOI	<i>gene of interest</i> (engl.) ; Zielgen
GWAS	<i>genome-wide association study</i> (engl.)
h	<i>hora</i> (lat.) ; Stunde
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (engl.)
HEK-293	<i>human embryonic kidney cells</i> (engl.) ; Zelllinie
HKG	<i>housekeeping gene</i> (engl.)
HlyC	Hämolysin C in Bakterien
HSH	Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie
HSP	Hereditäre spastische Paraplegie
IDF	International Diabetes Federation (engl.)
IP3	Inositol-3-Phosphat
IR	Insulin-Rezeptor
IRC	<i>inter run calibrator</i> (engl.)
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
IRTK	Insulin-Rezeptor-Thyrosin-Kinase
ISE	Ionenselektive Elektrode
kDa	KiloDalton, Masseneinheit (1 Da = $1,66 \times 10^{-27}$ kg)
kPCR	konventionelle Polymerasekettenreaktion
M	Genstabilität
MagT1	Magnesium-Transporter 1
MgATP	Magnesium-Adenosintriphosphat
MgtA/B/E	bakterieller Magnesiumtransporter A, B, E
MIQE	<i>The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i> (engl.)
mU	Milliunits
n	Stichprobenanzahl
N33	<i>Tumor Suppressor Candidate 3</i> (engl.)
NCC	Na ⁺ -Cl ⁻ -Kotransporter
NF	<i>normalisation factor</i> (engl.) ; Normalisierungsfaktor
NIPA1	<i>Non-Imprinted in Prader-Willi-/ Angelman Syndrome 1</i> (engl.)
NKCC	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Kotransporter
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (engl.) ; Kernspinresonanz(spektroskopie)
NRC	<i>non reaction control</i> (engl.)
NSARMR	Non-syndromale autosomal rezessive mentale Retardierung
NTC	<i>non template control</i> (engl.)
OD	<i>optic density</i> (engl.) ; optische Dichte
OST	Oligosaccharyl-Transferase
p	Symbol für Irrtumswahrscheinlichkeit, Infimum des Signifikanzniveaus
PD	<i>Parkinson Disease</i> (engl.) ; Parkinson-Erkrankung
PE	Präeklampsie
PGE	Prostaglandin
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKA/C	Proteinkinase A, C
PLC	Phospholipase C
PLL	Prolymphozytenleukämie
PTH	Parathormon
PWS/AS	Prader-Willi-Syndrom / Angelman-Syndrom

Abkürzungsverzeichnis

qPCR / PCR	<i>(quantitative) polymerase chain reaction</i> (engl.) ; Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (engl.) ; Ribonukleinsäure
r	Pearson-Korrelationskoeffizient
ref	<i>reference</i> (engl.) ; Referenz(probe)
rER	<i>relative expression ratio</i> (engl.)
RIN	<i>RNA Integrity Number</i> (engl.)
rpm	<i>round per minute</i> (engl.) ; Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	<i>slope</i> (engl.) ; Anstieg
SD	<i>standard deviation</i> (engl.) ; Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> (engl.) ; Natriumdodecylsulfat
SE	<i>standard error</i> (engl.) .; Standardfehler
SLC41A1-A3	<i>Solute Carrier Family 41 Member A1, 2 und 3</i> (engl.)
SOI	<i>sample of interest</i> (engl.) ; Probe von Interesse
sp. v.	<i>splice variant</i> (engl.)
SPG6	Spastische Paraplegie Typ 6
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	<i>thick ascending limb of loop of Henle</i> (engl.) ; dicker aufsteigender Ast der Henle-Schleife
TMD	Transmembrandomäne
TRPM6/7	<i>Melastatin-Related Transient Receptor Potential Cation Channel 6 / 7</i> (engl.)
TUSC3	<i>Tumor Suppressor Candidate 3</i> (engl.)
V	paarweise Variation
VitD3	Vitamin-D3
well	(engl.) Loch in der qPCR-Platte
WHO	<i>World Health Organisation</i> (engl.) ; Weltgesundheitsorganisation
XMEN	<i>X-linked immunodeficiency with magnesium defect, Epstein-Barr virus infection, u. neoplasia (XMEN)</i> (engl.)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Magnesium (Mg) ist das am häufigsten vorkommende intrazelluläre zweiwertige Kation im menschlichen Körper. Als Teil des Mg-ATP-Komplexes und als Kofaktor von mehr als 300 Enzymen ist Magnesium in nahezu alle intrazellulären Stoffwechselwege involviert. Die enge Regulation der intrazellulären Mg-Konzentration ist für die zelluläre Homöostase also von größter Bedeutung (Romani und Scarpa 2000).

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass Magnesium signifikant das Auftreten, die Entwicklung und den Verlauf von *Diabetes mellitus* Typ II beeinflusst (Barbagallo und Dominguez 2007). Durch die Beeinflussung der Tyrosin-Kinase-Aktivität des Insulin-Rezeptors und der Signaltransduktion auf der Post-Rezeptor-Ebene verbessert Magnesium Parameter der Blutzuckerkontrolle, wie HbA1c, Nüchternblutzucker und Insulin-Resistenz (Volpe 2008; Günther 2010). Zahlreiche epidemiologische Studien untersuchten das Diabetes-Risiko im Zusammenhang mit der Mg-Zufuhr und zeigten ein verringertes Risiko bei erhöhter Mg-Aufnahme (Yang et al. 1999; He et al. 2006). Für das Erreichen einer guten therapeutischen Wirksamkeit durch eine Supplementierung ist die Bestimmung des Mg-Status extrem wichtig. In der klinischen Praxis erfolgt routinemäßig die Messung der Gesamt-Mg-Konzentration im Plasma/Serum. Dieser Parameter ist neben der Mg-Bestimmung im 24 h Urin der einzig verfügbare Laborwert zur Bewertung des Mg-Status des Körpers. Eine niedrige Plasma-Mg-Konzentration ist ein zuverlässiger Marker für einen Mg-Mangel (Chaudhary et al. 2010). Allerdings kann trotz einer normalen Plasma-Mg-Konzentration ein Mg-Defizit innerhalb der Zelle auftreten, da durch das Entleeren intrazellulärer Speicher bzw. der des Knochens die Mg-Konzentration im Plasma relativ konstant gehalten wird (Vormann 2003). Darüber hinaus kann unter Stressbedingungen Magnesium aktiv aus der Zelle transportiert werden und dadurch eine intrazellulären Mg-Mangel verdecken (Romani und Maguire 2002). Daher wäre die Messung der freien intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration vorzuziehen, um Patienten mit einem Mg-Defizit zu identifizieren (Saris et al. 2000). Techniken zur intrazellulären Mg-Bestimmung sind jedoch zeitaufwendig, teuer und nicht im Praxisalltag anwendbar. Daher ist eine routinemäßige, klinische Methode zur Bestimmung von freiem intrazellulärem Mg^{2+} derzeit nicht verfügbar (Swaminathan 2003).

In den letzten Jahren wurden mehrere Gene identifiziert, die für Mg-Transporter und / oder mögliche homöostatische Faktoren kodieren. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene *CNNM2*, *SLC41A1*, *SLC41A2*, *SLC41A3*, *TRPM6*, *TRPM7*, *MagT1*, *NIPA1* und *N33* stellen eine Auswahl dar (Goytain und Quamme 2005; Goytain et al. 2007; Schlingmann et al. 2007; Kolisek et al. 2008; Zhou und Clapham 2009). Untersuchungen der Expression

dieser Gene in der Zellkultur und bei Mäusen unter hypomagnesiämischen Bedingungen haben gezeigt, dass sich das Expressionsprofil dieser Gene veränderte. Somit könnte es möglich sein, dass ein zelluläres Mg-Defizit durch eine erhöhte Produktion einiger dieser Mg-Transporter bzw. homöostatischen Faktoren kompensiert wird (Goytain und Quamme 2005). Diese Beobachtungen haben zu der Hypothese geführt, dass die Expression solcher Mg-sensitiven Gene als mögliche Marker zur Detektion eines intrazellulären Mg-Defizits verwendet werden können.

Der erste Versuchsabschnitt diente der Überprüfung der Eignung möglicher magnesiumsensitiver Gene (Kandidatengene) als Biomarker. Dafür wurde ein In-vitro-Zellsystem erstellt. In den beiden humanen Zelllinien Jurkat und JVM-13 wurden die Expressionsraten der Kandidatengene in Abhängigkeit von der extrazellulären Mg-Konzentration bestimmt. Die untersuchten humanen Zelllinien stammten von Lymphozyten ab und stellen ein gutes Referenzmodell dar.

Im zweiten Versuchsabschnitt sollte in einem In-vivo-Modell die Bestimmung der Expressionsrate des Gens *CNNM2* zusätzlich zur Messung der Plasma-Mg-Konzentration und der intrazellulären freien Mg^{2+} -Konzentration in Leukozyten von Patienten mit *Diabetes mellitus* Typ II erfolgen (Phase 1). Diese drei Parameter wurden dann in Korrelation zueinander gesetzt, um mögliche Zusammenhänge aufzudecken.

Anschließend wurden ausgewählte Patienten über 30 Tage täglich mit 300 mg Magnesium supplementiert und eine erneute vergleichende Bestimmung der drei Parameter der ersten Phase der Studie durchgeführt (Phase 2).

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 MAGNESIUM IN DER NATUR

Magnesium (Mg) ist das achthäufigste Element in der Natur. Die Erdkruste besteht zu etwa 1,94 % aus diesem Erdalkalimetall. Wichtige Mineralien sind Dolomit ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), Magnesit (Bitterspat, MgCO_3), Olivin ($(\text{Mg, Fe})_2[\text{SiO}_4]$), Enstatit (MgSiO_3) und Kieserit ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). In Form von Dolomit ist ein Mg-Mineral sogar gebirgsbildend, so z. B. in den Dolomiten (Sigel und Sigel 1990). Im Meerwasser, in dem sich das Leben entwickelt hat, ist der Mg-Gehalt mit 50 mmol/l besonders hoch (Turekian 1968; Maguire und Cowan 2002). Diese Tatsache könnte ein Teil der Erklärung sein, dass es in fast jedem Lebewesen Funktionen gibt, die direkt oder indirekt auf eine ausreichende Mg-Versorgung angewiesen sind.

2.2 CHEMIE UND STEREOCHEMIE

Magnesium steht in der zweiten Hauptgruppe im Periodensystem und gehört damit zu den Erdalkalimetallen. Die Elektronenkonfiguration stellt sich wie folgt dar: $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2$.

(Abb.1)

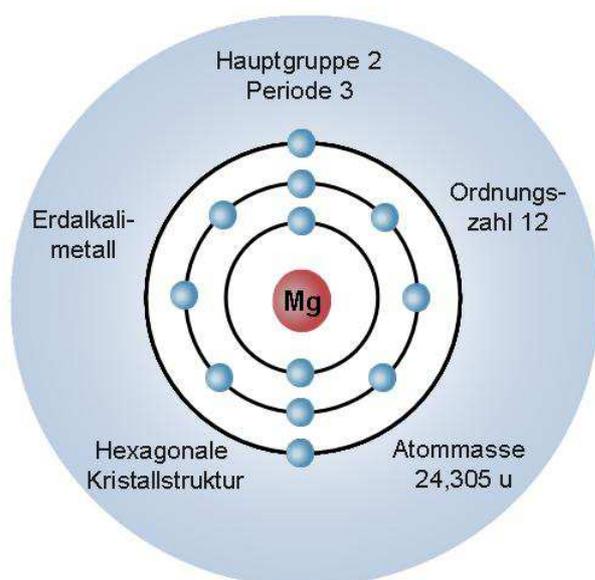


Abb.1 Elektronenkonfiguration und Charakteristiken des Magnesiummoleküls

Die Chemie des divalenten Magnesiumions (Mg^{2+}) ist aufgrund seiner interessanten chemischen Eigenschaften innerhalb der anderen biologisch relevanten Kationen einzigartig. Sein Ionenradius ist innerhalb aller Kationen der Kleinste, aber im Gegensatz dazu ist der Radius einschließlich der Hydrathülle der Größte. Die Hydrathülle vergrößert den Radius des Mg^{2+} ca. 400-Fach (Maguire und Cowan 2002).

Diese sehr große Differenz und die starke Interaktion mit dem Wasser der Hydrathülle sind wichtige Faktoren für die biochemischen und biologischen Funktionen des Mg^{2+} , die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

Sechs Wassermoleküle bilden die primäre Hydrathülle um das Mg^{2+} und geben dem dann hydrierten Mg^{2+} eine oktahedrale Geometrie. Mg^{2+} ist immer hexakoordiniert und relativ starr (**Abb. 2**). Das im Gegensatz dazu sehr flexible Ca^{2+} , dessen Koordinationssphäre sechs bis neun Bindungen eingehen kann, ist aufgrund seiner Flexibilität gut geeignet, als Signalmolekül zu fungieren (Bindung an unterschiedliche Proteine). Magnesium hingegen bindet vorrangig ATP und hält dieses in der katalytischen Tasche des Enzyms. Dabei wird die primäre Hydrathülle nicht vollständig abgestreift. Ein oder zwei verbleibende Wassermoleküle können so in der für die katalytische Reaktion erforderlichen Position gehalten werden. Sowohl durch das korrekte Platzieren der Wassermoleküle, als auch durch die Stabilisierung der Konformation dient Magnesium auch ATP-unabhängigen Enzymen als Kofaktor (Maguire und Cowan 2002).

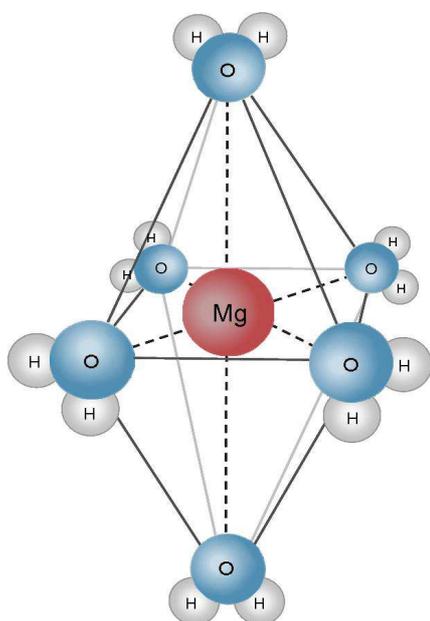


Abb.2 Hexakoordination des Magnesiumions. Sechs Wassermoleküle formen ein Oktahedron

Weitere 12 bis 14 Wassermoleküle formen die zweite Schale um das bereits hydrierte Ion. Die aus den beiden Hydratschalen zusammengesetzte Wasserhülle ist an Mg^{2+} stärker gebunden als es bei irgendeinem anderen, im lebenden Organismus vorkommenden Kation der Fall ist. Aufgrund der hohen Ladungsdichte und der relativ langsamen Austauschrate des Wassers in der Wasserhülle bildet das hydrierte Mg^{2+} eine relativ unflexible, große Struktur und kann dadurch spezifische Konformation stabilisieren.

Beim Durchtritt durch selektive Ionenkanäle muss das Mg^{2+} einen Teil seiner Hydrathülle abstreifen, um den Kanal passieren zu können. Dabei entstehen schwache elektrostatische Bindungen zwischen dem Ion und den polaren (Carboxyl)Resten der Aminosäuren, die die innere Pore des Kanals bilden. Die dabei freiwerdende Bindungsenergie muss adäquat der zum Abstreifen der Hydrathülle („ion stripping“) benötigten Energie sein. Die freiwerdende Bindungsenergie erreicht ihr Maximum, wenn das unhydrierte Mg^{2+} in den Kanal passt (Sircar 2008). Magnesium als freies Element kann in der Natur nicht gefunden werden, da es hochgradig reaktiv ist und infolgedessen hauptsächlich in Verbindungen mit Karbonaten, Silikaten, Chloriden und Sulfaten vorkommt.

2.3 BIOCHEMIE

Mehr als 300 Enzyme sind direkt oder indirekt auf die Verfügbarkeit von freiem Mg^{2+} bzw. Mg-ATP angewiesen. Die Vielzahl an Mg-abhängigen Stoffwechselprozessen verdeutlicht die Bedeutung des Mikronährstoffs für den Organismus. Alle ATP-abhängigen Prozesse erfordern Mg^{2+} in Form von Mg-ATP. Biochemisch wichtige Beispiele sind die Synthese von Proteinen und Fettsäuren, die Aktivierung von Aminosäuren, die Phosphorylierung von Glukose und seinen Derivaten in der Glykolyse, die oxidative Decarboxylierung von Citrat, aber auch ATP-abhängige Transportprozesse in Membranen (Romani und Scarpa 2000).

Auch bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und Integrität spielt Magnesium eine wichtige Rolle. Ungefähr 90 % des intrazellulären Magnesiums sind an Ribosomen oder Polynukleotide gebunden. Das Ribose-Phosphat-Rückgrat der DNA und RNA ist negativ geladen und hat eine Affinität zu Metallionen, weil sie die elektrostatische Abstoßung zwischen den Phosphaten mildern und die Basenpaarung und -stapelung erleichtern (Porschke 1995). Die intrazellulären Konzentrationen von Ca^{2+} und Na^{+} sind niedrig, daher dominieren die reichlich vorkommenden K^{+} und Mg^{2+} in der Metallbindung der Nukleinsäuren. Möglicherweise überwiegt freies Mg^{2+} in der Bindung von Nukleinsäuren durch seine stärker positive Ladung (Wolf und Cittadini 2003).

Zusätzlich zur Stabilisierung der DNA- und RNA-Doppelhelices dient Magnesium als Kofaktor bei der Reparatur von DNA-Schäden, verursacht durch schädigende Umwelteinflüsse, Mutagene und endogene Prozesse wie z. B. oxidativer Stress. Ebenso hat es eine entscheidende Bedeutung sowohl für die Genauigkeit der DNA-Replikation als auch bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose (Hartwig 2001).

Eine weitere wichtige Aufgabe des Magnesiums ist es, ATP oder andere Nukleotid-Triphosphate in dem katalytisch aktiven Zentrum des Enzyms zu halten. Es bietet zusätzliche Bindungsstellen für die Interaktion zwischen dem ATP-Mg-Komplex und dem Enzym und erhöht damit die Bindungsenergie. Sauerstoffatome verschiedener Phosphoryl-Gruppen des Nukleotids können in die Bindung mit Mg^{2+} involviert sein. Daher gibt es verschiedene Stereoisomere und jedes ATP-abhängige Enzym bindet normalerweise an nur eine isomere Form (Stryer 2007). Magnesium bindet auch direkt an Enzyme, modifiziert so deren Enzymstruktur oder übernimmt eine katalytische Rolle (Cowan 1995). Zusammenfassend dient Magnesium bei der katalytischen Aktivität der Proteine und Enzyme als wesentlicher Co-Faktor durch die: (i) Vermittlung der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen, (ii) Stabilisierung eines intermediären Metaboliten, (iii) Stabilisierung einer Produkt-Abgangsgruppe oder (iv) Überbrückung verschiedener reaktiver Substrate (Wolf und Cittadini 2003).

2.4 PHYSIOLOGIE

2.4.1 Magnesiumverteilung im Körper und auf zellularer Ebene

Tab.1 Mg-Verteilung im Körper

Speicher	%	Form	%	Bemerkung	Referenz
Knochen (Adsorbiert an Hydroxylapatit)	55 - 60 %			ein Drittel oberflächlich gebunden und austauschbar	(Huijgen et al. 1996)
Skelettmuskulatur	20 %				(Swaminathan 2003)
weiches Gewebe	19 %				
Blut	<1 %	freies ionisiertes Mg ²⁺	55 %	physiologisch aktiv	(Kimura 2006)
		Komplexe	10 - 15 %	Bikarbonat, Laktat, Citrat, Sulfat	
		Proteine	30 - 35 %	hauptsächlich Albumin	
25 g total beim erwachsenen Menschen					(Kimura 2006)
Mg-Gehalt (dokumentiert für das Tier): 0,4 g/kg					(Maguire und Cowan 2002)
11 - 12 % des Körpermagnesiums dynamisch und austauschbar					(Feillet-Coudray et al. 2002)

Die **Tabelle 1** zeigt eine Übersicht über die Verteilung von Magnesium im Körper des Menschen. Die 1 % der sich Blut befindlichen Mg-Menge verteilen sich zu 0,5 % auf Erythrozyten und nur 0,3 % existieren frei im Plasma. Die $[Mg]_{\text{Plasma/Serum}}$ -Konzentration wird mit 0,75 - 0,96 (1,2) mmol/l (Tso und Barish 1992; Weisinger und Bellorin-Font 1998; Laurant und Touyz 2000) sowie oftmals auch mit 0,7 – 0,9 (1,1) mmol/l (Swaminathan 2003; Kimura 2006; Ferre et al. 2011) angegeben. Nach Angaben der AOK liegt der Normwert für $[Mg]_{\text{Plasma}}$ bei Frauen zwischen 0,77 und 1,03 mmol/l und bei Männern zwischen 0,73 und 1,06 mmol/l. Im Knochen werden ein großer Teil des Magnesiums in einem "festen" Pool (Knochenkortex) und ein kleinerer Teil in einem "dynamischen" Pool (Trabekelwerk) gespeichert. Bei einem Mg-Mangel kann aus dem dynamischen Pool Magnesium schnell mobilisiert und der Pool durch eine hohe Zufuhr später wieder aufgefüllt werden (Classen und Nowitzki 1990). Bei Tieren konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an Magnesium in den Knochen direkt von der Versorgung mit Nahrung abhängig ist. Der Gehalt variiert zwischen den Spezies und innerhalb einer Spezies (Wallach 1990). Ein Mg-Mangel wirkt sich negativ auf den Knochenstoffwechsel aus und kann zu einer verminderten Knochenbildung und einem Verlust

der Knochenstruktur (Osteopenie bzw. Osteoporose) führen (Launius et al. 2004; Rude und Gruber 2004). Nach dem Skelett ist der intrazelluläre Pool der zweitgrößte Mg-Pool. Nach Kalium (K) ist Magnesium das zweithäufigst vorkommende intrazelluläre Kation (Morii et al. 2006).

Bei Untersuchungen an Tieren wurde nachgewiesen, dass unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche Konzentrationen von Magnesium aufrecht erhalten, bedingt durch ihre metabolische Aktivität und ihre Bedeutung für das Leben. Gehirn, Herz, Leber und Nieren zeigen die höchste Mg-Konzentration und -Transportrate durch die Zellmembran (Swaminathan 2003). Reines Fett enthält nur Spuren von Magnesium (Classen und Nowitzki 1990). In schnell proliferierenden Zellen ist die Mg-Transportrate generell höher, was einen Zusammenhang mit der metabolischen Aktivität des Gewebes herstellt.

Je nach Zelltyp sind etwa 5 – 10 % des intrazellulären Magnesiums ionisiert ($[Mg^{2+}]_{intra}$). Die restlichen 90 – 95 % sind an negativ geladene Liganden wie ATP, Proteine, DNA und RNA gebunden oder liegen in Chelatkomplexen vor (Günther 1993). Die $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Konzentration ist abhängig vom Gewebe und dem pH-Wert. In der Literatur werden variable Konzentrationen angegeben. Eine Übersicht über die $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Konzentration in verschiedenen Geweben ist in der Veröffentlichung von Romani und Scarpa (1992) zu finden. Im Allgemeinen liegt der Referenzbereich zwischen 0,5 mmol/l und 1,0 mmol/l (zusammengefasst bei Swaminathan 2003) (Lymphozyten: $[Mg^{2+}]_{intra} > 0,5$ mmol/l gemessen mit NMR von Rink, Tsien et al. (1982); $[Mg^{2+}]_{intra}$ 0,54 – 0,67 mmol/l gemessen mit ionenselektiver Elektrode (ISE) von Maj-Zurawska (1994))

Quamme, Dai et al. (1993) haben gezeigt, dass intrazelluläres ionisiertes Mg^{2+} heterogen über die Zelle verteilt ist. Eine Kompartimentierung innerhalb der Zelle ergibt sich aus der Verteilung der Mg^{2+} -bindenden Liganden (Günther 2006). Mg-Speicher sind vor allem Mitochondrien, Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Retikulum (ER). Zwischen den intrazellulären Organellen bewegt es sich schnell hin und her und seine intrazelluläre Konzentration ist in engen Grenzen geregelt (Laurant und Touyz 2000).

2.4.2 Physiologische Funktionen von Magnesium

Magnesium dient als Regulator vieler physiologischer Prozesse, einschließlich der neuromuskulären, immunologischen, hormonellen und kardiovaskulären Funktionen. Ebenso ist es an der Aufrechterhaltung der Membranstabilität beteiligt, indem es die negativ geladenen, carboxylierten und phosphorylierten Kopfgruppen der Lipide vernetzt (Cowan 1995). Deshalb hat ein verringerter Mg-Gehalt einige negative Auswirkungen auf die Membranstabilität, was zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -, Na^+ - und K^+ -Ströme führt. Dadurch ist die Na^+ - und Ca^{2+} -Aufnahme in die Zelle verstärkt. Gleichzeitig strömen Mg^{2+} und K^+ aus der Zelle. Diese erheblichen Veränderungen im Elektrolythaushalt als Folge des Mg-Mangels und der verstärkte Einstrom von Ca^{2+} kann zu Hypertonie und koronaren Vasospasmen in kardiovaskulären glatten Muskelzellen sowie zu Arrhythmien führen. Auch das vermehrte Auftreten von Krämpfen durch eine erhöhte Kontraktilität der Skelettmuskelzellen erklärt sich aus dieser Elektrolytimbalanz (Vormann et al. 1992; Laires und Monteiro 2006).

Magnesium ist ein physiologischer Kalzium (Ca)-Antagonist (zusammengefasst bei Iseri und French 1984). Es reguliert sowohl die Konzentration des freien Ca^{2+} im Zytosol als auch seine Funktion als Signalmolekül. Dies geschieht auf unterschiedliche Weise. Zum einen hemmt Magnesium die Ca -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Diese Hemmung beruht nicht ausschließlich auf einer Konkurrenz mit Kalzium um die Bindungsstellen am Ryanodin-Rezeptor, sondern ist auch auf eine zeitweise Blockierung des Ryanodin-Rezeptor-Kanals zurückzuführen (flickery-type-block) (Kawano 1998). Ein weiterer regulatorischer Mechanismus ist die Konkurrenz beider Moleküle um dieselben Bindungsstellen an kontraktilen Proteinen wie Troponin C, Myosin und Aktin (Holroyde et al. 1980). Nicht zuletzt fördert Magnesium die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR bzw. ER durch Stimulierung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (Stephenson und Podolsky 1977; Chakraborti et al. 2002; Belin und He 2007). Agus und Morad (1991) berichteten von einer blockierenden Wirkung des extrazellulären Magnesiums auf den einwärts gerichteten Ca -Einstrom über L-Typ-Kalzium-Kanäle. Zusammengefasst gibt es drei wichtige große Membranproteine, die durch Magnesium reguliert werden: Ca^{2+} -ATPase, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und Na^+/K^+ -ATPase. Unter Mg-Mangelbedingungen kann Ca^{2+} schnell aus dem SR freigesetzt werden, was zu einem Anstieg der Kontraktilität führt, während eine hohe Mg-Konzentration diesen Prozess durch eine Senkung der Konzentration freien Ca^{2+} im Zytosol hemmt (Iseri und French 1984; al-Ghamdi et al. 1994).

Im ZNS wirkt sich die Ca -antagonistische Eigenschaft neuroprotektiv aus. Magnesium reduziert den Ca -Einstrom in die Zelle durch die Blockierung des NMDA-Kanals (ein unspezifischer Kationen-Kanal) und mindert bei Verletzungen wie Hirn-Traumata, Ischämie und Nervenschäden das Ausmaß der Zellschädigung (Turner und Vink 2006). Doch auch

Kalium unterliegt dem Einfluss der intra- und extrazellulären Mg-Konzentration. Mg^{2+} fungiert als ein offener Kanal-Blocker, sobald Kalium aus der Zelle strömt. Es verhindert somit vollständig den K-Ausstrom (Agus und Morad 1991; Chakraborti et al. 2002). Darüber hinaus aktiviert Mg^{2+} die Na^+/K^+ -ATPase, ein wichtiges Protein bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotential (Altura und Altura 1984; Ryan 1991).

Durch diesen weitreichenden Einfluss auf den Elektrolythaushalt der Zelle spielt Magnesium eine wesentliche Rolle unter anderem bei der Herzerregbarkeit und dem Herzrhythmus, der neuronalen Überleitung, der Kontraktion von Skelett- und glatter Muskulatur, beim Vasotonus und der Regulierung des Blutdrucks.

2.4.3 Magnesiumhomöostase und Regulation auf Zellebene

Magnesium-Efflux-Systeme

Generell können Mg-Efflux-Systeme in Natrium (Na)-abhängige und Na-unabhängige Systeme unterteilt werden. Die ersten Versuche zum zellulären Mg-Transport fanden an Erythrozyten statt und zeigten, dass diese Zellen einen signifikanten Anteil ihres zellulären Gehalts an Magnesium gegen extrazelluläres Natrium austauschen. Die auftretenden Mg-Fluxe wurden durch den Na-Kanalblocker Amilorid vollständig gehemmt (Günther und Vormann 1985). Diese Ergebnisse wurden durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt (Flatman und Lew 1980; Feray und Garay 1986; Ludi und Schatzmann 1987; Feray und Garay 1988 unter Anwendung der Na-Kanalblocker Imipramin und Quinidin; Flatman und Smith 1990). Dieser Na-abhängige Ausstrom von Mg^{2+} wurde als Na^+/Mg^{2+} -Austauscher benannt. Er ist das bedeutendste Mg-Efflux-System und wurde in vielen Zelltypen nachgewiesen. Über sein Vorkommen in bestimmten Zelltypen existieren stellenweise kontroverse Resultate (Lymphozyten: Grubbs et al. 1984; Wolf et al. 1997) (Herzmuskelzellen: Handy et al. 1996; Tashiro und Konishi 1997)). Ebenso ist seine Stöchiometrie noch unklar. In der Literatur werden in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschiedliche Angaben gemacht: hauptsächlich $3 Na^+_{in} : 1 Mg^{2+}_{out}$ und nur unter bestimmten Bedingungen $1 : 1$ (Flatman und Lew 1981; Ludi und Schatzmann 1987) oder $2 Na^+_{in} : 1 Mg^{2+}_{out}$ (Günther et al. 1984). Versuche unter nichtphysiologischen Bedingungen, unter denen die Mg^{2+} -Fluxrichtung sich umkehrt, z. B. wenn $[Na^+]_{extra} > [Na^+]_{intra}$ oder wenn $[Na^+]_{extra} = 0$, sind fragwürdig.

Viele verschiedene Faktoren regulieren den Na^+/Mg^{2+} -Austauscher, so z. B. Angiotensin II, Vasopressin, Isoprenalin, Endothelin-1 und Insulin (Okada et al. 1992; Touyz und Schiffrin 1993; Romani und Maguire 2002; zusammengefasst in Sontia und Touyz 2007).

Durchgeführte Versuche von Fagan und Romani (2000; 2001) zur hormonellen Regulation des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers zeigten eine Stimulierung durch cAMP. Katecholamine (Epinephrin, Norepinephrin und Phenylephrin, aber nicht Isoprenalin) führten ebenfalls über Ca^{2+} bzw. Ca-abhängige Signalwege zu einer Aktivierung des Mg-Transports. Daraus konnte abgeleitet werden, dass der Mg-Efflux über beta- (cAMP) und alpha1-adrenerge Rezeptorstimulation (Ca^{2+} /Calmodulin) aktiviert werden kann (Keenan et al. 1996). Erst kürzlich konnte der $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher auf molekularer Ebene identifiziert werden. Kolisek, Nestler et al. (2012) konnten das Transportprotein dem Gen *SLC41A1* zuordnen (siehe Kapitel 2.4.4).

Neben dem Na-abhängigen Transportmechanismus gibt es auch Na-unabhängige Transportmechanismen. Zu nennen sind hier der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher, der $\text{Mn}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher, der $\text{Mg}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Antiporter und der $\text{Cl}^-/\text{Mg}^{2+}$ -Cotransporter. Versuche hierzu erfolgten hauptsächlich an Leberzellen und Erythrozyten. Eine Übersicht ist in der Veröffentlichung von Romani et al. (2007) zu finden. In verschiedenen experimentellen Modellen bzw. unter unterschiedlichen Bedingungen, in denen kein Na^+ zum Counter-Transport zur Verfügung steht, kann zelluläres Magnesium im Austausch mit anderen Kationen aus der Zelle ausgeschleust werden: gegen Mn^{2+} oder Mg^{2+} (Feraý und Garay 1987; Günther und Vormann 1987; Günther und Vormann 1990) und gegen Ca^{2+} oder Sr^{2+} (Cefaratti et al. 1998). Messungen an aufgereinigten Leberzellmembranen zeigten, dass der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher durch Ca^{2+} oder andere divalente Kationen aktiviert wird und elektroneutral arbeitet (1 : 1). Amilorid und Imipramin führten zu einer Hemmung des Austauschers (Cefaratti et al. 1998; 2000). Die Identifikation und Charakterisierung der korrespondierenden Gene und Proteine sind bis jetzt noch nicht vollständig erfolgt.

Magnesium-Influx-Systeme

Grundsätzlich werden folgende Mg-Influx-Mechanismen auf Grundlage funktioneller Studien vorgeschlagen: ein Mg-Influx über einen $\text{Mg}^{2+}/\text{Anion}$ -Cotransporter (mit HCO_3^- oder Cl^- (Günther 1993)) und ein Influx über Kationenkanäle entlang eines Konzentrationsgradienten (Flatman 1991). Einige dieser Proteine mit dem Potential des Mg-Transports wurden bereits biochemisch und funktional identifiziert und als Mg-Transporter per se bestätigt. Hierbei handelt es sich um die Kanalproteine: Mrs2p (mitochondrialer Kanal) (Kolisek et al. 2003), SLC41A1, SLC41A2, MagT1, ACDP2, TRPM6/7 (siehe Kapitel 2.4.4 - 2.4.10) und der parazelluläre Mg-Transporter Paracellin-1 (Claudin-16) im Nierenepithel (Simon et al. 1999). Obwohl verschiedene Mg-Transportwege biophysikalisch schon beschrieben wurden, bleibt die molekulare Identität eines Großteils der in die Mg-Homöostase involvierten Komponenten unklar. In den folgenden Kapiteln werden einige der Transporter näher betrachtet. Als ein

wichtiger experimenteller Ansatz dienen mRNA-Screenings an Geweben und Zellen, die unter hypomagnesiämischen Bedingungen gezüchtet wurden. Die erhöhte Expression eines Gens war ein Hinweis auf eine Regulation durch Magnesium. Ebenso lieferten funktionelle Klonierungs- und Komplementierungsversuche weitere Indizien zur Identifizierung potentieller Mg-Transporter (Goytain und Quamme 2005). **Tabelle 2** zeigt eine Übersicht über Transportproteine, deren Fähigkeit zum Mg-Transport heute weitestgehend anerkannt ist.

Tab.2 Übersicht ausgewählter Mg-sensitiver Gene (Veröffentlichungen siehe Kapitel 2.4.4 – 2.4.10)

Gen	Beschreibung	Bakterielles Homolog	Funktion	Mg ²⁺ -regulierte Expression	Kation-selektivität
<i>SLC41A1</i>	Solute Carrier family 41, member 1	MgtE	Mg ²⁺ -Carrier, primär Efflux -System	Ja	Mg>Sr>Fe>Ba>Cu
<i>SLC41A2</i>	Solute Carrier family 41, member 2	MgtE	Mg ²⁺ -Carrier	Ja	Mg>Ba>Ni>Ca
<i>SLC41A3</i>	Solute Carrier family 41, member 3	MgtE	mutmaßliches Mg ²⁺ Influx - System		Ba>Mg>Ni>Zn
<i>ACDP2 (CNNM2)</i>	Ancient conserved domain protein 2	CorC	Mg ²⁺ -Transporter mit kanal-ähnlichen Eigenschaften, primär Influx - System	Ja	Mg>Sr>Zn>Cd
<i>MagT1</i>	Magnesium Transporter 1		Mg ²⁺ -Transporter mit kanal-ähnlichen Eigenschaften, primär Influx - System	Ja	Mg>>>Ba>Fe=Cu
<i>TRPM6</i>	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6		Mg ²⁺ Chanzym, primär Influx - System	Ja	Ba>Ni>Mg>Zn>Ca
<i>TRPM7</i>	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7		Mg ²⁺ Chanzym, primär Influx - System	Ja	Ba>Ni>Mg>Ca, Zn
<i>NIPA1</i>	Non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1		Mg ²⁺ -Transporter mit kanal-ähnlichen Eigenschaften, primär Influx - System	Ja	Mg>Sr>Co>Fe=Zn
<i>N33 (TUSC3)</i>	Tumor suppressor candidate 3		mutmaßlicher Mg ²⁺ -Transporter / Homöostase-faktor	Ja	Mg>Mn>Cu>Fe

2.4.4 Solute Carrier Family 41 Member A1 (SLC41A1)

SLC41A1 ist eines von zurzeit drei Mitgliedern der Familie 41 der Solute Carrier. Es liegt auf dem Chromosom 1 (1q31-32) und kodiert für ein entferntes Homolog des bakteriellen Mg-Transporters MgtE. Basierend auf Sequenzhomologien sowie strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten identifizierten Wabakken et al. (2003) das erste eukaryotische Mitglied der Superfamilie 41. *SLC41A1* besteht aus 513 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 56 kDa. Als ein integrales Plasmamembranprotein besitzt es elf Transmembrandomänen (TMD) mit einem intrazellulär orientierten N-Terminus und bildet Proteinkomplexe (Kolisek et al. 2008). Zwei der integralen Domänen weisen eine 52 %ige bzw. 46 %ige Homologie zu einem integralen Membranpart der bakteriellen MgtE-Familie auf. Die Solute Carrier tragen vier mögliche cAMP-abhängige Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen, was auf eine posttranslationale Modifikation und auf eine Regulation der Lokalisation und Funktion hindeutet (Goytain und Quamme 2005).

Transkripte des Gens wurden in den meisten Geweben nachgewiesen, mit der höchsten Expression im Herzen, Gehirn, Nieren, Leber und Hoden und einer geringeren Expression im Skelettmuskel, Darm, Prostata, Nebenniere und Schilddrüse (Wabakken et al. 2003; Goytain und Quamme 2005). Wabakken et al. vermuteten eine Funktion des Proteins im Mg-Transport, ähnlich der des MgtE-Transporters. Quamme und Goytain (2005) konnten an Geweben von, unter hypomagnesiämischen Bedingungen gehaltenen, Mäusen und *SLC41A1*-exprimierenden *Xenopus-laevis*-Eizellen zeigen, dass *SLC41A1* ein relativ geringselektiver divalenter Kationentransporter ist, der jedoch vorrangig einen Mg^{2+} -Influx vermittelt. Sie charakterisierten *SLC41A1* als einen Transporter mit kanalähnlichen Eigenschaften.

In mehreren Versuchsansätzen widerlegten Kolisek et al. (2008) die Annahme Goytain und Quammes, dass es sich um ein Mg-Influx-System handelt. Ihre Versuche in einem Mg-defizienten *Salmonella-enterica*-sv.-*typhimurium*-Stamm (alle drei Mg-Transportproteine waren zerstört) zeigten, dass *SLC41A1* die fehlenden bakteriellen Mg-Transporter funktionell ersetzen kann und so das Wachstum des Stamms wiederherstellte. Darüber hinaus beobachteten sie in *SLC41A1*-überexprimierenden HEK-Zellen einen auswärts gerichteten Mg-Transport und eine *SLC41A1*-abhängige Reduktion des freien Magnesiums in der Zelle. Sie bewiesen auf funktioneller Ebene eine direkte und spezifische Beteiligung am Mg-Transport eukaryotischer Zellen, im Detail den auswärtsgerichteten Transport von Magnesium aus der Zelle. Weiterführende und vertiefende Experimente von Kolisek, Nestler et al. (2012) untermauerten die früheren Resultate und identifizierten *SLC41A1* als den Na^+/Mg^{2+} -Austauscher und wichtigstes Mg-Efflux-System, welches einen prominenten Anteil an der Aufrechterhaltung der Mg-Homöostase innerhalb der Zelle und im Körper innehat.

Zusammenfassend zeigten die Resultate, dass SLC41A1 einen strikt Na-abhängigen Mg-Efflux vermittelt. Dieser wird durch die Erhöhung der zytosolischen Mg^{2+} -Konzentration stark aktiviert, durch Imipramin und Quinidin gehemmt und durch eine cAMP-abhängige Phosphorylierung via PKA reguliert. Dieser Mechanismus macht SLC41A1 zu einem geeigneten Kandidaten für die Mg^{2+} -Ausschleusung an der basolateralen Membran der Mg-absorbierenden bzw. -reabsorbierenden Epithelien in Darm und Niere.

Neueste Studien brachten *SLC41A1* mit der Parkinson-Erkrankung (PD, [MIM 613164]), einer komplexen neurodegenerativen Störung, in Verbindung. Sie ist ätiologisch gekennzeichnet durch einen Verlust dopaminerger Neuronen in der Substantia nigra, was sich klinisch durch Akinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität manifestiert (Pachatz 1994). Im Zusammenhang mit der Identifizierung prädisponierender genetischer Loci zur Aufklärung der idiopathischen PD wurden innerhalb verschiedener Populationen verschiedene genome-wide-association-Studien (GWAS) durchgeführt. Die Sequenzierung der Gene innerhalb des neuen Locus PARK16 identifizierte eine neue „coding variante“ des Gens *SLC41A1* (missense-Mutation im Exon 8) bei einem von 182 pathologisch nachgewiesenen PD-Fällen (Satake et al. 2009). Nachfolgende Tests mit einer größeren Zahl von Probanden (454) konnten keinen weiteren Träger der Mutation aufdecken (Tucci et al. 2010; Yan et al. 2011).

2.4.5 Solute Carrier Family 41 Member A2 u. A3 (SLC41A2 / SLC41A3)

Die eukaryotischen Proteine Solute Carrier Family 41, Member 2 (SLC41A2) und Solute Carrier Family 41, Member 3 (SLC41A3) bilden zusammen mit dem Protein SLC41A1 eine neue und einzigartige Familie innerhalb der SLC Superfamilie, die 44 Familien von Proteinen beinhaltet und in den Transport verschiedener organischer und anorganischer Stoffe involviert ist. Beide Transporter weisen eine 70 %ige Ähnlichkeit zu SLC41A1 auf. Kennzeichnend für diese Superfamilie ist die geringe Homologie zweier integraler TMD zum bakteriellen Mg-Transporter MgtE. *SLC41A2* liegt auf dem Chromosom 12 (12q23.3) und *SLC41A3* wird dem Genort 3q21.2 zugeordnet. Topologisch deuten die Homologien und die elektrophysiologischen Versuche Goytain und Quamme (2005) darauf hin, dass beide Proteine integrale Plasmamembrantransporter bilden. Sahni et al. (2007) bewiesen wenig später, dass es sich bei heterolog exprimiertem SLC41A2 um ein Plasmamembranprotein mit elf TMD handelt.

Bei Untersuchungen an Mäusen fanden sich in vielen Geweben mRNA der Gene *SLC41A2* und *SLC41A3*. Der Gehalt war unter hypomagnesiämischen Bedingungen erhöht, d.h. die Expression unterlag der Regulation durch Magnesium (Goytain und Quamme 2005). Über

die Funktion beider Proteine ist bisher wenig bekannt. Goytain und Quamme (2005) zeigten mittels Patch-Clamp-Technik an SLC41A2 und SLC41A3 überexprimierenden *Xenopus-laewis*-Eizellen, dass beide Proteine permeabel für verschiedene divalente Kationen sind, aber Mg^{2+} als Substrat bevorzugen. Aufgrund dessen wurden sie als Mg-Transporter klassifiziert.

Sahni, Nelson et al. (2007) klonen jeweils das *SLC41A2*-Gen des Menschen und des Huhns in die *TRPM7*-defiziente Zelllinie DT40 (Lymphozyten). Sie beobachteten eine Zunahme der Proliferation der *TRPM7*-defizienten Zellen in Abhängigkeit der Expressionsrate. Der intrazelluläre Mg-Gehalt stieg ebenfalls. Im Gegensatz zu Goytain und Quamme konnte das Team um Sahni keine messbaren Mg^{2+} -Ströme in den DT40 Zellen nachweisen. Dennoch schlossen sie aus den funktionellen Studien, dass SLC41A2 ein plasmamembranständiges Mg-Influx-System darstellt. Neueste Versuche von Nestler et al. (2012, unveröffentlichte Daten) identifizierten SLC41A3 als ein vermeintliches Mg-Influx-System.

2.4.6 Ancient Conserved Domain Protein Subtype 2 (ACDP2, CNNM2)

CNNM2 gehört der Genfamilie der Ancient Conserved Domain Proteins an. Der Name bezieht sich auf eine alte, hoch konservierte Domäne, die sich alle Mitglieder dieser Familie über eine weite Spanne von Spezies vom Bakterium über Hefen, *Drosophila melanogaster* bis hin zu den Säugetieren teilen. Das Gen wird dem Genort 10q24.32 zugeteilt und konnte 2003 von Wang, Yang und Mitarbeitern erstmals molekular geklont werden (Wang et al. 2004).

Drei Splicevarianten wurden in Säugetierzellen identifiziert und damit existieren drei Isoformen. Isoform 2 unterscheidet sich von der vollständigen Isoform 1 durch eine 22 Aminosäuren-lange Deletion. Isoform 3 enthält keine CBS und CorC-HlyC-Domäne. Letztere ist eine transporterassoziierte Domäne und könnte in die Modulation des Ionentransports involviert sein. Die CBS-Domäne spielt möglicherweise eine regulatorische Rolle (Ignoul und Eggermont 2005). Die genaue Funktion ist unklar. Zwei CBS Domänen bilden einen Spalt, der als potentielle Liganden Bindungsstelle fungiert (Bindung von ATP). Es ist anzunehmen, dass Isoform 3 keine Transportfunktion ausüben kann, da keine Ligandenbindung möglich ist (de Baaij et al. 2012).

Humanes CNNM2 zeigt eine starke Homologie zum bakteriellen CorC-Protein, das in den Mg- und Co-Efflux/-Transport involviert ist. Bei allen drei Isoformen handelt sich um integrale Membranproteine, denen in Abhängigkeit von der Vorhersagesoftware entweder für alle Isoformen vier TMD oder für Isoform 1 sieben TMD und für die Isoformen 2 und 3 sechs TMD vorhergesagt werden (Sponder et al. 2010). CNNM2 wird posttranslational stark

modifiziert, bevor es als ein Multimer in die Plasmamembran integriert wird (de Baaij et al. 2012).

Die innerzelluläre Lokalisierung der Isoform 1 reicht vom Nukleus, ER und Zytoplasma bis hin zur zytoplasmatischen Membran (Wang et al. 2004; Goytain und Quamme 2005).

In epithelialen Nierenzellen wiesen Stuiver et al. (2011) sowohl endogenes als auch rekombinantes CNNM2 hauptsächlich entlang der basolateralen Membran des distalen Tubulus-Segments nach. Sie beobachteten eine starke Expression von *CNNM2* in den für die Mg-Rückresorption hauptsächlich verantwortlichen Nephronsegmenten TAL (thick ascending limb of loop of Henle, dicker aufsteigender Ast der Henle Schleife) und DCT (distal convoluted tubule, distaler gewundener Tubulus). Generell wird *CNNM2* sowohl in Mausgeweben als auch in menschlichen Geweben ubiquitär exprimiert, vor allem in Niere, Gehirn, Milz und Hoden, am geringsten im Skelettmuskel (Wang et al. 2004; de Baaij et al. 2012).

Den ersten Hinweis auf die Funktion von CNNM2 lieferten Studien von Goytain und Quamme (2005) an *Xenopus-laevis*-Eizellen und murinen DCT-Zellen. Gehalten unter hypomagnesiämischen Bedingungen fand das Forscherteam eine Hochregulierung von *CNNM2* in renalen Epithelzellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei einer Expression von murinem *CNNM2* in *Xenopus-laevis*-Eizellen, dieses Protein den Transport einer Reihe divalenter Kationen induziert, einschließlich Mg^{2+} , nicht aber Ca^{2+} . Aufgrund seines Vorkommens in der basolateralen Membran entlang des distalen Tubulus der Niere könnte *CNNM2* in die Mg-Extrusion involviert sein. Allerdings lässt die Mg-Sensitivität der Na-Ströme eher auf einen Mg-empfindlichen Mechanismus als auf den eigentlichen Mg-Transport schließen.

Im Jahr 2010 untersuchten Sponder, Svidova et al. die Isoformen 1 und 2 auf ihre Funktionalität. Sie konnten zeigen, dass humanes *CNNM2* sp.v.1 sowohl teilweise das Wachstum als auch die Funktion der bakteriellen Mg-Transporter CorA, MgtA und MgtB im wachstumsgehemmten *Salmonella-enterica*-sv.-*typhimurium*-MM281-Stamm ersetzen kann. Somit konnte *CNNM2* sp.v.1 als eukaryotischer Mg-Transporter auf funktionaler Ebene identifiziert werden. Mag-Fura-2-Messungen bestätigten dies und zeigten den Einstrom von Mg^{2+} über große einwärtsgerichtete Mg-Gradienten in *CNNM2* sp.v.1. Die Isoform 2 ist wahrscheinlich auch ein funktionaler Transporter mit einer Affinität zu anderen Ionen. Die im Vergleich zur Isoform 1 fehlende Region scheint für die Mg^{2+} -Bindung und die Unterscheidung zwischen Influx- und Efflux-Modus entscheidend zu sein (Sponder et al. 2010). Aufgrund ihrer Untersuchungen der Membrantopologie stellten de Baaij, Stuiver et al. (2012) die Hypothese auf, dass CNNM2 eher als ein intrazellulärer Mg^{2+} -Sensor fungiert, als den direkten Transport von Mg^{2+} zu vermitteln.

Stuiver, Lainez et al. (2011) suchten an der Charité Berlin gezielt nach Mutationen des *CNNM2*-Gens im Zusammenhang mit dem Auftreten einer dominant vererblichen Hypomagnesiämie in zwei unabhängigen Familien [MIM 613882]. Phänotypisch kam es in beiden Familien zu Mg-Verlusten über die Niere und zu einer daraus entstehenden Hypomagnesiämie. Das Team fand zwei verschiedene Typen von Mutationen. In einer Familie verursachte eine 1 bp-Deletion einen Frameshift, aus dem ein verkürztes Protein resultierte. In der zweiten Familie führte eine *missense*-Mutation zu einer Substitution einer Aminosäure in einer hochgradig konservierten Region von *CNNM2* (ancient conserved domain) und beeinträchtigte die Funktion des Proteins signifikant.

2.4.7 Magnesium-Transporter 1 (MagT1)

Der Magnesium-Transporter, Subtyp 1 (MagT1) liegt auf dem Chromosom X, am Genort Xq21.1. Humanes MagT1-Protein ist mit 66 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenz homolog zum humanen Tumor Suppressor Candidate 3 (TUSC3, N33), verfügt über fünf putative TMD und zeigt keine Homologien zu bekannten prokaryotischen Mg-Transportern.

MagT1 wird universell in vielen Geweben exprimiert. Northern-Blot-Analysen zeigten einen hohen Gehalt an *MagT1*-spezifischer mRNA in Leber, Niere, Darm und Herz. Das Gen wurde ursprünglich als ein hochreguliertes Transkript in murinen DCT-Zellen entdeckt, die unter hypomagnesiämischen Bedingungen gewachsen waren. Durch eine nachfolgende Überexpression in *Xenopus-laevis*-Eizellen konnten Goytain und Quamme (2005) mittels Two-Electrode-Voltage-Clamp (Patch-Clamp)-Technik und Fluoreszenzmessungen einen *MagT1*-vermittelten Mg²⁺-Transport messen. MagT1 ist ein hoch selektiver Mg-Transporter, der durch extrazelluläres Magnesium über den Weg der Phosphorylierung durch die PKA und PKC reguliert wird.

Im Jahr 2009 veröffentlichten Zhou und Clapham umfassende Ergebnisse über Versuche an *Saccharomyces cerevisiae*, Zebrafischembryonen und HEK-Zellen. Sie konnten belegen, dass ein Knockdown entweder von *MagT1* oder *N33* signifikant die totale und freie intrazelluläre Mg-Konzentration in Säugetierzellen senkt. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ersetzte MagT1 vollständig den hefeeigenen Mg-Transporter ARL1. Bei Zebrafischembryonen führte das Ausschalten einer der beiden homologen Proteine MagT1 bzw. N33 jeweils zu einem Wachstumsstillstand. Erhöhte Mg-Zufuhr oder die Supplementierung mit Säugetier-mRNA konnten diesen Effekt aufheben. Genau wie N33 ist das Protein MagT1 mit der N-Oligosaccharyltransferase assoziiert und spielt wahrscheinlich ebenso eine Rolle in der N-Glykosylierung (Zhou und Clapham 2009).

Neueste Studien beschreiben MagT1 als einen Regulator des Immunsystems. Magnesium fungiert als second messenger bei der Aktivierung der T-Lymphozyten. Eine Stimulierung des T-Zellrezeptors führt zu einer Aktivierung des MagT1-Transporters und einer Erhöhung des intrazellulären freien Mg-Gehalts. Magnesium wiederum aktiviert auf bis jetzt noch unbekanntem Weg die PLC- γ 1 (Wu und Veillette 2011). Bei Wiederkäuern ist MagT1 einer der wichtigsten Mg-Transporter und die Expressionsrate und funktionelle Aktivität hängen vom zellulären Mg-Status ab (Schweigel et al. 2008).

Zurzeit sind zwei Genmutationen des *MagT1*-Transporters bekannt: (1) XMEN und (2) Mentale Retardierung. (1) XMEN [MIM 300853] ist eine X-chromosomale Immundefizienz, verursacht durch eine 10 bp Deletion bzw. eine arg137-zu-ter-Mutation im *MagT1*-Gen. Phänotypisch ist XMEN charakterisiert durch eine CD4-Lymphopenie, schwere chronische virale Infektionen (Epstein-Barr-Virus) und eine defekte T-Lymphozyten-Aktivierung. Studien an Zellen von XMEN-Patienten zeigten, dass die MagT1-Defizienz den Mg²⁺-Influx aufhob. Dies führte zu einer verminderten Antwort der Antigen-Rezeptor-Bindung mit einer nachfolgend defekten Aktivierung von PLC- γ 1 und einem deutlich verringertem Einstrom von Ca²⁺ in die T-Lymphozyten (Li et al. 2011; Wu und Veillette 2011).

(2) Die Mentale Retardierung [MIM 300716] wurde bei mehreren Mitgliedern einer australischen Familie entdeckt. Sie wird hervorgerufen durch eine Mutation im *MagT1* kodierenden Gen auf dem X-Chromosom (Molinari et al. 2008).

2.4.8 Tumor Suppressor Candidate 3 (TUSC3, N33)

Das Tumor-Suppressor-Candidate-Gen (*TUSC3*, *N33*) wurde erstmals von MacGrogan im Rahmen der Aufklärung des Struktur- und Expressionsprofils der chromosomalen Region 8p22 geklont. Aufgrund des hohen Verlustes der Heterozygotie innerhalb dieser Region wurde dort die Lage möglicher Tumorsuppressor-Gene vermutet. Bisherige Versuche stützen diese These. *N33* liegt innerhalb einer homozygot deletierten Region, die in Verbindung mit metastasierendem Prostatakrebs steht (MacGrogan et al. 1996). Es wurden zwei Transkriptvarianten des Gens identifiziert, die zwei verschiedene Isoformen kodieren. *N33* kodiert für ein Membranprotein mit wahrscheinlich vier TMD. Die höchste Expression wurde im Ovar, in der Plazenta, der Prostata, den Hoden, im Fettgewebe und in der Lunge gefunden (Zhou und Clapham 2009). Auch in vielen Tumorzelllinien epithelialen Ursprungs wurde eine Expression nachgewiesen.

Auf einen potentiellen antitumorösen Effekt von *N33* weisen die Studien von Pils, Horak et al. (2005) hin. Detaillierte Expressionsanalysen in primärem Ovarialtumorgewebe und ovariellen Krebszelllinien zeigten eine tumorgradabhängige Expression des Gens. Seine geringe

Expression in Tumoren in fortgeschrittenen FIGO-Stadien (Die FIGO-Klassifikation ist ein von der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) vorgeschlagenes System zur Einteilung gynäkologischer Tumoren.) und bei Patienten mit Rezidiv führten Pils und sein Team zu der Annahme, dass *N33* eher an späteren Ereignissen wie Metastasierung als an der Tumorgenese beteiligt ist. Möglicherweise spiegelt der Verlust dieses Gens das späte Stadium des Tumorgeschehens wieder.

Zhou und Clapham (2009) brachten *N33* erstmalig mit dem Mg-Transport in Verbindung. Ihre Versuche zeigten zum einen, dass *N33* eine Hauptkomponente im Mg-Transport in Säugetierzellen ist, zum anderen wie sein Homolog MagT1 eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung bei Vertebraten spielt (Zebrafisch). Der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*-*alr1* stoppt das Wachstum bei Vorliegen eines mutierten MagT1. Zhou und Clapham (2009) nutzten diese Eigenschaft und klonierten die beiden bekannten Splicevarianten von *N33* in die Hefezellen. *N33* sp.v.2 ersetzte vollständig den mutierten hefeeigenen Mg-Transporter ALR1 und hob den Wachstumsstopp auf. Kelleher, Karaoglu et al. (2003) zeigten, dass *N33* für eine Untereinheit des ER-gebundenen Oligosaccharyl-Transferase (OST)-Komplexes kodiert. Der Komplex katalysiert einen lebenswichtigen Schritt im Protein N-Glykolyseprozess.

Nonsense-Mutationen und homozygote Deletionen im *N33*-Gen mit daraus folgender Inaktivierung dieses Gens sind verknüpft mit der non-syndromalen autosomal rezessiven mentalen Retardierung (NSARMR, [MIM 611093]). Die genetischen Grundlagen dieser Erkrankung sind stark heterogen. *N33* ist das fünfte Gen, welches im Zusammenhang mit NSARMR steht und das erste, für das Mutationen in mehr als einer Familie gefunden wurden (Garshabi et al. 2008). Gleichfalls berichteten Garshabi, Kahrizi et al. (2011) von einem kompletten Fehlen eines funktionalen Transkripts bei Patienten mit NSARMR, verursacht durch eine homozygote Deletion in der 8p22 Region.

2.4.9 Non-Imprinted in Prader-Willi/ Angelman Syndrome 1 (NIPA1)

Das Gen *NIPA1* (Non-Imprinted in Prader-Willi/Angelman-Syndrom 1) liegt beim Menschen auf dem Chromosom 15 (15q11) innerhalb des sogenannten SPG6-Locus. SPG6 ist eine Form der spastischen Paraplegie, deren Ursache in einer Mutation innerhalb dieses Genorts vermutet wurde. SPG6 wiederum liegt innerhalb einer Region, welche bei der Klasse I-Form des Prader-Willi-Syndroms (PWS) [MIM 176270] und Angelman-Syndroms [MIM 176270] (AS) (Nicholls und Knepper 2001) deletiert ist. SPG6 beherbergt vier nicht-imprintete Gene und liegt proximal der imprinteten PWS/AS-Domänen. Chai, Locke et al. (2003) fanden exakt in der Region SPG6 das Gen *NIPA1*, als eines dieser vier hoch konservierten Gene. Diese

Gene, einschließlich *NIPA1*, sind bei Patienten mit der Klasse I-Form des PWS oder AS-Syndroms deletiert, jedoch intakt bei der Klasse II-Form. Imprintete Gene besitzen eine elterliche, genomische Prägung und ihre Expression hängt davon ab, von welchem Elternteil das Allel stammt. Durch epigenetische Modifikation ist eines der elterlichen Allele imprinteter Gene aktiv, das andere inaktiv.

Es wurden multiple Transkriptvarianten und sich daraus ergebend verschiedene Isoformen für dieses Gen gefunden. Es besitzt neun vorhergesagte TMD (Chai et al. 2003). Der höchste Gehalt des Transkripts fand sich in neuronalem Gewebe, aber auch in verschiedenen Epithelzellen (Goytain et al. 2007). *NIPA1* ist hauptsächlich in der Plasmamembran, im Golgi-Apparat und in den frühen Endosomen lokalisiert. Diese Lokalisation lässt auf eine Funktion als ein Membrantransporter oder Rezeptor schließen. Die Verteilung des Proteins innerhalb der Zelle verändert sich in Abhängigkeit vom extrazellulären Mg-Gehalt. Ein hoher Mg-Gehalt resultierte in einer Verringerung von *NIPA1* in der Plasmamembran, ein geringer Mg-Gehalt führte zu einer Akkumulation in den frühen Endosomen und in der Plasmamembran (Goytain et al. 2007). Mutationen im *NIPA1*-Gen haben ebenfalls eine Umverteilung des Proteins innerhalb der Zelle zur Folge (Zhao et al. 2008). Goytain, Hines et al. (2007) wiesen als erste *NIPA1* eine Rolle im Mg-Transport zu. Versuche an Mäusen, gehalten unter hypomagnesiämischen Bedingungen, zeigten eine Überexpression des Gens in verschiedenen Geweben. Weitere Zellversuche, Fluoreszenzmessungen und Two-Electrode-Voltage-Clamp-Messungen bei *NIPA1*-exprimierenden *Xenopus-laevis*-Eizellen bestätigten einen Einfluss von *NIPA1* in der Mg-Homöostase.

Weiterhin ist aufgrund der phänotypischen Ausprägungen der Genmutationen zu vermuten, dass *NIPA1* eine Rolle in der Entwicklung und Erhaltung des Nervensystems spielt. Fink, Jones et al. (1996) berichteten erstmalig von einer Verbindung der autosomal dominanten hereditären spastischen Paraplegie (ADHSP) und dem Chromosom 15. Später konnten Rainier, Chai et al. (2003) zeigen, dass eine Mutation im *NIPA1*-Gen für die ADHSP (SPG6) ursächlich ist. Die hereditären spastischen Paraplegien (HSP) [MIM 600363] sind eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, erblich bedingt und ausgelöst durch Mutationen in unterschiedlichen Genen. Die ADHSP ist gekennzeichnet durch eine Degeneration der Axone der Motoneuronen im Rückenmark. Bewegungsstörungen, Spasmen und Schwäche der unteren Extremitäten sind die Folge (Fink et al. 1995; Reed et al. 2005).

Zwei HSP-assoziierte Mutationen im *NIPA1*-Gen sind zurzeit bekannt - T45R und G106R (Zhao et al. 2008). Diese wurden von Zhao und Kollegen in In-vitro- und In-vivo-Versuchen auf ihre Charakteristik und Funktionalität hin untersucht. Das mutierte Genprodukt reichert sich vor allem im ER an, erzeugte dort Stress und führte zu Anzeichen von Apoptose. In vivo zeigten Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), die das mutierte *NIPA1* exprimierten, im

Gegensatz zum Wildtyp eine progressive neuronale Degeneration. Diese führte nach neun Tagen zu einer kompletten Paralyse der Nematoden. Die Mutante T45R verlor jedoch nicht signifikant die Eigenschaft zum Transport von Magnesium. Diese Versuche führten zum Schluss, dass Mutationen in *NIPA1* über einen „gain-of-function“-Mechanismus zu einem zellulären und funktionalen Defizit führen, indem sie die Akkumulation toxischer NIPA1-Proteine im ER auslösen und somit das Apoptose-Programm beeinflussen.

2.4.10 Melastatin-Related Transient Receptor Potential Cation Channel 6 u. 7 (TRPM6 / TRPM7)

TRPM6 und *TRPM7* gehören zur Superfamilie der Transient Receptor Potential Melastatin Kationen Kanäle. Beide Gene sind zu 52 % homolog. *TRPM6* wird dem Genort 9q21.13 zugeordnet, *TRPM7* dem Genort 15q21. Eine besondere Eigenschaft dieser beiden Mitglieder der Superfamilie M ist, dass nur sie eine Threonin/Serin-Kinase am COOH-Ende aufweisen. Die Funktion der Kinase wird bis heute kontrovers diskutiert, aber durch ihr Vorhandensein werden die beiden Proteine auch „Chanzyme“ genannt (Montell 2003). Die Proteinstruktur beider Proteine ist gut bekannt. Sie besitzen sechs TMD mit einer hydrophoben Region zwischen TMD 4 und TMD 5, welche die Pore bildet. Die anderen vier Domänen formen den Transporter. Beide Gene haben alternative Splicevarianten, M6-Kinasen genannt, deren physiologische Rolle noch unklar ist (Chubanov et al. 2004; Chubanov et al. 2005).

TRPM6 wurde vorrangig in der apikalen Membran der Epithelzellen entlang des gesamten Darms und des Nephrons (hauptsächlich im distalen Konvolut) nachgewiesen (Schlingmann et al. 2002). Transkripte des Transporters wurden auch in der Lunge und in den Hoden dokumentiert (Voets et al. 2004). Dagegen ist *TRPM7* ein multifunktionales, ubiquitäres Protein mit weit verbreiteter Gewebeexpression (Walder et al. 2002).

TRPM6 und *TRPM7* besitzen die Fähigkeit zur Komplexbildung. Es bilden sich sowohl funktionelle homomere Kanäle als auch heteromere *TRPM6/7*-Komplexe (Schmitz et al. 2005; Li et al. 2006). Die beiden Proteine unterscheiden sich nur leicht in ihren biophysikalischen Eigenschaften. Beide vermitteln den Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Einstrom, aber auch den Einstrom verschiedener, vornehmlich divalenter Spurenelemente wie Zn^{2+} , Mn^{2+} und Co^{2+} . In Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} wird ebenfalls Na^+ transportiert (Monteilh-Zoller et al. 2003; Schlingmann et al. 2007). Die divalenten Kationen passieren den Kanal aufgrund des elektrochemischen Gradienten. Der zytosolische Mg-Gehalt ist ein wichtiger Regulator der Kanalfunktion. Ein erhöhter zytosolischer Gehalt an freiem Mg^{2+} und Mg-ATP ist in der Lage, die Aktivität der Kanäle zu unterdrücken (Penner und Fleig 2007).

TRPM6 ist hauptsächlich in den epithelialen Mg-Transport im Darm (Absorption) und den Nieren (Reabsorption) involviert (Schlingmann et al. 2007). TRPM7 spielt eine essentielle Rolle in der zellulären Mg-Homöostase. Eine zielgerichtete Deletion von *TRPM7* in einer aviären Zelllinie führte zu einem Wachstumsstillstand und einer intrazellulären Mg-Verarmung unter normalen extrazellulären Mg-Bedingungen (Schmitz et al. 2003).

Beide Proteine können sich gegenseitig in ihrer biologischen Aktivität beeinflussen. So benötigt TRPM6 z. B. TRPM7 für seine Expression an der Zelloberfläche in HEK-Zellen. Weiterhin ist TRPM6 in der Lage, TRPM7 zu phosphorylieren. Aber TRPM7 kann nicht durch TRPM6 komplementär ersetzt werden. Sie erscheinen daher nicht funktionell redundant, sondern als zwei eigenständige und essentielle Komponenten in der Regulation der Mg-Homöostase (Schmitz et al. 2005).

Die mit dem Kanal verbundene alpha-Kinase-Aktivität bleibt ein weit diskutiertes Thema. Es existieren mehrere Hypothesen zu deren funktionaler Bedeutung: Die Kinase dient möglicherweise als Mg^{2+} -Sensor mit nachfolgender Modulation der Kanalaktivität (Scharenberg 2005) oder allgemein als ein Kationen-Sensor-Signal mit Verlinkung zu vielen verschiedenen Zellfunktionen (Clark et al. 2006). Weiterhin könnten die Kinasen eine Rolle im Aufbau bzw. Struktur des Kanals, bei der subzellulären Anordnung in der Plasmamembran (Matsushita et al. 2005) und bei der Selbstphosphorylierung als Antwort auf Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration spielen (Takezawa et al. 2004). Diskutiert wird auch eine Interaktion mit Mg-ATP mit einem hemmenden Effekt auf die Kanalaktivität (Kanalblock) (Demeuse et al. 2006). Eine Rolle in der Signaltransduktion via Phospholipase C (Interaktion mit einer Domäne der PLC) ist auch denkbar (Takezawa et al. 2004).

Aufgrund der Funktion der Kinase als Ca^{2+} -Sensor wird TRPM7 eine Rolle in der Zelladhäsion, Motilität, Metastasierung, Apoptose und dem ischämischen Zelltod zugeschrieben (Dorovkov und Ryazanov 2004; Su et al. 2006). Eine weitere mögliche Funktion von TRPM7 wurde von Krapivinsky, Mochida et al. (2006) vorgeschlagen. Sie fanden das Protein in der Membran acetylcholinsezernierender synaptischer Vesikel in sympathischen Neuronen. Die TRPM7-Kinase in der Funktion als Kationensensor könnte demzufolge die Sekretion von Acetylcholin beeinflussen.

Aufgrund ihrer Bedeutung und Verbreitung sind beide Membranproteine auch in eine Reihe von Erkrankungen involviert, wie zum Beispiel *Diabetes mellitus* (siehe Kapitel 2.5.1), Bluthochdruck (siehe Kapitel 2.5.2), Osteoporose und in neuronale ischämische Schädigungen. Zahlreiche Hormone und Faktoren beeinflussen die Aktivität der Kanäle, darunter Angiotensin II (He et al. 2005), Aldosteron (Langeslag et al. 2007), Thrombin (Takezawa et al. 2004), Epidermaler Wachstumsfaktor (Thebault et al. 2009) und Östrogen (Groenestege et al. 2006).

Die funktionale Bedeutung des TRPM6-Transporters wird durch seine Beteiligung an der autosomal rezessiv vererblichen Erkrankung „Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie“ (HSH, [MIM 602014]) offensichtlich (Schlingmann et al. 2002; Walder et al. 2002). Diese wird durch eine Mutation im *TRPM6*-Gen hervorgerufen und ist gekennzeichnet durch z. T. extrem niedrige Serum-Mg-Werte infolge verminderter Absorption bzw. Reabsorption im Darmtrakt und in der Niere. Sie manifestiert sich in der frühen Kindheit und geht mit generalisierten Krämpfen und anderen Symptomen einer erhöhten neuromuskulären Erregbarkeit (Muskelspasmen, Tetanie) einher. Anhaltend schwere Hypomagnesiämie führt zu einem Hypoparathyreoidismus mit reduzierter Ausschüttung von Parathormon und resultierender Hypokalzämie. Durch die tägliche Gabe hoher oraler Magnesiumdosen können subnormale Serum-Mg-Werte erreicht werden. Der „defekte“ transzelluläre, aktive Transportmechanismus im Darm via TRPM6 kann durch hohe Konzentrationen von Magnesium via parazellulär passivem Weg umgangen werden (Shalev et al. 1998). Das mutierte TRPM6-Protein kann funktional nicht durch TRPM7 ersetzt werden (Schlingmann et al. 2007).

Eine mutierte Genvariante von *TRPM7* wurde bei Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose-Parkinson-Demenz-Komplex (einer neurodegenerativen Erkrankung, [MIM 105500]) gefunden, die besonders häufig auf einzelnen Inseln im pazifischen Raum zu finden ist (Hermosura und Garruto 2007).

2.4.11 Magnesiumhomöostase, Metabolismus und Regulation im Körper

2.4.11.1 Absorption

Die Absorption von Magnesium findet beim Menschen hauptsächlich im distalen Dünndarm statt, hier vor allem im Jejunum und Ileum (Hardwick et al. 1990). Bei einigen anderen Monogastriern zählt der Dickdarm und Blinddarm zum Hauptabsorptionsort (Kayne und Lee 1993). Im Gegensatz dazu wird bei Wiederkäuern Magnesium vorrangig im Pansen absorbiert (Schweigel et al. 2000).

Die absolute Menge an absorbiertem Magnesium steigt mit einer höheren Zufuhr nahezu linear an und ist direkt an die Energieaufnahme gebunden (Kayne und Lee 1993). Die Verarbeitung von Lebensmitteln kann den Mineralstoffgehalt und damit eingeschlossen den Magnesiumgehalt in der Nahrung um bis zu 85 % verringern. Ebenso führt Kochen und Backen zu einem erheblichen Verlust an Magnesium, z. B. durch Extraktion der Mineralstoffe ins Kochwasser (Fawcett et al. 1999; Vormann 2003).

Wird mit der Nahrung viel Magnesium aufgenommen, absorbiert der Körper 11 % der zugeführten Mg-Menge, bei geringem Mg-Gehalt in der Nahrung liegt die Absorptionsrate dagegen bei 65 % (Kayne und Lee 1993). Das ist auf zwei unterschiedliche Transportmechanismen zurückzuführen. Bei normaler bis erhöhter Mg-Zufuhr werden 11 % in ionisierter Form durch passive, parazelluläre Diffusion absorbiert. Die Aufnahme folgt dem „solvent drag“ und dem elektrochemischen Gradienten. Ist der Gehalt an Magnesium in der zugeführten Nahrung gering, wird zusätzlich zum passiven Transport ein aktiver, sättigbarer transzellulärer Aufnahmemechanismus hinzugeschaltet (Roth und Werner 1979; Fine et al. 1991). Man geht davon aus, dass auf der luminalen Seite der Bürstensaumzellen im Dünndarm des Menschen ein Mg^{2+} /Anion-Transporter an der aktiven Mg^{2+} -Aufnahme beteiligt ist. Das Transportprotein TRPM6 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Auf der basolateralen Seite der Bürstensaumzellen transportiert der Na^+ / Mg^{2+} -Austauscher, kürzlich identifiziert als Transportprotein SLC41A1, Magnesium in die Blutbahn (Kolisek et al. 2012). Die Mechanismen, die die Magnesiumabsorption kontrollieren, sind noch unklar. Hormone wie Vitamin-D-Metaboliten, PTH, Calcitonin, Insulin und vasoaktives Peptid können von Bedeutung sein (Laurant und Touyz 2000).

2.4.11.2 Reabsorption

Die Niere als der sensitivste Regulator der Mg-Bilanz spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Plasma-Mg-Konzentration im Körper. Der Mg-Transport in der Niere erfolgt sowohl durch passive parazelluläre Resorption in der Henle-Schleife als auch durch aktive transzelluläre Reabsorption im distalen Tubulus (**Abb. 3**).

Etwa 70 – 80 % des gesamten Plasma-Mg wird ultrafiltriert (entspricht 100 % ultrafiltriertem Mg^{2+} im Primärharn in **Abb. 3**). Von diesem Ultrafiltrat werden nur 10 – 15 % im proximalen Tubulus über parazellulären Transport reabsorbiert (Dai et al. 2001). Es scheint in erster Linie ein uni-direktionaler, passiver Vorgang zu sein, der abhängig ist von der Natrium-/Wasser-Reabsorption und der luminalen Mg-Konzentration. Der größte Teil (60 – 70 %) des gefilterten Magnesium wird im kortikalen dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife über Paracellin-1 (Claudin 16), einem porenbildenden parazellulären Protein, resorbiert (Schmitz et al. 2007; Hou und Goodenough 2010). Neuere Studien deuten auf dessen entscheidende Rolle im parazellulären Mg-Transport hin (Will et al. 2010; Kasapkara et al. 2011). Der Mg-Transport ist hier direkt an die NaCl-Rückresorption und die positive luminale Spannung in diesem Segment gebunden. Die eigentliche Steuerung der Plasma-Mg-Konzentration erfolgt während der Resorption im distalen Tubulus. Von den dort ankommenden 10 – 15 % des ultrafiltrierten Magnesiums werden 70 – 80 % reabsorbiert

(Ferre et al. 2011). Die transzelluläre Mg^{2+} -Reabsorption im DCT ist der finale Schritt, bevor Magnesium mit dem Urin ausgeschieden wird. Das erfordert eine Feinabstimmung über streng regulierte Mechanismen. Die Reabsorption in diesem Abschnitt steht unter der Kontrolle des Ca^{2+}/Mg^{2+} -Sensing-Rezeptors. Die Erhöhung der Plasma-Mg-Konzentration führt zur Aktivierung dieses Rezeptors auf der peritubulären Seite der Zellen des DCT. Durch seine Aktivierung wird die Mg-Resorption im frühdistalen Konvolut gehemmt. Dies führt zu einem gesteigerten Verlust von Magnesium über den Harn. Der aktivierte Ca^{2+}/Mg^{2+} -Sensing-Rezeptor beeinflusst die hormonelle Regulation der Mg-Resorption wahrscheinlich durch eine Hemmung der Hormon-induzierten cAMP-Bildung innerhalb der Signalkaskade (Bapty et al. 1998; Dai et al. 2001; Schlingmann 2006).

Folgende Hormone spielen bei der renalen Mg-Ausscheidung eine Rolle: Parathormon (PTH), Calcitonin, antidiuretisches Hormon (ADH), Glukagon, Insulin (de Rouffignac und Quamme 1994), Vasopressin, Aldosteron, die Schilddrüsenhormone und Vitamin-D₃-Metaboliten (Dai et al. 2001). Darüber hinaus gibt es altersabhängige Unterschiede bei der parazellulären Resorption im proximalen Tubulus. Bei jungen Tieren werden 50 – 60 % des ultrafiltrierten Magnesiums resorbiert, bei adulten Tieren hingegen nur 10 – 15 % (Quamme und de Rouffignac 2000).

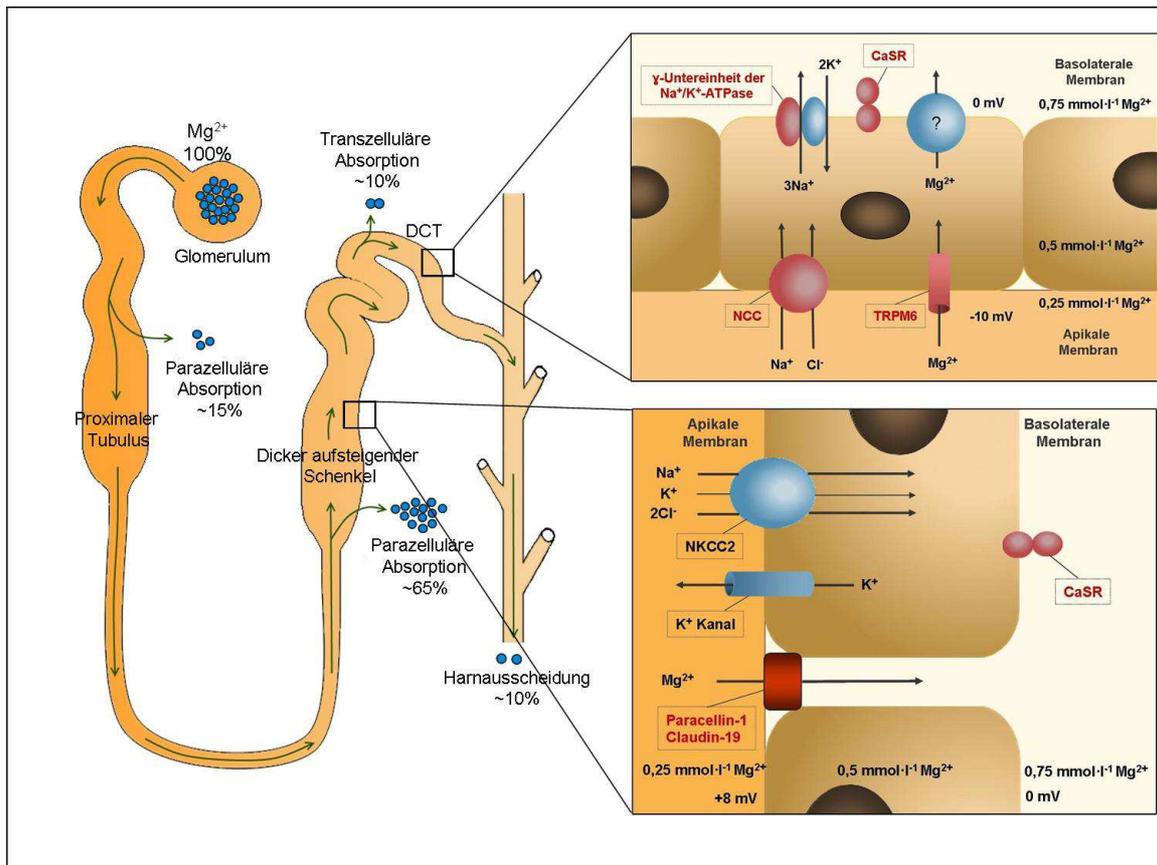


Abb.3 Nicht-Protein-gebundenes Mg^{2+} wird frei in das Glomerulum filtriert. Dargestellt sind die ungefähren reabsorbierten Anteile des gefilterten Mg^{2+} (100 %) in verschiedenen Abschnitten des Nephrons (in Prozent). Mg^{2+} wird sowohl auf dem parazellulären als auch transzellulären Weg transportiert. Das endgültige Regulationssegment, der DCT, kontrolliert etwa 10% der gefilterten Mg^{2+} -Menge. Unter physiologischen Bedingungen werden etwa 10% des gefilterten Mg^{2+} ausgeschieden (siehe Kapitel 2.4.11.2). Proteine, die aufgrund genetischer Mutationen im Zusammenhang mit Erkrankungen mit z. T. schweren renalen Mg^{2+} -Verlusten stehen, sind in der Abbildung rot dargestellt. Mutationen im *Paracellin-1*- und *Claudin-19*-Gen sind ursächlich für die familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) (Weber et al. 2000; Konrad et al. 2006). Mutationen im *TRPM6*-Gen führen zur Erberkrankung HSH (siehe Kapitel 2.4.10). Mutationen des Na^+ - Cl^- -Kotransporters sind Ursache des Gitelman-Syndroms (Cole und Quamme 2000; Knoers und Levchenko 2008) und Mutationen in der γ -Untereinheit der Na^+ / K^+ -ATPase haben die autosomal-dominante renale Hypomagnesiämie mit Hypokalziurie (ADRH) zur Folge (Meij et al. 2000). Die zugrundeliegenden Mechanismen für den Mg^{2+} -Verlust sind bislang noch unklar. Aktivierende Mutationen des *CaSR*-Gens führen zum autosomal dominanten Hypoparathyreoidismus (ADH) mit regelmäßig auftretender Hypomagnesiämie (Pearce et al. 1996; Konrad et al. 2004). Das Fragezeichen markiert einen noch nicht vollständig nachgewiesenen Transportmechanismus. NKCC2 = Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Kotransporter, NCC = Na^+ - Cl^- -Kotransporter, CaSR = Ca^{2+} / Mg^{2+} -Sensing-Rezeptor (modifiziert nach Wolf et al. 2009)

2.4.11.3 Magnesiumgleichgewicht des Körpers

Mg-Homöostase ist das Gleichgewicht zwischen der Absorption im Darm und der renalen Ausscheidung (Cole und Quamme 2000). Die Niere spielt eine dominierende Rolle in der Mg-Homöostase. Die Plasma-Mg-Konzentration ist dabei eine wichtige Determinante. Hypermagnesiämie ist mit einem Anstieg im gefilterten Urin und einer reduzierten Reabsorption verbunden. Dementsprechend verringert sich die Ausscheidung des gefilterten Magnesiums unter hypomagnesiämischen Bedingungen infolge eines Anstiegs der Reabsorption drastisch. Zur gleichen Zeit wird die Absorption von Magnesium im Dünndarm erhöht, um das Gleichgewicht zu erhalten. Führt der Mangel zu einer verminderten Mg-Konzentration im Serum, wird Mg^{2+} aus dem größten Speicher, dem Knochen, mobilisiert und der Gehalt im Serum so wieder angehoben (al-Ghamdi et al. 1994; Ishimi 2010). Im Knochen wird Magnesium in zwei unterschiedlichen Bereichen gespeichert: im Knochenkortex und im Trabekelwerk. Das im Trabekelwerk gespeicherte Magnesium kann bei einer akuten Hypomagnesiämie zunächst leicht mobilisiert werden (dynamischer Pool) und die Plasma-Mg-Konzentration wieder anheben (Navarro und Mora-Fernández 2006). Bei einem länger andauernden Ungleichgewicht (erhöhte Exkretion, verminderte Resorption) ist der dynamische Pool im Knochen erschöpft und es kommt zu einem chronischen Mg-Defizit, auch mit negativen Folgen für den Knochenstoffwechsel (Veränderung der Knochenstruktur). Das Mg-Defizit beeinflusst den Ca-Metabolismus und stellt somit einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Osteoporose dar (Fatemi et al. 1991). Der intrazelluläre Mg-Stoffwechsel wird durch kurzfristige Veränderungen der extrazellulären Mg-Konzentration nicht betroffen. Selbst wenn die Konzentration im Serum stark abnimmt, gibt es nur geringe Mg-Verluste in den Zellen (Vormann et al. 1992).

2.4.11.4 Hormonelle Regulation des Magnesiumtransports und der Magnesiumhomöostase

Nach derzeitigem Kenntnisstand gibt es keinen hormonellen Faktor, der spezifisch den Mg-Metabolismus reguliert. Zahlreiche Hormone und Faktoren haben jedoch einen Einfluss auf die Mg-Balance und den Mg-Transport beispielsweise PTH, Antidiuretisches Hormon (ADH), Aldosteron, Angiotensin II, Calcitonin, Katecholamine, Glukagon und Insulin (Lostroh und Krahl 1973; Paolisso et al. 1986; Okada et al. 1992; Hwang et al. 1993; Romani et al. 1993; Barbagallo et al. 1997; Touyz et al. 2001). Unter ihrer Wirkung kommt es entweder zur Mg-Ausschüttung aus der Zelle bzw. dem Gewebe oder zur intrazellulären Mg-Anreicherung. Die Fluxrichtung ist dabei abhängig vom Gewebe und dem Signalweg, über den das Hormon wirkt. Während Katecholamine (Epinephrin, Norepinephrin) (Vormann und Günther 1987),

PGE und Arachidonsäure (Wolf et al. 1994; 1997) die Mg-Ausschüttung stimulieren, aktivieren z. B. Insulin, Vasopressin und Angiotensin II die zelluläre Mg^{2+} -Akkumulation. Eine Übersicht ist in der Veröffentlichung von Romani und Scarpa (2000) zu finden.

Ein allgemeiner Signalweg für die Wirkung von Hormonen ist der cAMP-vermittelte Signalweg. Eine Erhöhung der zellulären cAMP-Konzentration, ausgelöst durch verschiedene exogene Reize, kann eine Ausschleusung von Mg^{2+} über einen Na-abhängigen Mechanismus zur Folge haben, wahrscheinlich aufgrund einer Erhöhung der Aktivitätsrate des Na^+/Mg^{2+} -Transporters durch seine Phosphorylierung (Fagan und Romani 2000; 2001).

Des Weiteren spielt intrazelluläres ATP eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Mg-Ausschleusung. ATP ist der Hauptbindungspartner für Mg^{2+} in der Zelle. Stoffe, die den zellulären ATP-Gehalt verringern bzw. die Umwandlung von ATP zu ADP oder AMP fördern, senken indirekt die intrazelluläre Mg-Konzentration. Ein Absinken der zytosolischen ATP-Konzentration hat eine erhöhte Dissoziation und damit eine Erhöhung der freien zytosolischen Mg^{2+} -Konzentration zur Folge. Der Anstieg des freien Mg^{2+} im Zytosol bewirkt eine Mg^{2+} -Ausschüttung aus der Zelle. Im Gegensatz dazu führen Bedingungen, die den cAMP-Gehalt senken oder den PKC-Signalweg aktivieren zu einer Akkumulation von Magnesium im Gewebe oder der Zelle (Romani und Scarpa 2000; Romani 2011). Ebenso ist es möglich, dass die gleichen Hormone, die in verschiedenen Zellen und Geweben eine Mg-Ausschleusung stimulieren, im TAL eine Mg^{2+} -Reabsorption induzieren, um den Körper vor einem Verlust zu bewahren. Es existieren Hinweise, dass die Zelle in der Lage ist, die zytosolische Mg^{2+} -Konzentration zu messen und dynamisch zu modulieren. Diese werden gestützt durch die Beobachtungen Quammes und Kollegen bei ventrikulären Herzmuskelzellen, murinen DKC-Zellen oder murinen DCT-Zellen. Diese Zellen reagierten mit einer Umkehr der Fluxrichtung in Abhängigkeit vom extrazellulären Mg-Gehalt (Quamme und Rabkin 1990; Quamme et al. 1993; de Rouffignac und Quamme 1994).

2.4.11.4.1 Parathormon (PTH)

Es gibt eine wichtige funktionale Verbindung zwischen Magnesium und calcitropen Hormonen wie z. B. dem PTH und Calcitonin. Das in der Nebenschilddrüse gebildete PTH stimuliert die aktive Rückresorption von Kalzium und Magnesium aus dem distalen Tubulus und dem dicken aufsteigenden Schenkel in der Niere sowie deren Aufnahme im Darm. Besonders die Erhöhung des Ca-Blutplasma-Spiegels steht in Verbindung mit dem Mg-Metabolismus (Norman und Litwack 1997). Im Knochen ist PTH an der Freisetzung von Magnesium und Kalzium beteiligt. Die PTH-Wirkung auf die Osteoklasten erfolgt indirekt

über die Stimulierung der Osteoblasten, da nur sie PTH-Rezeptoren besitzen. Die Osteoblasten sezernieren als Folge der Stimulierung durch PTH das Protein RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand), das an den RANK-Rezeptor monozytärer Osteoklasten-Vorläuferzellen bindet, was deren Differenzierung zu Osteoklasten veranlasst (Uy et al. 1995; Fuller et al. 1998; Shinoda et al. 2010). Dies führt zu einer Knochenresorption und einem Anstieg der Mg- und Ca-Konzentration im Blut. Umgekehrt ist Magnesium essentiell für die normale Funktion der Nebenschilddrüsen, des Stoffwechsels von Vitamin D und für eine ausreichende Empfindlichkeit der Zielgewebe auf PTH und aktive Vitamin-D-Metaboliten. Milde Abnahmen der $[Mg^{2+}]_{\text{Plasma}}$ -Konzentration stimulieren über den Ca^{2+} -Sensing-Rezeptor die Freisetzung von PTH aus der Nebenschilddrüse. Ein Mg-Überschuss hemmt ähnlich wie Kalzium die PTH-Sekretion (Norman und Litwack 1997). PTH entfaltet seine Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und nachfolgend entweder über eine Aktivierung des PKA-Signalweges (cAMP-vermittelter Prozess) oder über die Aktivierung des PLC-Signalweges (IP_3 -vermittelter Prozess) (Guo et al. 2010).

Die Auswirkungen eines Mg-Defizits auf PTH und Vitamin D-Metaboliten werden wie folgt beschrieben: Ein Mg-Defizit ist in der Regel assoziiert mit einer verringerten Sekretion von PTH (Hypoparathyreoidismus) (Anast et al. 1976) und einer geringen Produktion von aktivem Vitamin D-Metaboliten infolge einer geringeren Umwandlung (insbesondere $1,25-(OH)_2$ -Vitamin D_3) (Fatemi et al. 1991; Risco et al. 1995). Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Endorgan-Resistenz gegenüber PTH und Vitamin D (Estep et al. 1969; Rude et al. 1976; Freitag et al. 1979). Ein verändertes PTH-Gleichgewicht hat Auswirkungen auf die Mg-Homöostase. Bei einem primären Hyperparathyreoidismus assoziiert mit einer Hyperkalzämie findet sich infolge einer verminderten renalen Mg-Reabsorption ein verminderter Mg-Gehalt im Serum und in den Blutzellen. Des Weiteren kann sich nach einer Parathyreoidektomie eine Hypomagnesiämie als ein Effekt des „hungry bone syndroms“ entwickeln (Swaminathan 2003).

2.4.11.4.2 Calcitonin

Calcitonin stellt im Knochengewebe einen direkten Antagonisten zum PTH dar. Es wird in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet. Die Freisetzung wird vor allem durch erhöhte Plasmakonzentrationen von Kalzium oder Magnesium getriggert. Eine primäre Funktion besteht darin, eine durch Osteoklasten aktivierte Knochenresorption zu hemmen, indem es deren Aktivität herunterreguliert. Infolgedessen wird die Kalzium-, Magnesium- und Phosphatfreisetzung aus dem Knochen gehemmt (Horne et al. 1994; Norman und Litwack 1997). Im Gegensatz zu der PTH-antagonistischen Wirkung im Knochen verstärkt Calcitonin

in der Niere die Reabsorption von Magnesium und Kalzium in der Henle-Schleife unabhängig vom PTH (Poujeol et al. 1980; Quamme 1980; Di Stefano et al. 1985; Di Stefano et al. 1990). Infolge hoher Ca- bzw. Mg-Konzentrationen im Serum werden parallel zur Calcitoninausschüttung die Sekretion von PTH und die davon gesteuerte Produktion von VitD₃ verhindert (Mundy und Guise 1999). Die Signaltransduktion erfolgt über multiple G-Proteine, die verschiedene Signalproteine, darunter die PKC, cAMP-abhängige Proteinkinasen und Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen, aktivieren (Horne et al. 1994).

2.4.11.4.3 Katecholamine

Die Stimulation alpha- und beta-adrenerger Rezeptoren durch Katecholamine führte in verschiedenen Studien zu einer Erhöhung der zirkulierenden Serum-Mg-Konzentration. So konnte an perfundierten Rattenherzen eine Ausschüttung von Mg²⁺ aus dem Organ in das Perfusat nachgewiesen werden (Vormann und Günther 1987; Fatholahi et al. 2000). Untersuchungen an Leberzellen, Erythrozyten, Lymphozyten und Thymozyten erbrachten ähnliche Befunde (Romani und Scarpa 1990; Günther und Vormann 1992; Matsuura et al. 1993; Wolf et al. 1997). Generell lässt sich sagen, dass Bedingungen, die den zellulären cAMP-Spiegel durch Stimulierung der adrenergen Rezeptoren (via Adenylatzyklase) erhöhen, zu einer Ausschleusung von Mg²⁺ in das Blut führen. Gleichzeitig stimulieren Katecholamine über beta-adrenerge Rezeptoren die Mg-Reabsorption in der Niere (Gesek und White 1997).

2.4.11.4.4 Insulin

Der Zusammenhang zwischen Insulin und Magnesium lässt sich folgendermaßen ausdrücken: Magnesium dient als Modulator der Insulinwirkung und Insulinsensitivität. Gleichzeitig agiert Insulin als ein regulatorisches Hormon des Mg-Stoffwechsels. In Abhängigkeit vom Gewebe und den experimentellen Bedingungen förderte Insulin in verschiedenen Versuchen die Aufnahme von Mg²⁺ in die Zelle. Insulin induziert eine signifikante Erhöhung der intrazellulären Mg²⁺-Konzentration in Muskelzellen (Lostroh und Krahl 1973), am isolierten perfundierten Herzen (Romani et al. 2000), in humanen Thrombozyten (Hwang et al. 1993) und Lymphozyten (Delva et al. 1998). Barbagallo, Gupta et al. (1993; 1997) inkubierten isolierte Erythrozyten gesunder Probanden mit 200 mU/ml Insulin. Der intrazelluläre Mg-Gehalt stieg um 26%. Die Insulinwirkung auf die [Mg²⁺]_{intra}-Konzentration war dabei unabhängig von der zellulären Glukoseaufnahme.

Als zugrundeliegende Mechanismen wurden zum einen eine Stimulierung der plasmamembranständigen ATPase angenommen (Paolisso et al. 1986) als auch eine Beteiligung der Insulin-Rezeptor-Tyrosin-Kinase (IRTK). Die Erhöhung der $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Konzentration wurde durch monoklonale Antikörper gegen den Insulin-Rezeptor komplett unterdrückt, was darauf schließen ließ, dass der Mg-Transport ein Insulin-Rezeptor-vermittelter Prozess war (Hwang et al. 1993).

Das Magnesiumion spielt eine Schlüsselrolle bei der Insulinsekretion der Beta-Zellen des Pankreas. Der erste Schritt in der Insulinsekretion durch die Beta-Zellen ist die intrazelluläre Aufnahme von Glukose via insulinunabhängigen, niederaffinen GLUT 2. Glukose wird über die Glykolyse, den Citratzyklus und die Atmungskette zu ATP metabolisiert. Mg^{2+} bindet an das metabolisierte ATP und Mg-ATP fungiert als second messenger und schließt die ATP-regulierten K^+ -Kanäle. Durch die daraus resultierende Depolarisierung der Plasmamembran werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet und der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt steigt. Dies stimuliert die Membranintegration der insulinsekretorischen Vesikel und Insulin wird sezerniert (Günther 2010). Zur Wirkung von Magnesium auf den Plasma-Insulin-Spiegel existieren widersprüchliche Ergebnisse. Die vorherrschenden Resultate beschreiben extrazelluläres Magnesium als einen kompetiven Hemmer des Kalzium-Einstroms in die Zelle. Demzufolge ist bei einem Mangel an Magnesium der Ca^{2+} -Influx verstärkt. Die daraus resultierende erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration stimuliert die Insulinausschüttung. Erhöhte (Plasma)-Insulin-Konzentrationen konnten gemessen werden (Berggren et al. 1983; Murakami et al. 1992; Chaudhary et al. 2004). Die Ergebnisse von Versuchen an magnesiumdefizienten Ratten zeigten wiederum keine Veränderung der Plasma-Insulin-Konzentration (McNeill et al. 1982; Gueux und Rayssiguier 1983; Lowney et al. 1995). In einer möglichen Erklärung werden das Ausmaß und die Dauer, in dem der Organismus einer Mg-Mangelsituation ausgesetzt ist, zugrunde gelegt. Ein intrazellulärer Mangel an Magnesium inhibiert den Glukosemetabolismus und Proteinbiosynthese, unterdrückt die ATP-Produktion, senkt die Bildung von Mg-ATP, verhindert die Inaktivierung der ATP-regulierten K^+ -Kanäle und bewirkt eine Unterdrückung der Insulinsekretion (Kumeda und Inaba 2006).

Bindet Insulin an den Insulinrezeptor (IR) werden intrazellulär eine Reihe von Signalkaskaden ausgelöst. Die durch Autophosphorylierung aktivierte IRTK aktiviert ihrerseits zahlreiche Proteine und Kinasen via Tyrosin-Kinase-aktiviertem IRS (Insulin-Rezeptor-Substrate 1-6). Magnesium stellt zusammen mit ATP das Substrat der Kinasen dar (Günther 2010). Eine zentrale Rolle spielt die durch IRS aktivierte Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K). Der PI3K-Signalweg führt zu einem Absinken des Blutglukosespiegels zum einen durch die Förderung der Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe (GLUT4-Translokation zur Zelloberfläche über CAP und die Aktivierung der GLUT4-Transporter) zum

anderen über die Förderung der Glukose-Speicherung (Glykogen-Synthese über aktiviertes Akt) in der Leber und den Muskeln (de Luca und Olefsky 2008).

Magnesium hat also eine wichtige Rolle im Glukose- und Insulinstoffwechsel sowie bei der Insulinsekretion, Insulinbindung und -aktivität und in der Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme (Barbagallo et al. 2003). Ferner besitzt Insulin wachstumsfördernde und mitogene Effekte, so dass ein Mg-Mangel auch hier Auswirkungen hat (Straus 1984; Hill und Milner 1985).

Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor ist unabhängig von extrazellulärem freiem Mg^{2+} (Böni-Schnetzler et al. 1987). Im Gegensatz dazu moduliert Magnesium jedoch effektiv die Insulinwirkung. Als Teil des aktivierten Mg^{2+} -ATP Komplexes ist es erforderlich für alle „rate-limiting-enzymes“ in der Glykolyse und reguliert die Aktivität aller Enzyme, die an Phosphorylierungsreaktionen beteiligt sind. Ebenso wird die Affinität der IRTK für Mg-ATP durch die Bindung eines zweiten Mg^{2+} an der regulatorischen Einheit der Kinase erhöht. Eine Zunahme der Konzentration von freiem intrazellulärem Mg^{2+} steigert die Affinität der IRTK für Mg-ATP, andersherum verstärkt eine höhere Konzentration von Mg-ATP die Affinität der IRTK für freies Mg^{2+} (Vicario und Bennun 1990). Ein zweites Mg^{2+} ist sowohl ein essentieller Aktivator für Protein-Tyrosin-Kinasen vom Rezeptortyp, als auch für lösliche Protein-Tyrosin-Kinasen (Sun und Budde 1997).

Ferreira und Romero (2004) zeigten, dass Insulin einen durch den Na^+/Mg^{2+} -Austauscher vermittelten Mg-Efflux induziert und dessen Affinität zum extrazellulären Na^+ erhöht. Die Insulinwirkung auf den Na^+/Mg^{2+} -Austauscher wird über den PI3K-Signalweg vermittelt. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zur insulininduzierten Steigerung des intrazellulären Mg-Gehalts anderer Untersuchungen (Keenan et al. 1996; Romani et al. 2000). Unter den Hormonen, die eine Mg-Akkumulation im Gewebe induzieren oder zumindest den Mg-mobilisierenden Effekten der adrenergen Agonisten bzw. Katecholaminen entgegenwirken, hat Insulin eine dominierende Rolle (Romani und Scarpa 2000).

2.4.12 Magnesiumdefizit des Körpers

Mg-Defizite sind weit verbreitet, aber aufgrund homöostatischer Regulation oftmals schwer zu diagnostizieren. Eine verminderte Serum-Mg-Konzentration ist ein entsprechend zuverlässiges Maß für einen schweren Mg-Mangel. Das Auftreten einer Hypomagnesiämie variiert in Abhängigkeit begleitender Umstände. Bei Studien mit 621 zufällig ausgewählten Krankenhauspatienten in den USA und 223 älteren Klinikpatienten in Irland wurden jeweils in 11 % der Fälle eine Hypomagnesiämie diagnostiziert (Wong et al. 1983; Hayes et al. 1989). Treten K-, Na- und Ca-Imbalancen auf, steigt die Prävalenz einer zusätzlichen

Hypomagnesiämie auf 23–42 % (Whang et al. 1984; Kingston et al. 1986). Bei schwerkranken Patienten erreicht sie einen Anteil von bis zu 65 % und ist assoziiert mit erhöhter Mortalität (Ryzen 1989; Noronha und Matuschak 2002). Weil Magnesium für zahlreiche metabolische Prozesse unverzichtbar ist, kann ein Mangel ganze Organsysteme betreffen und sich klinisch verschiedenartig darstellen. Oft treten klinische, meist unspezifische Symptome viel früher auf, werden aber nicht mit einer Hypomagnesiämie in Verbindung gebracht. Trotzdem sind viele der Symptome so schwer, dass sie einer medizinischen Behandlung bedürfen wie z. B. Störungen der neuromuskulären Erregbarkeit (Muskelkrämpfe, Tetanie, Tremor), Herzrhythmusstörungen, erhöhte Digitalissensibilität, Magen-Darm- und urologische Erkrankungen, Vasospasmen und vorzeitiges Einsetzen der Wehen. Selbst bei akuten Erkrankungen wie einem akuten Myokardinfarkt oder einer Herzinsuffizienz kann sich klinisch ein Mg-Mangel bemerkbar machen (Reinhart 1992).

Im Allgemeinen deckt die tägliche Mg-Aufnahme über die Nahrung in der westlichen Ernährungsweise den Grundbedarf und beugt Mangelerscheinungen vor, scheint jedoch als Schutz vor verschiedenen Erkrankungen nicht ausreichend zu sein (Vormann 2003). Zunehmend sind vor allem veränderte Ernährungsgewohnheiten mit gesteigertem Verzehr behandelter und konservierter Lebensmittel und einseitige Diäten Ursache für eine mehr und mehr auftretende Unterversorgung (Vormann 2003). Gerade ältere Menschen haben eine generell verminderte Nahrungsaufnahme. Eine Mg-Mangelversorgung gilt als ein Risikofaktor insbesondere für diese Altersgruppe (Costello und Moser-Veillon 1992). Auch der gesunkene Mg-Gehalt natürlicher Nahrungsmittel aufgrund der Verarmung der Böden an Mineralstoffen führt zu einer verminderten oralen Mg-Aufnahme. Eine Hypomagnesiämie infolge einer Umverteilung von Magnesium innerhalb des Körpers wird beobachtet bei akuter Pankreatitis (Mg lagert sich in den nekrotischen Bereichen ab) (Ryzen und Rude 1990), während der Behandlung einer metabolischen Azidose und beim „Refeeding Syndrom“ (Umverteilung von extrazellulärem Magnesium in die Zelle oder den Knochen bei beginnender, normaler Nahrungsaufnahme stark unterernährter Menschen). Des Weiteren kann eine Hypomagnesiämie nach Herzoperationen und bei angeborenen Herzfehlern auftreten (hohe Konzentration an Katecholaminen bewirken am Herzmuskel einen intrazellulären Shift) (Satur et al. 1995; zusammengefasst in Swaminathan 2003). Ein verminderter Gehalt an Magnesium im Plasma wurde bei Alkoholikern (Flink 1986), *Diabetes-mellitus*-Patienten (siehe Kapitel 2.5.1) und Patienten mit Osteoporose festgestellt (Rude und Gruber 2004).

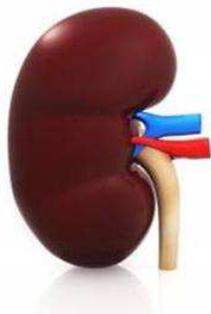
Gastrointestinale Ursachen für eine verringerte Mg-Absorption sind vor allem Erkrankungen, die mit schwerer chronischer DiarrhÖe einhergehen. Weiterhin führt eine Mutation im *TRPM6*-Gen zu einer um 35 % reduzierten Mg-Absorption im Dünndarm, die jedoch durch eine erhöhte tägliche Zufuhr relativ gut ausgeglichen werden kann (Schlingmann et al. 2002).

Die Niere hat den größten Einfluss auf den Mg-Haushalt. Akutes und chronisches Nierenversagen führen zu einem Verlust an Magnesium durch die verringerte Rückresorption v. a. im proximalen Tubulus der Niere. Weiterhin verursachen verschiedene Medikamente eine Hypomagnesiämie, darunter Chemotherapeutika und Antibiotika (Zaloga et al. 1984). Ebenso ist der Langzeiteinsatz von Diuretika ein bekannter Faktor, der zu einem Mg-Mangel führt. Diese Medikamente verursachen Störungen im Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalt (Hypokaliämie, Hyponatriämie, metabolische Alkalose) mit gleichzeitiger Entgleisung des Mg-Haushalts (Hollifield 1987).

Magnesium beeinflusst die Kontraktilität der Skelett- und glatten Muskulatur, den Herzrhythmus, den Gefäßtonus und die neuronale Reizleitung direkt und indirekt: direkt über die Na^+/K^+ -ATPase, indirekt über seine Ca-antagonistische Eigenschaft. So beruht die Pathophysiologie eines Mg-Mangels wahrscheinlich auf einem Ungleichgewicht in der zellulären K- und Na-Konzentration durch die Beeinträchtigung der Na^+/K^+ -ATPase und auf Veränderungen im Ca-Haushalt. Dies resultiert in einer Membrandestabilisierung und Übererregbarkeit. Im Myokard können diese Störungen atriale und ventrikuläre Arrhythmien zur Folge haben (Tso und Barish 1992). An den Synapsen ist die Ausschüttung des Neurotransmitters Acetylcholin erhöht, was eine gesteigerte neuronale Erregbarkeit nach sich zieht (Del Castillo und Engbaek 1953). Weiterhin sind der Gefäßtonus und die Reaktivität der glatten Muskulatur hinaufgesetzt, ursächlich für eine Hypertonie (Tso und Barish 1992).

Die Stoffwechselerkrankungen *Diabetes mellitus* Typ I und Typ II zählen zu den häufigsten Ursachen eines Mg-Mangels. Zwischen 25 – 39 % der Diabetes-Patienten sind von einer Hypomagnesiämie betroffen (de Valk 1999). Dieser klinische Aspekt wird als ein Faktor mit pathogener Signifikanz bei der Entstehung von Komplikationen im Rahmen der Erkrankung angesehen. Darüber hinaus wird ein chronischer Mg-Mangel mit der Entwicklung einer Insulinresistenz in Verbindung gebracht. Einzelne Ursachen für einen Mg-Mangel sind in **Abbildung 4** aufgeführt.

Renale Magnesiumverluste durch:



- Diuretika (ausgenommen Kalium/Magnesiumsparende Präparate)
- Osmotische Agenzien (einschließlich Hyperglykämie)
- Antibiotika (Carbenicillin, Gentamycin, Tobramycin, Amphotericin B)
- Cisplatin (Zytostatika)
- Cyclosporine
- Alkohol
- Diabetes mellitus und Diabetische Ketoazidose
- Renale tubuläre Azidose
- Hyperparathyroidismus (und andere Ursachen von Hyperkalzämie)
- Postobstruktive Diurese
- Hyperaldosteronismus
- Hyperthyreodismus

Reduzierte Zufuhr und verminderte intestinale Absorption durch:



- Hungern
- anhaltende intravenöse Therapie ohne Magnesiumsupplementierung
- chronische Diarrhoe
- Ileumresektion
- Malabsorptionssyndrom
- Abführmittel
- Morbus Crohn

Abb.4 Übersicht über mögliche Ursachen eines Mg-Mangels (modifiziert nach Tso und Barish 1992; Swaminathan 2003)

2.5 ERKRANKUNGEN MIT MAGNESIUMDEFIZIT

In den letzten Jahren hat sich das Auftreten sogenannter Zivilisationskrankheiten wie Übergewicht, Fettstoffwechselstörungen, Insulinresistenz und damit Nüchtern-Hyperglykämie und Bluthochdruck aufgrund einer Änderung des Lebensstils, veränderten Ernährungsgewohnheiten und körperlicher Inaktivität stetig erhöht. Diese medizinischen Störungen sind Teil der komplexen Erkrankung „Metabolisches Syndrom“, auch als „Metabolisches Syndrom X“, „X-Syndrom“ oder „Insulinresistenz-Syndrom“ bekannt. Die zu Beginn dieses Kapitels genannten Erkrankungen sind einzeln oder in Kombination auftretend mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Typ-II-Diabetes und kardiovaskulären Störungen verknüpft, auf die im nächsten Kapitel besonders eingegangen werden soll.

Abbildung 5 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen einem Mg-Mangel und dem Metabolischen Syndrom auf verschiedenen Wegen.

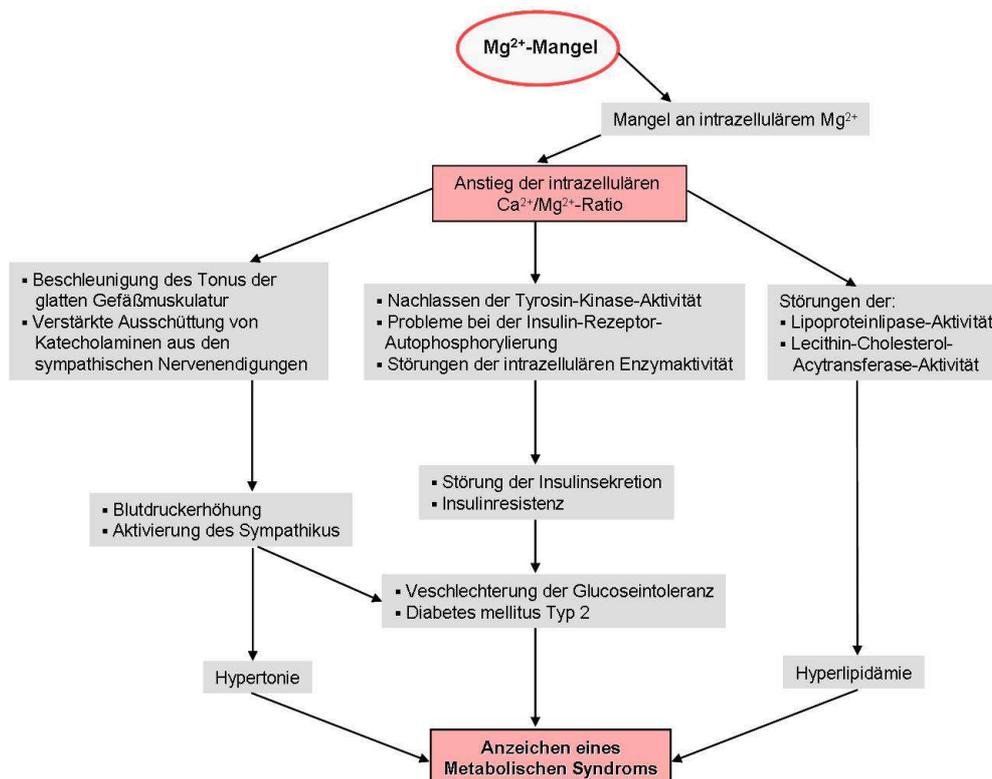


Abb.5 Übersicht über den Zusammenhang zwischen Mg-Mangel und Metabolischem Syndrom (modifiziert nach Kumeda und Inaba 2005)

2.5.1 Diabetes mellitus Typ II

Magnesium spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Entwicklung eines *Diabetes mellitus* Typ II, Insulinresistenz und Glukoseintoleranz. Ein Defizit in der Versorgung mit dem Mikronährstoff Magnesium hat in der Regel eine Sekundärsymptomatik zur Folge und verschlechtert den Verlauf einer *Diabetes-mellitus*-Erkrankung. Niedrige Plasma-Mg-Konzentrationen werden häufig sowohl bei Typ II als auch bei Typ I nachgewiesen. Zwei mögliche Ursachen kommen dafür in Frage: (1) eine verringerte Zufuhr über die Nahrung und (2) ein erhöhter Verlust über die Niere. Studien in den USA und Dänemark zufolge war die Mg-Zufuhr über die Nahrung aufgrund der Veränderung der Ernährungsgewohnheiten bei Diabetikern unzureichend (Paolisso und Barbagallo 1997). Weitere große epidemiologische Studien belegten, dass eine „Verwestlichung“ der Ernährung in vielen Fällen zu einer täglichen Mg-Aufnahme unterhalb der empfohlenen täglichen Bedarfsgrenze führt. In der Nurses Health Study untersuchten Colditz, Manson et al. (1992) den Einfluss von Ernährungsfaktoren auf die Inzidenz des Insulin-unabhängigen *Diabetes mellitus*. Die Forscher fanden eine inverse Korrelation zwischen der Mg-Einnahme und dem Risiko, einen *Diabetes mellitus* Typ II zu

entwickeln. Später bestätigen die meisten Studien, dass eine hohe Mg-Zufuhr einen positiven Effekt auf die Risikominderung einer Erkrankung an *Diabetes mellitus* hat (Yang et al. 1999; He et al. 2006).

Darüber hinaus hat eine schwere Hyperglykämie einen erhöhten Verlust von Magnesium im Urin zur Folge, da die Nieren die Fähigkeit verlieren, Magnesium rückzuresorbieren (osmotische Diurese). McNair, Christensen et al. (1982) fanden in einer Studie an 215 Patienten mit Diabetes bei 39 % der Patienten eine Hypomagnesiämie und bei 55 % eine Hypermagnesurie. Eine Hyperglykämie erhöht die renale Ausscheidung von Magnesium unabhängig vom Insulinspiegel (Djurhuus et al. 2000). Ebenso führte eine Insulininfusion bei gesunden Probanden zu einer erhöhten renalen Mg-Ausscheidung (Djurhuus et al. 1995).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es bei niedrigem Mg-Gehalt nicht nur zu einer Hyperglykämie und Hyperinsulinämie kommt, sondern auch zu einer Hypertriglyzeridämie und Hypertonie (Chaudhary et al. 2010). Evangelopoulos, Vallianou et al. (2008) beobachteten eine stark inverse Beziehung zwischen Magnesium im Serum und dem Auftreten des metabolischen Syndroms. Mg-Messungen bei Patienten mit Metabolischem Syndrom ergaben eine Hypomagnesiämie in 23,3 % und einen intrazellulären Mg-Mangel bei 36,1 % der Patienten (Lima Mde et al. 2009).

Die Atherosclerosis-Risk-in-Communities-Studie (ARIC), eine große Kohortenstudie mit 15248 Teilnehmern, ergab, dass der Serum-Mg-Gehalt und die Mg-Zufuhr über die Nahrung invers assoziiert sind mit dem Nüchterninsulinspiegel und dem Nüchtern-glukosegehalt im Blut. Daraus lässt sich ein Zusammenhang zwischen einem Mg-Mangel und der Nüchternhyperinsulinämie und der Insulinresistenz herstellen (Ma et al. 1995). Je niedriger der basale Mg-Wert, desto größer ist die benötigte Menge an Insulin, um die gleiche Glukose-Belastung zu verstoffwechseln, was auf eine verringerte Insulinsensitivität und eine verminderte zelluläre Glukoseverwertung hinweist (Kolterman et al. 1981). Andersherum kann eine Insulinresistenz auch ein intrazelluläres Mg-Defizit begünstigen, da Insulin die Mg-Aufnahme fördert (Alzaid et al. 1995).

Die Insulinresistenz ist ein Zustand, in welchem eine gegebene Konzentration von Insulin einen geringeren als den erwarteten biologischen Effekt erzielt. Sie ist auch definiert als die notwendige Gabe von mehr als 200 Einheiten Insulin pro Tag für eine ausreichende glykämische Kontrolle und einer Vorbeugung der Ketose. Die Symptome einer Insulinresistenz reichen über ein breites Spektrum und beinhalten Fettleibigkeit, Glukoseintoleranz, *Diabetes mellitus* und das Metabolische Syndrom (Belin und He 2007; Volpe 2008).

Mg-Mangel führt zu einer Verminderung der insulinvermittelten Signaltransduktion und zu einer verminderten Glukoseverstoffwechslung und ATP-Produktion (Kandeel et al. 1996). Bei Mg-Mangel ist eine erhöhte Insulinkonzentration im Blut nachweisbar (Song et al. 2004).

In Experimenten mit einer Insulinoma-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass eine Reduzierung des extrazellulären freien Mg^{2+} einen gesteigerten Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle zur Folge hat, da extrazelluläres Mg^{2+} normalerweise den Ca^{2+} -Einstrom kompetitiv hemmt. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration stimuliert die Insulinsekretion der Beta-Zellen (Murakami et al. 1992; Skelin et al. 2010). Die erhöhte Insulinkonzentration im Blut verringert die Sensitivität der Rezeptoren und senkt deren Anzahl. Gleichzeitig hemmt eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration die IRTK in den Zielzellen kompetitiv. Eine weitere Folge gesteigerter intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration ist eine erhöhte Kontraktilität mit verstärkter Vasokonstriktion. Hypertonie ist häufig assoziiert mit einer Insulinresistenz und *Diabetes mellitus*. Weiterhin gibt es signifikante Beweise dafür, dass eine gesteigerte PKC-Aktivität aufgrund eines erhöhten intrazellulären Ca-Spiegels zu einer Insulinresistenz beiträgt (Itani et al. 2000; Itani et al. 2001). Als Ursachen einer Insulinresistenz ist auch eine Erhöhung der Membranfluidität durch einen Mangel an Magnesium in der Diskussion. Dies beeinflusst die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor negativ (Paolisso et al. 1987). Interessanterweise zeigten Hwang, Yen et al. (1993), dass die Insulinwirkung auf intrazelluläres Magnesium völlig durch die Blockierung des Insulin-Rezeptors mit einem monoklonalen Antikörper aufgehoben wird.

Weiterhin scheint Glukose insulinunabhängig den zytosolischen Mg-Gehalt zu modulieren. Barbagallo und Dominguez (2007) wiesen sowohl in vivo als auch in vitro an Erythrozyten eine Abhängigkeit der intrazellulären Mg-Konzentration vom Glukosespiegel nach. Sie fanden eine von Insulin unabhängige Verringerung der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration bei Hyperglykämie. Eine vorübergehende Hyperglykämie (durch orale Glukoseaufnahme) bei gesunden Probanden verursachte denselben intrazellulären Abfall der Mg^{2+} -Konzentration und denselben Ca^{2+} -Anstieg wie bei chronisch kranken *Diabetes-mellitus*-Patienten. Auch in insulinunabhängigen glatten Muskelzellen der Gefäße und in Erythrozyten war dieser Effekt zu beobachten. Er trat bei Glukosekonzentrationen auf, die klinisch bei Patienten mit verminderter Glukosetoleranz erreicht werden (10 mmol/l).

2.5.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und Bluthochdruck

Magnesium ist als ein essentielles Element stark in die Funktionen des Herz-Kreislauf-Systems involviert. Es beeinflusst den Gefäßtonus und die Reaktivität über modulierende Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Fluxe, ist beteiligt an der Produktion vasoaktiver Stoffe, an der Regulierung wichtiger Hormone und Enzyme und wirkt vasodilatatorisch, blutdrucksenkend und antikonvulsiv.

Ergebnisse aus epidemiologischen, klinischen und experimentellen Studien deuten auf eine inverse Beziehung zwischen der Mg-Konzentration im Serum und Gewebe und dem Blutdruck hin (Witteaman et al. 1989; Ascherio et al. 1992; Ma et al. 1995; Song et al. 2006). Zum gleichen Ergebnis kam die Artherosclerosis-Risk-in-Communities-Studie (ARIC, 15248 Probanden): Mg-Zufuhr über die Nahrung und Serum-Mg-Gehalt waren negativ mit dem systolischen / diastolischen Blutdruck korreliert (Liao et al. 1998; Kao et al. 1999; Rosamond et al. 2001). Dasselbe Verhältnis wird auch für die Beziehung zwischen dem Renin-Angiotensin-System, der Serum-Mg-Konzentration und dem Blutdruck beschrieben. Bluthochdruckpatienten mit hohem Renin-Wert zeigten eine signifikant niedrigere Serum-Mg-Konzentration im Vergleich zu Probanden mit normalem Blutdruck. Somit ist der Serum-Mg-Gehalt invers assoziiert mit der Plasma-Renin-Aktivität (Resnick et al. 1983). Durch eine Mg-Supplementierung wurde der Blutdruck signifikant gesenkt (Widman et al. 1993; Kawasaki et al. 1998). Mehrere Studien belegten eine erhöhte Inzidenz von Erkrankungen an Hypertonie in Gegenden, in denen der Mg-Gehalt des Wassers gering ist (Nadler und Rude 1995; Yang und Chiu 1999).

Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Wirkungsweise des Ions sind bis jetzt noch nicht vollkommen geklärt. Diskutiert werden eine Stimulierung der Produktion der Vasodilatoren Prostazyklin und Stickoxid. Darüber hinaus verändert Magnesium die vaskuläre Reaktion auf vasoaktive Agonisten, dämpft die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und pro-inflammatorischer Mediatoren (Landau et al. 2004; Satake et al. 2004; Soltani et al. 2005). In Bluthochdruckmodellen unter experimentellen Bedingungen scheinen die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers und die *TRPM7*-Expression bzw. -Aktivität verändert zu sein. Insbesondere ein erhöhter Mg^{2+} -Efflux, hervorgerufen durch eine veränderte Regulation des vaskulären $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauschers, und ein verringerter Mg^{2+} -Influx infolge einer unzureichenden Expression bzw. Aktivität der Transportproteine *TRPM6* und *TRPM7* in den Plasmamembranen der Gefäß- und Nierenzellen kann für die Entstehung der Hypertonie wichtig sein (Picado et al. 1994; Kisters et al. 2003; Kisters et al. 2008).

Myokardiale und vaskuläre Verletzungen führen zu Störungen im Elektrolyttransport durch die Zellmembran, wobei der Na^+ - und Ca^{2+} -Einstrom erhöht ist. Zeitgleich gehen Mg^{2+} und K^+ verloren (Altura und Altura 1984). Im Zytosol entsteht der Zustand einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration und einer verringerten Mg^{2+} -Konzentration. In der Behandlung eines akuten Myokardinfarktes wurde die therapeutische Anwendung von Magnesium befürwortet, da ein Mg-Mangel den akuten Zustand verschlechtern bzw. auch hervorrufen kann. Ein Mg-Defizit kann Arrhythmien auslösen, Reperfusionsschäden verstärken und ist mit erhöhten oxidativen Gewebeschäden durch freie Radikale verbunden (Freedman et al. 1991). Magnesium hat hauptsächlich aufgrund seiner Ca-antagonistischen Eigenschaften einen limitierenden Effekt auf die Infarktgröße unabhängig von hämodynamischen Veränderungen (Ravn et al. 1999).

Die Infarktgröße ist der Hauptgrund für die Mortalität bei akutem Myokardinfarkt und ein zugrundeliegender Ca-Überschuss im Myokardium ist der wichtigste Faktor beim Auftreten von Reperfusionsschäden. Weitere nützliche Effekte von Magnesium sind eine koronare Vasodilatation, Hemmung der Katecholaminausschüttung und Hemmung der Thrombozytenaggregation (Hasebe und Kikuchi 2006; Li et al. 2007).

In seiner Funktion als Ca-Antagonist schützt es die glatten Muskelzellen und Herzmuskelzellen vor Hyperexzitation und wirkt vasodilatatorisch. Mg^{2+} antagonisiert Ca^{2+} durch eine Hemmung des transmembranen Ca^{2+} -Einstroms und der Modulation seiner vasokonstriktorischen Wirkung (D'Angelo et al. 1992; Zhang et al. 1992; McHugh und Beech 1996; Runyan et al. 2005). Eine niedrige Mg-Konzentration verursacht einen Anstieg der intrazellulären Ca-Konzentration mit einer damit verbundenen vaskulären Kontraktion und der daraus folgenden Erhöhung des Gefäßtonus. Eine intravenöse Verabreichung von Magnesium bei Schlaganfall-Patienten induziert eine signifikante vasodilatatorische Antwort verbunden mit einer Senkung des Blutdrucks (Aslanyan et al. 2007).

Nadler, Buchanan et al (1993) untersuchen die Auswirkungen eines Mg-Mangels auf verschiedene Hormone und Mediatoren und verzeichneten eine Erhöhung der Angiotensin-II-induzierten Plasma-Aldosteron-Konzentration, eine erhöhte Produktion von Thromboxan und dem Vasokonstriktor Prostaglandin. Eine Mg-Supplementierung kann die blutdrucksteigernde Wirkung von Angiotensin II reduzieren und die Produktion des Vasodilatators Prostazyklin stimulieren. Ein weiterer Bereich für den Einsatz von Magnesium ist während der Schwangerschaft. Aufgrund seiner nachgewiesenen positiven Wirkung verringert es das Risiko einer Präeklampsie bzw. Eklampsie. Präeklampsie ist definiert als Hypertonie nach 20 Wochen der Schwangerschaft mit einhergehender Proteinurie. Ursächlich werden u. a. endotheliale Dysfunktionen und Schäden vermutet. Die Gabe von Magnesium halbiert das Risiko einer Eklampsie und ist in den USA die am häufigsten angewendete Behandlung einer Präeklampsie (Lucas et al. 1995; The-Eclampsia-Trail-Collaborative-Group 1995; Coetzee et al. 1998). Es hat sich gezeigt, dass Magnesium die endotheliale Funktion verbessert, indem es die Ausschüttung des Vasodilatators Prostazyklin stimuliert. Dieser stellt die Gefäße weit und hemmt die Thrombozytenanlagerung und -aggregation (Watson et al. 1986; Belfort und Moise 1992). Aufgrund seiner blutdrucksenkenden und antikonvulsiven Wirkung kann Magnesium zur Behandlung einer Eklampsie intravenös verabreicht werden (Mason et al. 1996; Jurcovicova et al. 1998).

2.6 BEDEUTUNG DER LITERATUR FÜR DIE EIGENE FRAGESTELLUNG

Magnesium ist ein essentieller Mineralstoff mit universeller Bedeutung. Keine lebende Zelle kann ihre vielfältigen physiologischen Funktionen ohne ausreichende Mg-Zufuhr erfüllen. Ein Mg-Mangel spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Ätiologie des *Diabetes mellitus*, dem Metabolischen Syndrom, zahlreichen Herz-Kreislaufkrankungen wie Bluthochdruck, Arrhythmien, Atherosklerose und ischämischen Herzerkrankungen, sowie Osteoporose und bei einigen Therapieformen (z. B. Einnahme von Diuretika) (Swaminathan 2003). Die exakte Bestimmung des Mg-Status ist daher essentiell für eine gezielte Therapie bei Mg-Mangelzuständen. Klinisch-chemisch messbar ist routinemäßig nur die extrazelluläre Mg-Konzentration im Serum bzw. Plasma. Diese wird als Marker für den Mg-Status des Körpers herangezogen. Allerdings ist dieser Wert nicht sehr zuverlässig, wenn man bedenkt, dass sich nur 1 % des gesamten Körpermagnesiums im Blut befinden und die Plasma-Mg-Konzentration einem zirkadianen Rhythmus und stressbedingten Schwankungen unterliegt. Der überwiegende Teil des Körpermagnesiums liegt intrazellulär (35%) und in der Knochenmatrix (60%) vor und kann zum Ausgleich für erniedrigtes Plasmamagnesium herangezogen werden (Vormann 2003). Eine niedrige Plasma-Mg-Konzentration ist deshalb zwar beweisend für ein Mg-Defizit, eine normale Plasmakonzentration schließt einen Mg-Mangel jedoch nicht aus. Die für die physiologische Funktion des Magnesiums wichtige intrazelluläre Konzentration des ionisierten Mg^{2+} ist nur mit aufwendigen und kostspieligen Methoden messbar und deshalb für die klinische Routine nicht zugänglich (Elin 2010).

Auf der Suche nach präziseren Möglichkeiten zur Routinemessung des Mg-Gehalts im Körper stellte sich die Frage, ob es Mg-sensitive Gene gibt, deren Expressionen in Abhängigkeit vom Mg-Status reguliert werden. Ist es möglich, die Expression Mg-sensitiver Gene als Biomarker in der klinischen Routine zu nutzen? Diese Fragen sind Grundlage der vorliegenden Arbeit. Bereits 2005 konnten Goytain und Quamme an Mäusen, die unter hypomagnesiämischen Bedingungen gehalten wurden, den Zusammenhang zwischen der Expression spezifischer Gene und dem Mg-Status zeigen (Goytain und Quamme 2005). Mit einer genaueren Methode zur Bestimmung des Mg-Status ist es möglich, eine Verminderung des Gesamt-Mg-Bestandes frühzeitig zu erkennen und durch eine gezielte Mg-Supplementierung das Risiko für z. B. eine *Diabetes-mellitus*- oder Herz-Kreislauf-Erkrankung zu senken bzw. deren Verlauf positiv zu beeinflussen.

Für die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte In-vivo-Studie wurden Patienten mit *Diabetes mellitus* Typ II ausgewählt. Schätzungen zufolge sind im Jahr 2010 6,4 % der Weltbevölkerung an behandlungsbedürftigem *Diabetes mellitus* erkrankt, mit hoher gesundheitlicher und volkswirtschaftlicher Bedeutung (Deutschland (2007) 8,9%). Die Tendenz ist steigend mit einem geschätzten Anteil von 7,7 % der Weltbevölkerung im Jahr

2030 (IDF 2009). In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass Magnesium signifikant das Auftreten, die Entwicklung und den Verlauf von *Diabetes mellitus* Typ II beeinflusst (Barbagallo et al. 2007). Diese Stoffwechselerkrankung zählt zu den häufigsten Ursachen eines Mg-Mangels. Zwischen 25 – 39 % der Diabetes-Patienten sind von einer Hypomagnesiämie betroffen (de Valk 1999). Studien haben ergeben, dass Magnesium einen positiven Einfluss auf die Parameter der Blutzuckerkontrolle hat und einer Insulin-Resistenz entgegenwirkt (Volpe 2008; Günther 2010). Gleichfalls mindert eine optimale Versorgung des Körpers mit dem Mikronährstoff das Risiko einer Erkrankung an *Diabetes mellitus* (Yang et al. 1999; He et al. 2006). Die gesundheitsökonomische Tragweite, verbunden mit den beschriebenen Verknüpfungspunkten zum Magnesium-Themen-Komplex machten *Diabetes-mellitus*-Patienten zum idealen Probandenkreis für diese Studie.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 IN-VITRO-STUDIE AN JURKAT- UND JVM-13-ZELLEN

3.1.1 Zelllinien und Kulturmedium

Tab.3 Übersicht über die verwendeten Zelllinien und ihrer Charakteristiken

Zelllinie	Zelltyp	Ursprung	Morphologie	DSMZ Nr.
Jurkat	humane leukämische T-Zellen	Etabliert aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) zum Zeitpunkt des ersten Rezidivs 1976	Runde Zellen; wachsen einzeln oder in Haufen in Suspension	ACC 282
JVM-13	humane leukämische B-Zellen	Etabliert aus dem peripheren Blut eines männlichen Patienten mit B-prolymphozytischer Leukämie (PLL) zum Zeitpunkt der Diagnose	Lymphoblastoide Zellen; wachsen in Clustern in Suspension	ACC 19

Für die Zellexperimente wurden Zellen einer humanen Leukämie-Zelllinie verwendet (**Tab. 3**). Die JVM-13-Zelllinie wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen bestellt (DSMZ, Braunschweig, Deutschland). Die Jurkat-Zelllinie stammte aus dem Leibniz Institut für Nutztierbiologie (FBN, Dummerstorf, Deutschland). Das Wachstumsmedium für beide Zelllinien bestand aus RPMI 1640 Medium (Biochrom AG), 10 % bovinem Kälberserum (PAN Biotech GmbH) und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech GmbH). Die exakte Zusammensetzung des Wachstumsmediums ist in **Tabelle 17** (im Anhang) aufgeführt. Während der Anzucht und der gesamten Versuchszeit wurden die Zellen in 25-cm²- und 75-cm²-Zellkulturflächen mit Filterschraubverschluss (TPP, Schweiz) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle 2 - 3 Tage erfolgte ein Zellsplitting im Verhältnis 1 : 3 nach den Standards der Zellkultivierung. Ziel war es, die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Die Bestimmung der Zellzahl und der Viabilität erfolgte durch das Auszählen in der Neubauer-Zählkammer und die Trypanblau-Färbung (nach Freshney 1987). Die In-vitro-Studie wurde am Institut für Veterinärphysiologie der FU Berlin durchgeführt.

3.1.2 Experimentelles Setup

Die Jurkat- und JVM-13-Zellen wurden bis zur maximalen Dichte von ca. $1 - 2 \times 10^6$ Zellen/ml im Wachstumsmedium kultiviert (**Tab. 17** im Anhang). Zur Bestimmung der Gesamtzellmenge wurde der Inhalt aller Flaschen gepoolt, bei 2400 rpm (4 °C) für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 20 ml frischen Kulturmedium resuspendiert und ausgezählt (Neubauer-Zählkammer). Zur Vorbereitung der Versuchsdurchführung wurden etwa $2,2 \times 10^8$ Zellen der JVM-13-Zelllinie und $3,4 \times 10^8$ Zellen der Jurkat-Zelllinie bei 1600 rpm (4 °C) für 8 min zentrifugiert, in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, PAN Biotech GmbH) mit 1 mmol/l $MgCl_2$ und 1 mmol/l $CaCl_2$ resuspendiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Dieser 30-minütige Inkubationszwischenschritt in HBSS-Medium mit Mg^{2+} und Ca^{2+} diente der Adaption der Zellen an das Versuchsmedium, um unspezifische Veränderungen zu verhindern. Zur vollständigen Entfernung aller Spuren von FBS wurden die Zellen erneut bei 1600 rpm (4 °C) für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Mg-freiem Versuchsmedium (HBSS ohne Mg^{2+} , 10 % dialysiertes FBS) resuspendiert (**Tab. 18** im Anhang). Anschließend wurden in jede Probenflasche $\sim 0,8 \times 10^6$ Zellen/ml (7 ml Gesamtvolumen) überführt. Das entsprach einer Gesamtzellzahl von ca. $5,6 \times 10^6$ Zellen pro Probe. Die Probenflaschen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die Probenahme erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten innerhalb eines Zeitfensters von 72 h, jeweils zwei Proben pro Zeitpunkt. Eine Übersicht ist in **Tabelle 4** dargestellt. Zu folgenden Zeitpunkten wurde die Inkubation der Zellen in Mg-freiem Medium gestoppt: 0, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 5 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h. Das „Ernten“ der Zellen erfolgte in folgenden Schritten: Der Inhalt der Zellkulturflasche wurde bei 2500 rpm (4 °C) für 4 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 700 μ l RA1 Lysepuffer + 7 μ l β -Mercaptoethanol lysiert (RA1-Lysepuffer ist Teil des NucleoSpin RNA Isolation Kit II der Firma Macherey-Nagel). Während der anschließenden Inkubation auf Eis wurde das Zelllysate mehrfach kräftig gevortext, um eine effektive Zerstörung der Zellen zu erreichen, die Menge an isolierter RNA zu erhöhen und eine optimale Stabilisierung zu gewährleisten. Nach der 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben auf eine NucleoSpin-Säule (NucleoSpin RNA Isolation Kit II; Macherey-Nagel) pipettiert, bei 13200 rpm 1 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Homogenisierung der Probe) und bei -70 °C gelagert.

Tab.4 Tabellarische Darstellung der Probenahme über 72 h im Zellkulturversuch

Zeitpunkt Probenahme	Probennummer	
	0 mmol Mg ²⁺	0 mmol Mg ²⁺ (2. Probe)
0	1	14
30 min	2	15
60 min	3	16
90 min	4	17
120 min	5	18
150 min	6	19
180 min	7	20
5 h	8	21
8 h	9	22
12 h	10	23
24 h	11	24
48 h	12	25
72 h	13	26

3.1.3 Isolierung der Gesamt-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das NucleoSpin® RNA II Kit von Macherey-Nagel verwendet. Alle Schritte wurden nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Pro Säule wurden ca. 5×10^6 eukaryotische Zellen verwendet. Für bessere Ergebnisse in den Downstream-Analysen wurde ein rDNase-Schritt zur Beseitigung kontaminierender genomischer DNA eingeschoben. Die in dem NucleoSpin® RNA II Kit enthaltene RNase-freie rDNase wurde nach den Vorgaben des Herstellers mit RNase-freiem Wasser verdünnt und diese Reaktionsmischung auf den Filter der Säule pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 20 min bei RT. Nach dem rDNase-Schritt wurde der Filter mit der RNA mit 55 µl RNase-freiem Wasser überschichtet und anschließend 1,5 min bei 13200 rpm und RT zentrifugiert. Zur Erhöhung der RNA-Ausbeute wurde das Eluat ein zweites Mal auf die Säule aufgetragen und erneut zentrifugiert. Das Endvolumen betrug nach der Zentrifugierung 50 µl. Zur Gewährleistung einer RNase-freien Umgebung während der Isolierung wurden die Arbeitsflächen und Kunststoffoberflächen mit RNAZap behandelt. Weiterhin kamen nur RNase-freie Filterspitzen und DEPC-behandeltes Wasser zum Einsatz. Die RNA wurde während der nachfolgenden Schritte auf Eis gehalten bzw. bei -70 °C gelagert.

3.1.4 Bestimmung der Quantität und Qualität der RNA

Zur Bestimmung dieser Parameter wurde sowohl ein UV-Absorptions-Photometer als auch die Bioanalyzer Lab-on-chip Technologie der Fa. Agilent verwendet.

3.1.4.1 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Unmittelbar nach der RNA-Präparation erfolgte bei einigen Proben eine erste Überprüfung der Qualität und Quantität mittels UV-Absorptionsmessung bei verschiedenen Wellenlängen. Die OD-Verhältnisse 260/280 und OD 260/230 wurden bestimmt. RNA absorbiert bei 260 nm. Eine Absorption bei 280 nm zeigt das Vorhandensein von kontaminierenden Proteinen, die Absorption bei 230 nm deutet auf eine Kontaminierung durch Salze, Phenolat-Ionen, Thiocyanate und andere organische Verbindungen hin. RNA mit einer guten Qualität hat einen OD 260/280-Wert von 1,8 bis 2,0. Die OD-Werte dienten als ein erster Hinweis auf Proben schlechter Qualität. Generell wurden alle Proben nachfolgend mit dem Bioanalyzer von Agilent überprüft. Als Ausschlusskriterium für weitere Analysen wurde die RIN herangezogen (siehe nächstes Kapitel). Wenn die Konzentration der RNA zu hoch und die Messung nicht möglich war, wurden die Proben auf 500 µl um 1 : 10 verdünnt. Während der Arbeit wurden die Proben auf Eis gehalten.

3.1.4.2 Messung mit dem Bioanalyzer von Agilent

Die mittels Bioanalyzer ermittelten Werte waren ausschlaggebend für alle weiteren Downstream-Anwendungen. Aufgrund einer zu erwartenden RNA-Konzentration zwischen 25 und 500 ng/µl wurde das RNA 6000 Nano Kit verwendet. Das Agilent RNA Kit und die RNA Integrity Number (RIN) als ein Maß für die Qualität sind Standard bei der Beurteilung der Proben hinsichtlich der Qualität und Quantität. Die Durchführung der Messung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Die Proben wurden vor dem Aufbringen auf den Chip 2 min bei 72 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Wegen der geringen Probenmenge (1 µl) wurden die Proben durch inverses Pipettieren auf den Chip aufgetragen. Zur Bestimmung der RIN wurde die 2100 Expert Software von Agilent verwendet. RIN-Werte zwischen 8 - 10 weisen auf eine Probe mit sehr hoher Qualität und Integrität hin. Dahingegen sind Proben mit RIN-Werten unter 3 als qualitativ unzureichend anzusehen. In der vorliegenden Arbeit wurden Proben mit einer RIN < 6,5 ausgeschlossen. Nach der

Konzentrationsbestimmung wurden alle Proben auf 100 ng/μl verdünnt, so dass jede die gleiche Konzentration an Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese enthielt.

3.1.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde unter Verwendung des kommerziell erhältlichen cDNA-Synthese Kits „iScript“ der Fa. BioRad durchgeführt. Es enthält eine fertige Reaktionsmischung (ein Mix aus zufälligen Hexameren und oligo (dT) Primern). Pro Reaktionsansatz wurden 100 ng RNA eingesetzt. Es wurde steriles, RNase-freies Wasser benutzt. Als Letztes wurde 1 μl Reverse Transkriptase dem Reaktionsansatz zugegeben. Das Gesamtvolumen pro cDNA-Synthese-Ansatz betrug 20 μl. Die Transkriptionsreaktion erfolgte im Thermocycler Cyclone 25 der Fa. PEQLAB Biotechnologies GmbH. Das Protokoll des Reaktionsansatzes und das Thermocyclerprogramm sind im Anhang zu finden (**Tab. 19, 20**) Nach Ablauf der Reaktion wurde die cDNA 1 : 5 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.1.6 Konventionelle PCR und Agarosegel-Elektrophorese

Zur Überprüfung der Genexpression der ausgewählten Gene in beiden Zelllinien und in den Leukozyten der *Diabetes-mellitus*-Patienten wurde eine konventionelle PCR (kPCR) durchgeführt, die Produkte anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Gleichzeitig dienten die Ergebnisse der Überprüfung der Spezifität der Primer. Für die kPCR wurde das Taq PCR Master Mix Kit der Fa. Qiagen verwendet. Der Reaktionsmix enthält eine Mischung aus Taq DNA Polymerase, 1x Qiagen PCR-Puffer, dNTPs und MgCl₂ (1,5 mmol/l). Die Primer wurden auf 20 pmol/μl verdünnt (in dieser Verdünnung auch für die qPCR eingesetzt). Als Template dienten die cDNAs einer Jurkat-Zell-Probe, einer JVM-13-Zell-Probe, sowie einer Probe der getesteten Patienten (**Tab. 21** im Anhang). Das endgültige Reaktionsgemisch wurde im Cyclon 25 Thermocycler (PEQLAB Biotechnologie GmbH) bei einer Annealingtemperatur von 58 °C für 35 Zyklen inkubiert (**Tab. 22** im Anhang). Die amplifizierten Fragmente wurden anschließend mit einem Farbstoff gemischt (6x Orange Loading Dye, Fa. Fermentas) und auf ein 2-prozentiges TAE-Agarosegel aufgetragen. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde das Gel mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentrationen von 1 μg/ml). Als Größenstandard wurden 5 μl der O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder und der GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder der Fa. Fermentas verwendet. Die Laufzeit des Gels betrug 50 min bei 100 V und 10 min bei 88 V. Nach erfolgreicher Migration der DNA-Proben wurde das Gel unter UV-Licht mit der

Wellenlänge 300 nm untersucht und fotografiert (Chemilmager™ 5500, Alpha Innotech; FluorChem Software)

3.1.7 Quantitative RT-PCR

Für die Durchführung der quantitative Real-Time-PCR wurde der iQ SYBR Green Supermix (Fa. BioRad) verwendet. Dieser enthält SYBR Green I-Farbstoff, Hot-Start iTaq DNA-Polymerase, Puffer und dNTPs (Protokoll **Tab. 23** im Anhang). Für die vorliegenden Experimente wurde *Tubulin alpha 1b* als Housekeeping-Gen (HKG) aus vorangegangenen Pilotstudien (durchgeführt von Frederike Rolle, Institut für Veterinär-Physiologie, FU Berlin) übernommen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Eine Optimierung der HKGs mittels eines Auswahlverfahrens nach den MIQE-Richtlinien wird im Kapitel 3.3 näher erläutert. Die verwendeten Primer der ausgewählten Gene (Housekeeping-Gen und Zielgene) waren im Hinblick auf Spezifität, Effektivität und optimaler Annealingtemperatur bereits etabliert. **Tabelle 5** zeigt eine Übersicht über die verwendeten Primer.

Jedes einzelne Experiment wurde in einer 96-Well-Platte unter Verwendung des iQ iCycler und der iCycler Software (Fa. BioRad) durchgeführt. Aus Gründen der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Real-Time-PCR-Assay beinhaltete das Plattensetup die Proben aller Zeitpunkte über 72 h, jeweils für Zielgen und Housekeeping-Gen. Zusätzlich wurden noch jeweils eine Positiv-Kontrolle und eine Negativ-Kontrolle auf der Platte mitgeführt. Ein typisches Plattensetup ist in **Abbildung 6** dargestellt.

Jede Probe wurde als Triplet pipettiert. Für jedes Gen wurde ein Mastermix hergestellt und auf einer harten 96-Well Platte vorgelegt (Framestar 96, Fa. 4titude). Die Präparation der Mastermixe erfolgte unter einer sterilen Werkbank um Kontaminationen zu vermeiden. Für jede PCR-Reaktion wurde 5 µl cDNA verwendet.

Tab.5 Primersequenzen und Amplikongröße der untersuchten Gene

Zielgen (GOI)	Accession- nummer	Primersequenz (5' → 3')	Oligo- größe (bp)	Amplikon- größe (bp)
SLC41A1	NM_173854	Fwd: GATTCTCCTGTACATCGCAGAC	22	155
		Rev: CCCCTATGAGCCAGAGAACA	20	
SLC41A2	NM_032148	Fwd: ATCAAGCTGCAGCCAAAAGT	20	204
		Rev: GCTAGCAAAAAGGGCACAAG	20	
SLC41A3	NM_001008485 Isoform 1	Fwd: CACAAAGATAGTCGGTATCTGACG	24	144
		Rev: GACCATGGCCAGGATGATT	19	
CNNM2	NM_017649 Isoform 1	Fwd: TGCAGGTGATCTTCATTTCCG	20	189
		Rev: GCAGTGAGCACAGCAGGTAG	20	
MagT1	NM_032121	Fwd: GGGATTGCTTTTGGCTGTTA	20	164
		Rev: TATGGGCATATGGTGGTCCT	20	
NIPA1	NM_144599 Isoform 1	Fwd: AACAAACCCGTCCAGTCAGAG	20	141
		Rev: GTAGTAGATGGCCCCGAACA	20	
N33	NM_006765 Isoform a	Fwd: ATGGAATGGAGTTCCAGACG	20	152
		Rev: TCATTAGCTTGCCTGCACAC	20	
TRPM6	NM_017662 Isoform a	Fwd: GGATCTCTCTGCCCTGACTG	20	177
		Rev: TTCTCTCCAGCGATCTCCAT	20	
TRPM7	NM_017672	Fwd: TGGGAAGGCTGAATATGAGG	20	157
		Rev: TCGCTGTCATCCATTGTCAT	20	
Tuba1b	NM_006082	Fwd: GCCCTACAACCTCCATCCTCA	20	205
		Rev: GTCAACATTCAGGGCTCCAT	20	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Probe ○ 1	Probe ○ 1	Probe ○ 1	Probe ○ 9	Probe ○ 9	Probe ○ 9	Tuba1b ○ 1	Tuba1b ○ 1	Tuba1b ○ 1	Tuba1b ○ 9	Tuba1b ○ 9	Tuba1b ○ 9
B	Probe ○ 2	Probe ○ 2	Probe ○ 2	Probe ○ 10	Probe ○ 10	Probe ○ 10	Tuba1b ○ 2	Tuba1b ○ 2	Tuba1b ○ 2	Tuba1b ○ 10	Tuba1b ○ 10	Tuba1b ○ 10
C	Probe ○ 3	Probe ○ 3	Probe ○ 3	Probe ○ 11	Probe ○ 11	Probe ○ 11	Tuba1b ○ 3	Tuba1b ○ 3	Tuba1b ○ 3	Tuba1b ○ 11	Tuba1b ○ 11	Tuba1b ○ 11
D	Probe ○ 4	Probe ○ 4	Probe ○ 4	Probe ○ 12	Probe ○ 12	Probe ○ 12	Tuba1b ○ 4	Tuba1b ○ 4	Tuba1b ○ 4	Tuba1b ○ 12	Tuba1b ○ 12	Tuba1b ○ 12
E	Probe ○ 5	Probe ○ 5	Probe ○ 5	Probe ○ 13	Probe ○ 13	Probe ○ 13	Tuba1b ○ 5	Tuba1b ○ 5	Tuba1b ○ 5	Tuba1b ○ 13	Tuba1b ○ 13	Tuba1b ○ 13
F	Probe ○ 6	Probe ○ 6	Probe ○ 6	Control ○ PosC	Control ○ PosC	Control ○ PosC	Tuba1b ○ 6	Tuba1b ○ 6	Tuba1b ○ 6	Control ○ PosC	Control ○ PosC	Control ○ PosC
G	Probe ○ 7	Probe ○ 7	Probe ○ 7	Control ○ NRC	Control ○ NRC	Control ○ NRC	Tuba1b ○ 7	Tuba1b ○ 7	Tuba1b ○ 7	Control ○ NRC	Control ○ NRC	Control ○ NRC
H	Probe ○ 8	Probe ○ 8	Probe ○ 8	Control ○ NTC	Control ○ NTC	Control ○ NTC	Tuba1b ○ 8	Tuba1b ○ 8	Tuba1b ○ 8	Control ○ NTC	Control ○ NTC	Control ○ NTC

Abb.6 Beispiel eines typischen 96-Well-Plattensetups (Control PosC = Positiv-Kontrolle, Control NRC = No-Reaction-Kontrolle, Control NTC – No-Template-Kontrolle)

Kontrollen

NTC (No-Template-Control)

Die NTC setzte sich aus dem Mastermix und 5 µl DEPC-Wasser zusammen. Sie enthält kein Template (cDNA). Die NTC ist unverzichtbar beim Aufspüren von kontaminierender DNA und der Bildung von Primerdimeren. In der NTC findet im optimalen Fall keine Amplifizierung statt. Es kommt jedoch vor, dass auch hier aufgrund einer Kontaminierung oder einer Dimerbildung der Primer eine Amplifizierungsreaktion abläuft. Dieses Fluoreszenzsignal kann vernachlässigt werden, wenn die Differenz der Ct-Werte der NTC und der Probe mit dem höchsten Ct-Wert größer als 5 ist. Das wird an folgender Berechnung deutlich: Bei einer Ausgangsmenge von einer Kopie und einer Verdopplung der Kopienzahl bei jedem Zyklus liegen nach 5 Zyklen 32 Kopien (nach 6 Zyklen 64 Kopien) vor. Das bedeutet bei einer beliebigen Zyklusanzahl n ist die Kopienanzahl der Probe mehr als 32 mal (64 mal) größer als die Kopienanzahl in der NTC. Bei 5 Zyklen Differenz beträgt der Anteil an ungewolltem Signal 3,125 % (nach 6 Zyklen nur noch 1,56 %). Dieser Prozentsatz liegt unterhalb des

technischen Fehlers innerhalb der PCR-Replikate. Die gleiche Berechnung ist auch für die Amplifizierung der NRC gültig (siehe nächster Absatz).

NRC (No-Reaction-Control, minus Reverse Transkriptase, -RTC)

Zum Ausschluss einer Verfälschung der Ergebnisse durch die Amplifizierung potentiell vorhandener genomischer DNA wurde stichprobenartig eine zusätzliche negative Kontrolle durchgeführt. Bei der NRC dient RNA als Template. Die NRC durchlaufen ebenfalls die cDNA-Synthese, jedoch wurde das Enzym Reverse Transkriptase dem Reaktionsansatz nicht hinzugefügt. Die RNA wird nicht umgeschrieben und nur potentiell vorhandene genomische DNA führt dann in der nachfolgenden qPCR zu einer Amplifizierung. Aufgrund der Tatsache, dass die verfügbaren RNA-Mengen teilweise begrenzt waren, wurden nur Stichproben durchgeführt. Auch hier gilt: eine Amplifizierung in der NCR kann bei einer Differenz der Ct-Werte von NRC und höchstem Proben-Ct-Wert > 5 vernachlässigt werden.

Positiv Kontrolle

Positiv-Kontrollen sind nützlich im Falle negativer Amplifizierungsergebnisse. Sie dienen dann als Nachweis, wenn eine qPCR-Reaktion aufgrund eines Cyclerproblems oder Problemen mit dem Reaktionsgemisch fehlschlägt bzw. negative Ergebnisse liefert. Diese Kontrolle sollte dieselben Komponenten enthalten wie die Probenreaktion, aber das Template muß mit Sicherheit amplifizierbar sein, wenn der qPCR-Lauf wie geplant abläuft. Als Positiv-Kontrolle diene die sechste Verdünnungsstufe einer Verdünnungsreihe eines konventionellen PCR-Produktes des entsprechenden Zielgens. Sie diene im Plattensetup gleichzeitig als Inter-Run-Calibrator (IRC).

IRC (Inter-Run-Calibrator)

Ein IRC ist dann erforderlich, wenn nicht alle Proben für ein zu untersuchendes Gen im selben PCR-Lauf analysiert werden. IRC sind identische Proben, die immer wieder mitgeführt werden, von höchster Qualität sein sollten und idealerweise immer dasselbe Ergebnis aufweisen (Ct-Wert).

Der IRC korrigiert die technischen Variationen zwischen den Läufen. Hierzu wird aus den (normalisierten) relativen Expressionsdifferenzen der verschiedenen IRCs der Kalibrierungsfaktor als geometrisches Mittel errechnet. Dieser Faktor kalibriert die relativen Expressionsdifferenzen aller Proben eines qPCR-Laufs und Zielgens. So können für ein Zielgen die Ergebnisse der Proben, die in verschiedenen qPCR-Läufen gewonnen wurden, zuverlässig verglichen werden.

Nach dem Bestücken wurden die Platten unter Benutzung eines Thermosealers mit einer Folie versiegelt (Clear Seal Diamond) und bei 3000 rpm (2 min, 4 °C) zentrifugiert. Danach erfolgte die Amplifizierung im iCycler (Fa. BioRad) in einem 2-Step-Protokoll (**Tab. 24** im Anhang).

3.1.8 Berechnung der Genexpressions-Ct-Differenz

3.1.8.1 Allgemeine Kinetik der PCR

Generell laufen in jeder PCR vier unterschiedliche kinetische Phasen nacheinander ab. In der ersten Phase („Lag-Phase“) findet bereits eine exponentielle Amplifizierung statt, aber das Fluoreszenzsignal liegt noch unterhalb des Hintergrundsignals. Die zweite Phase ist die logarithmische (log) Phase. In dieser Phase verdoppelt sich idealerweise das PCR-Produkt bei jedem Zyklus, entsprechend auch das Fluoreszenzsignal. Die dritte Phase ist die Phase der Hemmung (Retardierung). Eine Anhäufung des PCR-Produkts hemmt wichtige Faktoren und Enzym und Substrat sind fast aufgebraucht. Die vierte Phase ist die stady-state Phase, in der keine Amplifizierung mehr erfolgt. Für die Analyse der Daten einer PCR ist die zweite Phase, die logarithmische Phase, entscheidend und kann mathematisch mit folgender **Gleichung 1** beschrieben werden:

$$R_n = R_0 \cdot (1 + E)^n \quad (1)$$

R_n	Fluoreszenzsignal nach n Zyklen
R_0	Fluoreszenzsignal zu Beginn (nach 0 Zyklen)
n	Anzahl der Zyklen
E	Effizienz der Reaktion ($0 \leq E \leq 1$)

Wichtige Parameter zur Berechnung:

Für die Auswertung einer PCR müssen grundsätzlich pro Well zwei Werte bestimmt werden: der Ct-Wert und die Effizienz einer PCR.

Ct-Wert

Der Ct-Wert oder auch Cp-Wert (Cycle Threshold bzw. Crossing Point) ist die Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen (Schwellenwert, Threshold). Dieser Schwellenwert muss immer in der exponentiellen (logarithmischen) Phase gesetzt werden: über dem Hintergrundsignal und vor dem Erreichen der Hemmphase (**Abb. 7**). Für die Bestimmung der Ct-Werte in der vorliegenden Arbeit wurde der Threshold bei allen PCR-Läufen auf 100 eingestellt, um die Ct-Werte untereinander vergleichen zu können. Im Falle einer 100% Effizienz einer PCR zeigt ein um eine Einheit geringerer Ct-Wert die doppelte Menge an spezifischer cDNA an.

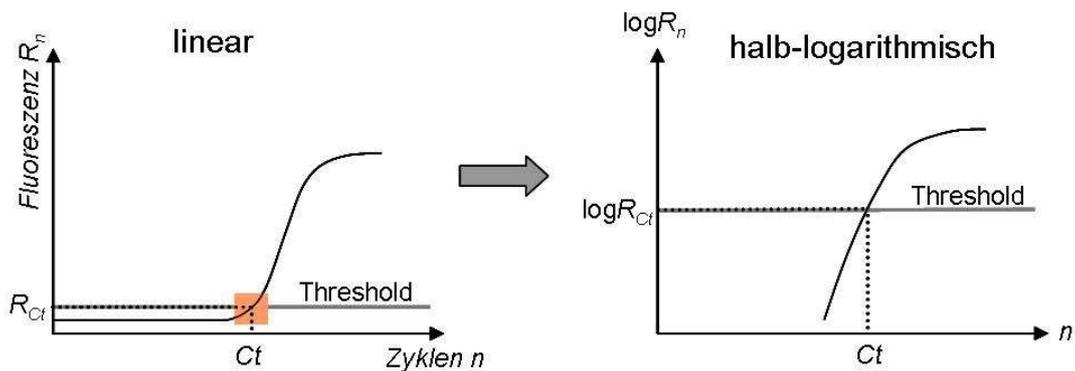


Abb.7 Kinetik der qPCR. Die Fluoreszenz R_n (y-Achse) wird gegen die Zyklenzahl n (x-Achse) linear (linke Grafik) und halb-logarithmisch (rechte Grafik, y-Achse logarithmiert) aufgetragen. Der C_t -Wert wird in der exponentiellen Phase gesetzt (farbiges Rechteck). R_{C_t} ist das Fluoreszenzsignal nach C_t -Zyklen (modifiziert nach Scheffe et al. 2006).

Effizienz

Theoretisch gesehen verdoppelt sich das PCR-Produkt in der exponentiellen Phase der PCR bei jedem Zyklus. Das stellt einen optimalen Verlauf dar und entspricht einer Effizienz von 100 % bzw. $E = 1$. Praktisch liegen die Effizienzen jedoch zwischen 0,65 und 0,95 (65 und 95 %), da viele Faktoren die Reaktion beeinflussen und hemmen. Einige biologische qPCR-Inhibitoren sind: Heparin (aus peritonealen Mastzellen), Polysaccharide (z. Bsp. Glykogen >2 mg/ml), Proteine (z. Bsp. Hämoglobin) (Bustin 2004). Aus diesem Grund ist es für eine exakte Analyse wichtig, die tatsächliche Effizienz zu ermitteln. Dafür gibt es mehrere mögliche Ansätze. Zum einen kann die Effizienz über eine Standardkurve bestimmt werden. Mehrere Verdünnungsstufen einer Verdünnungsreihe werden zusätzlich auf der Platte mitgeführt. Generell verhält sich der C_t -Wert umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge. Werden die C_t -Werte der einzelnen Verdünnungen der Verdünnungsreihe gegen den Logarithmus der initialen DNA-Konzentration aufgetragen, kann grafisch eine Regressionsgerade dargestellt werden. Anhand dieser Geraden können dann unter anderem der Regressionskoeffizient r^2 , der Anstieg s (slope) und die Effizienz (E) berechnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ein Verfahren gewählt, bei dem es auch ohne eine Standardkurve möglich ist, aus jeder Amplifizierung pro Well eine Regressionsgerade zu erstellen. Dies basiert auf der Berechnung des Logarithmus der Fluoreszenzmenge bei jedem Zyklus. In der exponentiellen Phase der PCR-Kurve ergibt sich dann eine lineare Regression. Nun ist es möglich, sowohl aus dem Anstieg s , als auch direkt aus den Fluoreszenzwerten die Effizienz E zu ermitteln. Für die genaue Berechnung der Effizienz muss diese Gerade so definiert werden, dass sie drei bis sechs Datenpunkte beinhaltet, den höchstmöglichen Anstieg und größtmöglichen Korrelationskoeffizienten (Pearson-

Korrelationskoeffizient r^2 , siehe Kapitel 3.1.8.3) aufweist. In der halb-logarithmischen Darstellung lässt sich eine Regressionsgerade bestimmen (**Abb. 8**).

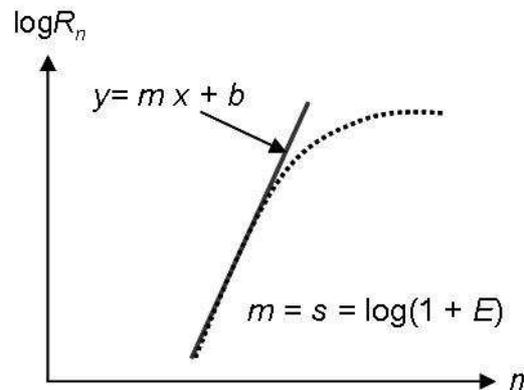


Abb.8 Bestimmung der Effizienz der PCR. In der halb-logarithmischen Ansicht kann anhand der Trendlinie in der exponentiellen Phase der Anstieg s (slope) und damit die Effizienz E berechnet werden (modifiziert nach Schefe et al. 2006).

Mithilfe des Anstiegs s der Regressionsgerade lässt sich die Effizienz berechnen (nach Schefe et al. 2006). **Gleichung (1)** ist die Basisformel jeder qPCR. Nach Bestimmung des Logarithmus erhält man **Gleichung (2)**.

$$R_n = R_0 \cdot (1 + E)^n \quad | \cdot \lg \quad (1)$$

$$\lg R_n = \lg(1 + E) \cdot n + \lg R_0 \quad (2)$$

Durch einen Koeffizientenvergleich mit der allgemeinen Geradengleichung der Form $y = mx + b$ zeigt Gleichung (2) die Natur einer Geraden mit der Steigung $s = \lg(1+E)$. Umgestellt nach $1 + E$ ergibt sich **Gleichung (3)**.

$$1 + E = 10^s \quad (3)$$

- R_n Fluoreszenzsignal nach n Zyklen
- R_0 Fluoreszenzsignal zu Beginn (nach 0 Zyklen)
- n Anzahl der Zyklen
- s Anstieg (slope)
- E Effizienz der Reaktion ($0 \leq E \leq 1$)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Effizienz direkt aus den Variablen R_0 und R_n bestimmt. Dafür wurde die allgemeine Gleichung (1) für eine qPCR $R_n = R_0 \cdot (1 + E)_n$ wiederum logarithmiert und nach $1 + E$ umgestellt und man erhält **Gleichung (4)**, die zur Berechnung der Effizienz verwendet wurde.

$$1 + E = 10^{\frac{\lg \frac{R_n}{R_0}}{n}} \quad (4)$$

3.1.8.2 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes, ubiquitäres Housekeeping-Gen (HKG) oder auf einen HKG-Index bezogen. Dieser Vorgang wird als Normalisierung bezeichnet. Der HKG-Index bei mehreren verwendeten HKGs entspricht dem Normalisierungsfaktor als geometrisches Mittel der einzelnen HKG-Werte. Es werden keine Startkopienzahlen oder –konzentrationen bestimmt, sondern die Expressionsdifferenz.

Die Berechnung der Expressionsdifferenz kann über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Effizienz der qPCR-Reaktion ist eine angenommene Verdopplung der DNA bei jedem Schritt) oder eine genauere, die Effizienz korrigierende, Methode erfolgen. Letztere ist die in dieser Arbeit angewandte GED-Methode (Genexpressions-Ct-Differenz). Das allgemeine Prinzip wird im Folgenden erläutert. Bei beiden Methoden wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des HKGs vom Ct-Wert des Zielgens (GOI) subtrahiert (Normalisierung) (**Gleichung (5)**).

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{GOI}) - \text{Ct}(\text{HKG}) \quad (5)$$

Nach dieser Normalisierung wird vom ΔCt -Wert der experimentell behandelten Probe der ΔCt -Wert der Kontrolle abgezogen (**Gleichung (6)**).

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} \text{ Behandlung} - \Delta\text{Ct} \text{ Kontrolle} \quad (6)$$

Geht man von einer Verdopplung der DNA bei jedem Zyklus aus, kann die Berechnung des Expressionsunterschieds mit **Gleichung (7)** beschrieben werden:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (7)$$

In Gleichung (5) und (6) wird für alle Gene eine Effizienz von 100 % ($E = 1$ bzw. $E + 1 = 2$) angenommen. Aufgrund dieser Verdopplung bei einer Effizienz von 100 % ist die Basis in der exponentiellen Formel 2 (siehe Gleichung 7). Die Basis bei einer Effizienz ungleich 100 % wird als $E + 1$ beschrieben. In der Praxis liegen die realen Effizienzen unter optimalen Reaktionsbedingungen bei 1,7 – 1,9 (wenn $E + 1$; entspricht 70 - 90 %) Aus diesem Grund wurde die effizienzkorrigierte relative Quantifizierungsmethode auf der Grundlage der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode entwickelt und als GED benannt (Scheffe et al. 2006). Die GED-Methode

berücksichtigt die biologischen und technischen Schwankungen des exponentiellen Fluoreszenzkurvenverlaufs und ist unabhängig von einer Standardkurve (ökonomischer Vorteil). Schecke, Lehmann et al. (2006) leiteten aus der allgemeinen Formel für die Kinetik der PCR eine Formel ab, die die individuellen, realen Effizienzwerte einer Amplifizierung berücksichtigt. In ihrer Veröffentlichung werden die Begriffe „relative Expressions-Ratio“ und „GED-Wert“ definiert. Die Bestimmung der relativen Expressions-Ratio (rER) eines „gene-of-interest“ GOI (relativ zu einem Housekeeping-Gen HKG) in einem „sample(Probe)-of-interest“ SOI (relativ zu einer Referenzprobe ref) unter Verwendung der realen Effizienzen der einzelnen Gene ergibt den GED-Wert. Der GED-Wert ist also gleichzusetzen mit der relativen Expressionsratio rER .

Die **Gleichung (8)** gilt für die Anwendung bei einer aus allen Wells gemittelten Effizienz E für jedes Gen:

$$GED = rER = \frac{R_{norm}(SOI)}{R_{norm}(ref)} = \frac{(1 + E(GOI))^{-\Delta Ct(GOI)}}{(1 + E(HKG))^{-\Delta Ct(HKG)}} \quad (8)$$

Für den ΔCt -Wert in **Gleichung (8)** wird die **Gleichung (9)** (äquivalent zu Gleichung (4)) eingesetzt.

$$\Delta Ct(gene) = Ct(gene; SOI) - Ct(gene; ref) \quad (9)$$

R_{norm}	relative Quantität des GOI relativ zum HKG
E	Effizienz der Reaktion
SOI	Sample-of-Interest (Versuchsprobe)
ref	Referenz-Probe (unbehandelt, gesund etc.)
GOI	Gene-of-Interest (Zielgen)
HKG	Housekeeping Gen
rER	relative Expressions-Ratio
GED	Gen-Expressions-Ct-Differenz

Die **Gleichung (10)** gilt für die Anwendung bei individuellen E für jedes Gen und jedes Well:

$$GED = rER = \frac{(1 + E(HKG; SOI))^{Ct(HKG; SOI)}}{(1 + E(GOI; SOI))^{Ct(GOI; SOI)}} \cdot \frac{(1 + E(HKG; ref))^{-Ct(HKG; ref)}}{(1 + E(GOI; ref))^{-Ct(GOI; ref)}} \quad (10)$$

Für die Auswertung der Expressionsdaten in der vorliegenden Arbeit wurde ein Excel-basiertes Programm benutzt, in welchem die oben erläuterten Gleichungen zur relativen Quantifizierung mit Effizienzkorrektur implementiert wurden. Dieses Programm wurde von Katharina Wolf (Institut für Veterinär-Physiologie, FU Berlin) aus Gründen der Vereinfachung, der Datenspeicherung und statistischen Auswertung erstellt und ist Grundlage für alle hier aufgeführten Expressionsanalysen.

Für die GED-Wert-Berechnung wurde der Wert der Referenzprobe (z. B. die unbehandelte Probe) auf Null gesetzt und der Wert der Versuchsprobe somit zum Wert Null in Beziehung gesetzt. Diese Berechnung erfolgt auf Grundlage der **Gleichung (10)**. Setzt man in Gleichung 10 sowohl für das *SOI* als auch für die *ref* die Referenzprobe ein, so ergibt sich eine $GED = 1$. Von diesem GED-Wert wird 1 subtrahiert und die Referenzprobe erhält damit den Wert Null. Ausgehend von einem Null-Wert ist eine Auf- und Abregulierung des Zielgens schnell erkennbar.

3.1.8.3 Statistische Betrachtungen

Es gibt zwei Möglichkeiten, die für jedes Well berechnete Effizienz in die weiteren Berechnungen einzubinden. Zum einen kann mit einzelnen Effizienzen pro Well weitergerechnet werden, zum anderen kann für ein Gen aus den einzelnen Effizienz-Werten ein Mittelwert E_s gebildet werden, der dann für alle Wells einheitlich zur Berechnung des GED-Werts genutzt wird.

Peirson et al. (2003) untersuchte beide Methoden hinsichtlich ihrer Genauigkeit und kam zu dem Ergebnis, dass schon kleine Variationen in der Effizienz E zu einer ungenauen Berechnung der GED führen. Auf Grund dessen wird empfohlen, die GED-Werte mit einem gemittelten E_s zu berechnen. Hierzu wird der geometrische Mittelwert errechnet (**Gleichung (11)**).

$$G = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \dots \cdot x_n} \quad (11)$$

Bar et al. (2003) zeigten, dass E_s einer Normalverteilung folgt. Folgende statistische Anforderungen werden an eine Berechnung mit E_s gestellt:

$$E_s \pm 0,039; SD(E_s) \leq 0,02; \text{Konfidenzintervall } 95\%$$

Die Zahl der Zyklen, die in den Bereich der linearen Regression fallen, ist begrenzt. Wichtig ist, stark abweichende Werte (Ausreißer) aus der Effizienzberechnung herauszunehmen. Die Anzahl der Kurvenwerte sollte nach Ramaker et al. (2003) zwischen drei und sechs liegen. Für die hier zugrundeliegenden Berechnungen wurden acht Fluoreszenzwerte im Bereich der linearen Regression ausgelesen und anhand des Regressionskoeffizienten r^2 von Ausreißern bereinigt. Dieser zeigt an, wie genau die Daten auf der Regressionsgeraden liegen bzw. wie linear die Daten sich verhalten. Dieser Wert ist ein Maß für die Variabilität zwischen den Replikaten. Eine deutliche Differenz in den Ct-Werten der Replikate senkt den r^2 -Wert. Ein r^2 -Wert größer 0,980 ist erwünscht. **Gleichung (12)** zeigt die Formel zur Berechnung des r^2 -Werts

$$r^2 = \left[\frac{\sum((x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}))}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum(y_i - \bar{y})^2}} \right]^2 \quad (12)$$

x Zyklus
 y Fluoreszenzwerte
 (logarithmiert)
 \bar{x}/\bar{y} Mittelwerte

Als Grundlage für die statistische Analyse wurden zur Verringerung des technischen Fehlers in Triplets pipettiert. Ausgehend von einem pipettierten Triplett wurden pro Gen (GOI bzw. HKG) und Probe (SOI bzw. *ref*) jeweils drei einzelne Ct-Werte ermittelt (Ct₁, Ct₂ und Ct₃). Um zwei Proben miteinander zu vergleichen wurden pro Gen und Probe aus diesen drei Ct-Werten eines Triplets drei verschiedene GED-Werte (mit gemittelter E_s) bestimmt. Unter der Annahme, dass die GED-Werte für ein SOI normalverteilt sind (für die Ct-Werte und die E_s-Werte trifft dies zu), können daraus ein Mittelwert und die Standardabweichung (SD) kalkuliert werden.

3.1.8.3.1 Signifikanzbestimmung

Basierend auf der im Abschnitt 3.1.8.2 beschriebenen Berechnung der GED-Werte pro Probe und der dazugehörigen SD-Werte wurde für die Bestimmung der Signifikanzen der t-Test nach Welch (unterschiedliche SD-Werte, mit gleicher oder ungleicher Stichprobengröße) durchgeführt. Dafür wurde für die einzelne Probe aus den GED-Werten der Wiederholungen bzw. Versuchsdurchläufe der arithmetische Mittelwert gebildet. Die SD wurde mit der Fehlerfortpflanzung ermittelt (**Gleichung (13)**).

$$\overline{SD} = \sqrt{SD_1^2 + SD_2^2 + \dots + SD_n^2} \quad (13)$$

3.2 IN-VIVO-STUDIE AN *DIABETES-MELLITUS*-PATIENTEN

3.2.1 Studienablauf und Probanden

Der Verlauf der In-vivo-Studie an Patienten mit einem nicht-insulinabhängigem *Diabetes mellitus* Typ II erfolgte in zwei Phasen. In der ersten Phase wurden die in die Studie eingeschlossenen Patienten auf Veränderungen im Expressionsprofil potentieller Mg-sensitiver Gene getestet. Die Beprobung erfolgte über eine Blutentnahme. Probanden, die in Phase 1 eine erhöhte Expression eines oder mehrerer Mg-sensitiver Gene aufwiesen, wurden in Phase 2 über vier Wochen mit 300 mg Magnesiumcitrat (Magnesium Diasporal 300, Fa. Protina Pharmaceutical GmbH, Deutschland) supplementiert. Als Einschlusskriterium galt eine Erkrankung an einem nicht-insulinabhängigen *Diabetes mellitus* Typ II. Insgesamt wurden 115 Patienten in die Untersuchung eingeschlossen. Zusätzlich dienten 15 gesunde Patienten als Referenzprobe. Diese Studie wurde von der Ethik-Kommission des Zentralen Militärkrankenhauses/Fakultätshospital der Katholischen Universität in Ruzomberok/Slowakei genehmigt.

3.2.2 Experimentelles Setup

3.2.2.1 Blutentnahme und Leukozytenisolierung

Die Blutentnahme, Leukozytenisolierung und intrazelluläre Mg²⁺-Messung wurde in einer ambulanten Klinik in Ruzomberok/Slowakei durchgeführt. In ein Li-Heparin-beschichtetes Blutentnahmeröhrchen wurden 5 ml Blut entnommen. Davon diente 1 ml zur Bestimmung der totalen Plasma-Mg-Konzentration mittels Atom-Absorptionsspektrometrie. Aus den verbleibenden 4 ml Blut wurden mit Hilfe des LeukosepTM-Systems (Fa. Greiner Bio One) die Leukozyten nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die isolierten Leukozyten wurden danach zur Stabilisierung in RNALater (Fa. Ambion®) verbracht und bei -20°C bis zur RNA-Aufreinigung gelagert.

3.2.2.2 Isolierung der RNA

Zur Isolierung der RNA aus den Leukozyten wurde das NucleoSpin® RNA II Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet (Arbeitsschritte wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben).

3.2.2.3 Qualitäts- und Quantitätsbestimmung, cDNA-Synthese, kPCR, Gelelektrophorese, qPCR

Die Integrität, Reinheit und der Gehalt an RNA in den Proben wurde, wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, bestimmt. Einige Messungen wurden mit dem Nanodrop ND-1000 (Fa. Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Die Protokolle der cDNA-Synthese und qPCR entsprechen den in den Kapiteln 3.1.5 und 3.1.7 beschriebenen.

Einzig das Plattensetup unterschied sich leicht. Es wurden pro qPCR-Platte neun Patientenproben, vier Proben einer Misch-RNA von 15 gesunden Probanden als Referenzprobe, eine NTC, eine NRC und eine positiv Kontrolle pipettiert. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte ebenfalls nach der GED-Methode von Scheffe, Lehmann et al. (2006).

3.2.3 Magnesiumbestimmung im Plasma und in Leukozyten

Die Bestimmung der Plasma-Mg-Werte erfolgte aus dem Serum mittels Atom-Absorptionsspektrometrie (Flammen-AM-Spektrometer M Serie, Fa. Thermo Scientific). Hierbei wurde der extrazelluläre Gesamt-Mg-Wert ($[Mg]_{\text{Plasma}}$) bestimmt. Die Messung wurde an der Klinik für Kleintiere der FU Berlin unter Leitung von Herrn Dr. Hilmert durchgeführt. Die intrazelluläre Mg^{2+} -Bestimmung (freies intrazelluläres Mg^{2+} , $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$) wurde unmittelbar im Anschluss an die Probenentnahme von Herrn Dr. Kolisek (Institut für Veterinär-Physiologie, FU Berlin) durchgeführt. Dazu wurden die isolierten Leukozyten (siehe Kapitel 3.2.2.1) mit Mag-Fura-2 beladen und im Spektrofluorometer gemessen. Mag-Fura-2 ist ein Fluoreszenzfarbstoff (Indikator) zur intrazellulären Mg^{2+} -Bestimmung. Die Zellen werden dabei mit der Esterform des Farbstoffes beladen, der innerhalb der Zelle durch Esterasen hydrolytisch gespalten wird. Mag-Fura-2 bindet freies Mg^{2+} und verändert dabei die Exzitationswellenlänge. Das Exzitationsmaximum für Mag-Fura-2 liegt bei einer Wellenlänge von 380 nm. Mit zunehmender Mg^{2+} -Konzentration und damit steigender Konzentration an Mag-Fura-2- Mg^{2+} -Komplexen in der Messlösung verschiebt sich das Exzitationsmaximum von $\lambda=380$ nm auf $\lambda=340$ nm („excitation shift“), d. h. die Fluoreszenzintensität nimmt bei 340 nm zu und bei 380 nm ab. Zur Berechnung der Ionenkonzentration wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei den Exzitationsmaxima für freies Mag-Fura-2 und Mag-Fura-2- Mg^{2+} -Komplex in der zu untersuchenden Probe bei 340 nm und 380 nm bestimmt (*ratio* 340/380). Der Vorteil der Bestimmung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten zweier unterschiedlicher Wellenlängen liegt darin, dass Veränderungen des Farbstoffes,

Änderungen der absoluten Farbstoffkonzentration und bleaching-Effekte keine Auswirkung auf die Berechnung der Ionenkonzentrationen haben.

Vor der Durchführung der Messung wurden die Leukozyten in PBS gewaschen und schließlich in einer Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Hank's Balanced Salt Solution (CMF-HBSS, pH 7,4) resuspendiert. Das Beladen der Zellen mit 7,5 mmol/l Mag-Fura-2 AM erfolgt für 30 min bei RT in Gegenwart von Pluronic F-127 (1 μl pro 200 μl Reaktionsgemisch). Nach einem erneuten Waschen in CMF-HBSS wurden die Zellen für weitere 30 min inkubiert, um die vollständige Entesterung des Fluoreszenzfarbstoffes zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen zweimal in CMF-HBSS gewaschen, um extrazelluläres Mag-Fura-2 zu entfernen und danach in CMF-HBSS mit Zusatz von 0,3 mmol/l Mg^{2+} (HBSS^+) überführt, wo sie bis zur Messung der intrazellulären freien Mg^{2+} -Konzentration ($[\text{Mg}^{2+}]_{\text{intra}}$) verblieben. Die Messungen erfolgten in 3 ml-Küvetten bei RT. Die Zellsuspension (2 ml, HBSS^+) wurde durch Rühren in Bewegung gehalten. $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{intra}}$ wurde durch Messen der Fluoreszenz der beladenen Zellen in einem Spektrofluorometer (LS55 Fa. PerkinElmer) bestimmt. Dies erfolgte unter Verwendung des schnellen Filtersystems (fast filter), das es ermöglicht, in 20-ms-Intervallen Exzitationen bei 340 und 380 nm und Emission bei 515 nm zu messen.

Die $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{intra}}$ -Werte wurden aus dem Verhältnis 340/380 nm nach der Formel von Grynkiewicz et al. (1985) (**Gleichung (14)**) unter Verwendung der Software FL WinLab V 4.00.03 (Fa. PerkinElmer) berechnet.

$$[\text{Ion}] = K_d \cdot \left[\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right] \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \quad (14)$$

R (ratio)	Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei den Exzitationsmaxima für den freien Indikator und den Indikator-Ionen-Komplex in der zu untersuchenden Probe
R_{\max}	Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für den vollständig mit Ionen gesättigten Indikator
R_{\min}	Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für den freien Indikator
S_{f2} bzw. S_{b2}	Maximale Fluoreszenzintensität des Indikators ohne divalente Ionen bzw., wenn divalente Ionen im Überschuss vorhanden sind
K_d	Dissoziationskonstante des Indikator-Ionen-Komplexes

Die zur Berechnung der Ionenkonzentrationen benötigten Parameter R_{\min} und R_{\max} (S_{f2} , S_{b2} , K_d) wurden am Ende jeder Messung gewonnen. Für den Mag-Fura-2- Mg^{2+} -Komplex wurde eine K_d von 1,53 mmol/l für die Berechnungen verwendet. S_{f2}/S_{b2} ist das Verhältnis zwischen der Exzitationsfluoreszenz der Wellenlänge 2 (mit subtrahiertem Hintergrundsignal) ohne Magnesium und mit gesättigter Mg-Konzentration. Das minimale (R_{\min}) und maximale (R_{\max})-Verhältnis wurden am Ende jedes Experiments bestimmt. R_{\max} für Mag-Fura-2 wurde durch die Zugabe von SDS (10% w/v) zur Zellyse und 30 mmol/l MgCl_2 ermittelt. R_{\min} wurde durch

Zugabe von 50 mmol/l EDTA (pH 7,4) detektiert. Durch EDTA wurden alle Mg-Ionen aus der Lösung entfernt. Die endgültige $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{intra}}$ -Konzentration wurde als Mittelwert aus den $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{intra}}$ -Werten der ersten 30 sek der Messung berechnet.

3.3 METHODENOPTIMIERUNG MIT MIQE

3.3.1 MIQE

“The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments” (MIQE)-Richtlinien wurden von einer Gruppe Wissenschaftlern um Stephen A. Bustin, Michael W. Pfaffl, Jan Hellems und anderen ins Leben gerufen. In diesen Richtlinien sind die minimalen Informationen festgelegt, die nötig sind, um die Zuverlässigkeit und Wiederholbarkeit publizierter qPCR-Ergebnisse kritisch bewerten zu können. Transparente Arbeitsabläufe von der Probenentnahme bis hin zur Datenauswertung ermöglichen das Aufdecken von Fehlern in allen Phasen der qPCR: vom fehlerhaften Design eines Versuchs bis hin zur fehlerhaften Datenauswahl bei der Normalisierung (Bustin et al. 2009).

3.3.2 Bestimmung der Genexpressionsstabilität M der Housekeeping Gene mit „geNorm“

Bezüglich der Normalisierung stellt MIQE insbesondere die Anforderung einer kritischen Hinterfragung der Eignung des HKGs. Es wurden Verfahren entwickelt, mit denen für jedes Gewebe und jeden physiologischen/pathologischen Zustand die optimalen Normalisierungsgene gefunden werden können. Während bei den ersten Versuchen noch mit nur einem, in der Literatur empfohlenen, HKG normalisiert wurde, erfolgte bei späteren Versuchen die Messung mehrerer HKGs.

Entsprechend der MIQE-Richtlinien und unter Zuhilfenahme der Software qbase^{Plus} wurden die in den Experimenten verwendeten Housekeeping-Gene erneut auf ihre Eignung getestet. Die Expressionsstabilität eines HKGs variiert je nach Zell- und Gewebetyp. Eine individuelle Anzahl von stabilen HKGs ist Voraussetzung für eine exakte Normalisierung der Proben, um technische Variationen korrekt auszugleichen. Deswegen ist es wichtig, mittels einer repräsentativen Probenauswahl die für das spezifische Experiment optimale Anzahl an stabilen HKGs zu ermitteln.

„geNorm“ ist eine Analysesoftware, die aus einer Zahl von getesteten HKGs zwei wesentliche Maße berechnet: den Wert M, als Maß für die Stabilität der Genexpression und

die paarweise Variation V , als Maß für die Anzahl von Genen, die für eine zuverlässige Berechnung des Normalisierungsfaktors nötig sind. Das Maß für die Genstabilität M eines Gens ist das arithmetische Mittel der paarweisen Variation V dieses Gens mit allen anderen getesteten HKGs. Das Programm erlaubt den Ausschluss der HKGs mit dem schlechtesten M -Wert (höchster M -Wert) und berechnet für die verbliebenen HKGs einen neuen M -Wert. So entsteht eine Rangordnung innerhalb der Gene. Die HKGs mit dem niedrigsten M -Wert weisen die stabilste Expression auf. Die der Berechnung zugrunde liegenden Formeln sind bei Hellemans et al. (2007) nachzulesen.

M -Werte unter 0,5 weisen auf ein stabil exprimiertes Gen in einem relativ homogenen Probenpool hin. Bei einem heterogenen Probenpool kann auch ein M -Wert von 1 noch auf ein stabil exprimiertes Gen hinweisen. M -Werte unter 0,2 deuten auf eine sehr hohe Stabilität hin. Das wird gewöhnlich bei der Verwendung genomischer DNA als Probe oder bei sehr stabil exprimierten Genen beobachtet. Hinsichtlich des V -Wertes ist bei einem Wert unter 0,15 ein zusätzliches HKG nicht mehr erforderlich.

An das Setup zur Bewertung der ausgewählten HKGs werden folgende Anforderungen gestellt:

An die Proben: Probenanzahl ≥ 10 , repräsentativ für das aktuelle Experiment (Probentyp und Probenqualität), Einbeziehung aller Gruppen zu gleichen Anteilen

An die HKGs: Anzahl der zu testenden Gene ≥ 8 , Auswahl aus verschiedenen funktionalen Klassen und unterschiedlichen Wegen zur Reduzierung der Wahrscheinlichkeit der Co-Regulation

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Vorgaben berücksichtigt. Es wurden neun (für die Jurkat-/JVM-13-Zellen) bzw. elf (für die humanen Leukozyten, Diabetes-Patienten) potentielle HKGs getestet. Die Auswahl der Gene inklusive der Primersequenz wurde den Veröffentlichungen von Vandesompele et al. (2002), Dhanasekaran et al. (2010) und Radonic et al. (2004) entnommen (**Tab. 6**). Zusätzlich wurde das für die vorliegenden Versuche verwendete *Tubulin alpha 1b* auf seinen M -Wert getestet. Es wurden jeweils elf Proben pro Zelllinie und elf Proben der *Diabetes-mellitus*-Patienten entsprechend den Empfehlungen ausgewählt. Die cDNA-Synthese erfolgte wie im Kapitel 3.1.5 beschrieben. Alle Proben eines Versuchsansatzes wurden zusammen mit einer NTC in Dupletts auf eine 96-Well-Platte (Fa. Applied Biosystem) pipettiert. Es entspricht dem optimalen Plattensetup, wenn alle Proben für ein HKG auf derselben Platte gemessen werden (Proben-Maximierungs-Setup; **Abb. 37** im Anhang). Die qPCR lief im ViiA7 (Fa. Applied Biosystem) mit einem 2-Step-Protokoll unter Verwendung von SybrGreen als Fluoreszenzfarbstoff (Protokoll siehe **Tab. 24** im Anhang).

Die Primer wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon bestellt und vor der qPCR mittels konventioneller PCR und Agarose-Gelelektrophorese (im Kapitel 3.1.6 beschrieben) auf ihre

Spezifität getestet. Die Annealingtemperatur betrug 58 °C, da die Primer aller verwendeten GOIs bei dieser Temperatur arbeiten. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der in der Software qbase^{Plus} integrierten Applikation „geNorm“ (Biogazelle).

Tab.6 Übersicht über die getesteten HKGs zur Optimierung des qPCR-Assays

Symbol	Accession-Nummer	Name	Primersequenz	Amplikongröße (bp)
B2M	NM_004048	beta-2-microglobulin	Fwd TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT Rev TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	86
GAPDH	NM_002046.3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Fwd TGCACCACCAACTGCTTAGC Rev GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87
HMBS	NM_000190.3	Hydroxymethyl-bilane synthase	Fwd GGCAATGCGGCTGCAA Rev GGGTACCCACGCGAATCAC	86
HPRT1	NM_000194.2	Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1	Fwd TGACTGCGCAAACAATGCA Rev GGTCTTTTACCAGCAAGCT	94
RPL13A	NM_012423.2	Ribosomal protein L13a	Fwd CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA Rev TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	126
SDHA	NM_004168.2	Succinate dehydrogenase complex, subunit A	Fwd TGGGAACAAGAGGGCATCTG Rev CCACCACTGCATCAAATTCATG	86
ACTB	NM_001101.3	beta Actin	Fwd CTGGAACGGTGAAGGTGACA Rev AAGGGACTTCCTGTAACAACGCA	140
UBC	NM_021009.5	Ubiquitin C	Fwd ATTTGGGTCGCAGTTCTTG Rev TGCCTTGACATTCTCGATGGT	133
YWHAZ	NM_001135699.1	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Fwd ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA Rev CCGCCAGGACAAACCAGTAT	94
RP II	NM_000937.4	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A	Fwd GCACCACGTCCAATGACAT Rev GTGCGGCTGCTTCATAA	267
HuP0	NM_001002.3	Ribosomal protein, large, P0	Fwd GCTTCCTGGAGGGTGTCC Rev GGA CTGTTTGTACCCGTTG	105
Tuba1b	NM_006082.2	Tubulin, alpha 1b	Fwd GCCCTACAACCTCCATCCTCA Rev GTCAACATTCAGGGCTCCAT	205

3.3.3 Vergleichende Berechnungen im Hinblick auf eine Optimierung des Housekeeping-Gens

In einem Vergleich wurden von 20 cDNA-Proben humaner Leukozyten die Expressionswerte des Gens *CNNM2* in Abhängigkeit des zur Normalisierung verwendeten HKGs bestimmt. Dafür wurden die Ct-Werte der HKGs *beta-Actin*, *B2M* und *Tubulin alpha 1b* in 20 zufällig ausgewählten Proben mittels qPCR ermittelt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes entspricht dem Protokoll in **Tabelle 23** (im Anhang). Es wurde im Duplett pipettiert. Die qPCR wurde im ViiA 7 (Applied Biosystems) in einem 2-Step-Protokoll durchgeführt (Protokoll siehe **Tab. 24** im Anhang). Die Daten wurden mit der qbase^{Plus}-Software ausgewertet.

4 ERGEBNISSE

4.1 ZELLKULTURVERSUCH (IN VITRO)

Im folgenden Versuch wurden Jurkat- und JVM-13-Zellen verwendet. Es wurde das Verhalten potentieller Mg-sensitiver Gene unter Mg-Mangelbedingungen auf mRNA-Ebene untersucht. Die Zellen wurden 72 h in Mg-freiem Medium inkubiert. In exakten zeitlichen Abständen wurde aus den inkubierten Zellproben RNA isoliert und die Expressionrate ausgewählter Gene bestimmt.

RNA-Integrität

Die isolierten RNA-Proben waren von sehr hoher Qualität. Im Mittel wurden bei den JVM-13-Zellen eine RIN von $9,6 \pm 0,4$ und bei den Jurkat-Zell-Proben eine RIN von $9,5 \pm 0,5$ mit dem Lab-on a-Chip-Verfahren der Fa. Agilent Technologies gemessen.

Qualitativer Nachweis der GOIs

Vor der quantitativen Untersuchung der ausgewählten Gene war zu klären, ob sowohl die Jurkat-Zellen als auch die JVM-13-Zellen diese exprimieren. Dazu wurde eine konventionelle PCR durchgeführt und das Produkt dann im Agarose-Gel nachgewiesen (**Abb. 9** und **10**). Beide Zelllinien exprimierten die Zielgene *SLC41A1*, *SLC41A2*, *SLC41A3*, *CNNM2*, *TRPM7*, *N33*, *NIPA1*, *MagT1* und die HKGs *Tubulin alpha 1b (TUBA1B)* und *beta-Actin*. Für das Gen *TRPM6* konnte zum Versuchszeitpunkt kein PCR-Protokoll etabliert werden, sodass es aus diesem Versuch ausgeschlossen wurde.

Weiterhin zeigt die Auftrennung jeweils nur eine Bande pro Gen. Diese Tatsache und die korrekte Amplikongröße wurden als hinreichende Kriterien für die Spezifität der verwendeten Primer angesehen.

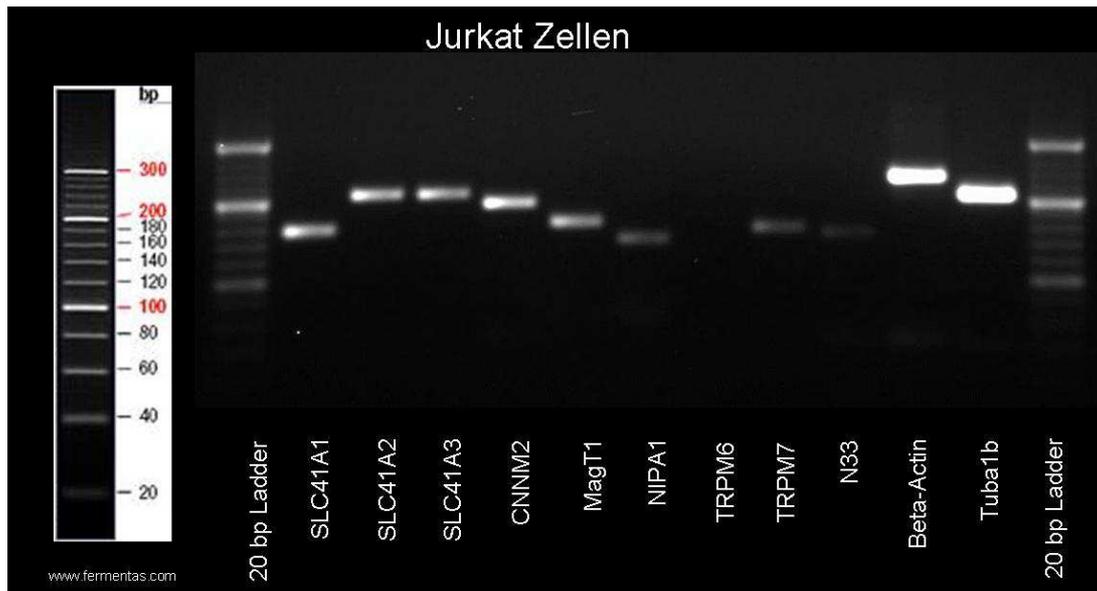


Abb.9 Ethidiumbromid-Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte aller ausgewählten Gene der Jurkat-Zellen (Größenstandard: O'RangeRuler™ 20 bp DNA Ladder Fa. Fermentas)

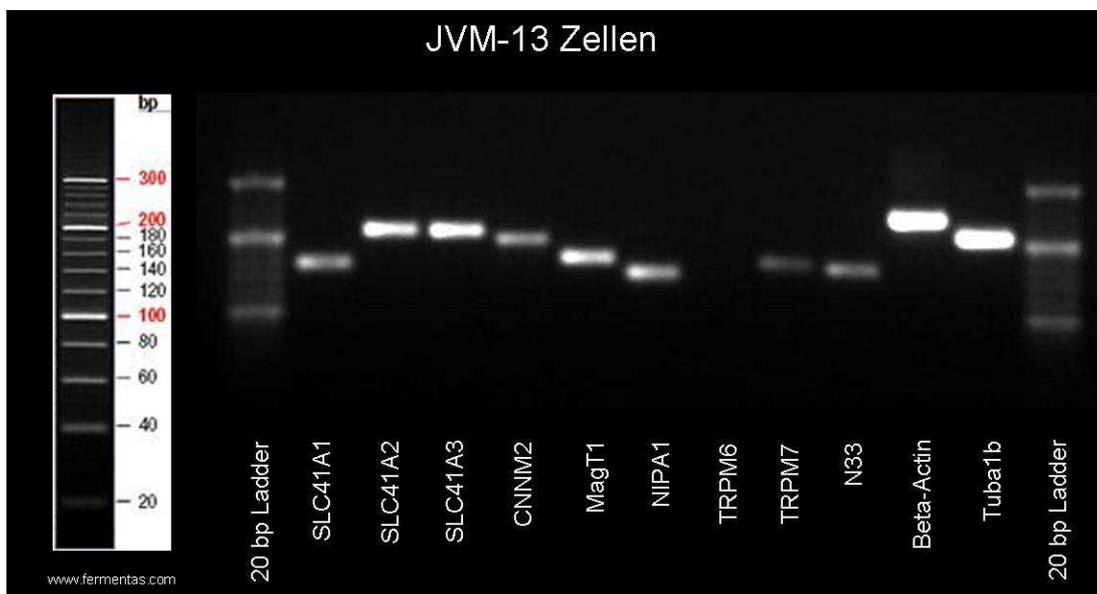


Abb.10 Ethidiumbromid-Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte aller ausgewählten Gene der JVM-13-Zellen (Größenstandard: O'RangeRuler™ 20 bp DNA Ladder Fa. Fermentas)

4.1.1 Genexpressionsanalysen

Die Abbildungen auf den folgenden Seiten zeigen die Expressionsraten der einzelnen Gene in Abhängigkeit von der Zeit. Jeweils für beide Zelllinien sind die Verläufe grafisch dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die Zeitpunkte 3 h, 5 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h abgebildet. Zur Normalisierung wurde in Anlehnung an vorherige Studien am eigenen Institut (durchgeführt von Friederike Rolle) nur das HKG *TUBA1B* verwendet. Die 72 h-Werte wurden generell aus den vergleichenden Betrachtungen herausgenommen, da die Ct-Werte des HKGs *TUBA1B* für diesen Zeitpunkt nicht stabil waren. Somit konnte keine exakte Berechnung der GED-Werte vorgenommen werden.

Die in den Grafiken dargestellten GED-Werte für ein GOI pro Zeitpunkt setzten sich als arithmetische Mittelwerte (Beschreibung siehe Kapitel 3.1.8.3) aus den GED-Werten dreier unabhängiger Einzelproben pro Zeitpunkt zusammen:

Für beide Zelllinien ergibt sich $n = 3$. Die in der Grafik dargestellte Standardabweichung wurde mittels Fehlerfortpflanzung aus den Werten der einzelnen Triplets pro Gen und Zeitpunkt errechnet und ergibt sich aus der Wurzel der Quadratsummen der Einzelstandardabweichungen jedes Triplets.

Als Referenzwert für die Bestimmung der Expressionsdifferenz wurde der Zeitpunkt 0 herangezogen. Diese Differenz wird im Folgenden als x-Fach überexprimiert ausgedrückt. Nähere Erläuterungen zum GED-Wert sind in Kapitel 3.1.8.2 zu finden.

Der Schwellenwert $GED = 1$ wird im Folgenden mit einer gestrichelten Linie kenntlich gemacht. Auf Ebene der Expression entspricht ein GED-Wert von 1 einer annähernden Verdopplung der Ausgangsmenge des Gens im Vergleich zum Referenzwert, wenn der Expressionswert der Referenzprobe gleich Null gesetzt wird (wie in der vorliegenden Arbeit erfolgt). Die Effizienzen der durchgeführten qPCRs sind in **Tabelle 25** im Anhang aufgeführt.

4.1.1.1 Solute Carrier Family 41 Member A1 (SLC41A1)

Abbildung 11 zeigt den zeitlichen Verlauf der mRNA-Expression des Gens *SLC41A1* in den Jurkat- und JVM-13-Zellen. Die Expression stieg im Verlauf des Experiments in beiden Zelllinien über den Schwellenwert von $GED = 1$ (JVM-13 nach 8 h, Jurkat nach 48 h). Die JVM-13-Zellen zeigten eine sehr deutliche Überexpression nach 12 h auf das 3,6-Fache des Ausgangswerts. Im weiteren Verlauf erfolgte ein stetiger Anstieg bis auf das 7,3-Fache nach 48 h in Mg-freiem Medium. Die Veränderung der Expressionsrate in den Jurkat-Zellen war gering und zu keinem Zeitpunkt signifikant. **Tabelle 7** zeigt die Einzelwerte der Genexpressionsbestimmung in beiden Zelllinien.

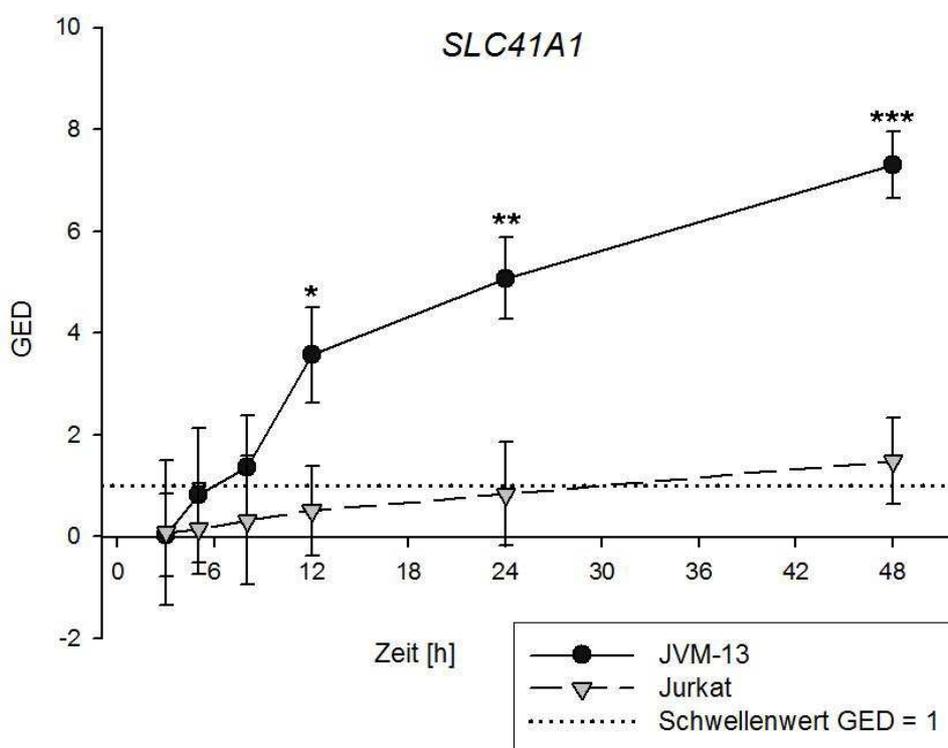


Abb.11 Expression des Gens *SLC41A1* in Jurkat- und JVM-13-Zellen über eine Zeitdauer von 48 h in Mg-freiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD ($n = 3$) (* entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$).

Tab.7 Übersicht über die in der Abbildung 11 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen *SLC41A1* über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium

Zeitpunkt	JVM-13				Jurkat			
	GED	SD	n	p-Wert	GED	SD	n	p-Wert
3 h	0,0384	0,8110	3	0,944	0,0738	1,4210	3	0,941
5 h	0,8104	1,3195	3	0,410	0,1519	0,8921	3	0,830
8 h	1,3598	1,0104	3	0,157	0,3199	1,2633	3	0,728
12 h	3,5677	0,9350	3	0,025	0,5064	0,8732	3	0,481
24 h	5,0726	0,8089	3	0,002	0,8370	1,0145	3	0,308
48 h	7,2957	0,6514	3	0,000	1,4824	0,8401	3	0,081

4.1.1.2 Solute Carrier Family 41 Member A2 (SLC41A2)

Abbildung 12 zeigt den zeitlichen Verlauf der mRNA-Expression des Gens *SLC41A2* in den Jurkat- und JVM-13-Zellen. Nur in den JVM-13-Zellen stieg die Expression des Gens *SLC41A2* im Verlauf signifikant an. In den Jurkat-Zellen wurde zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der Expression ermittelt. Die Expressionsrate in den JVM-13-Zellen lag zwischen 5 und 8 h bei dem 1,4-Fachen, stieg nach 12 h auf einen Wert GED = 3,9 steil an und erreichte nach 24 h in Mg-freiem Medium eine ca. 5-fache Überexpression. Diese veränderte sich innerhalb der nächsten 24 Stunden nicht mehr. **Tabelle 8** zeigt die Einzelwerte der Genexpressionsbestimmung in beiden Zelllinien.

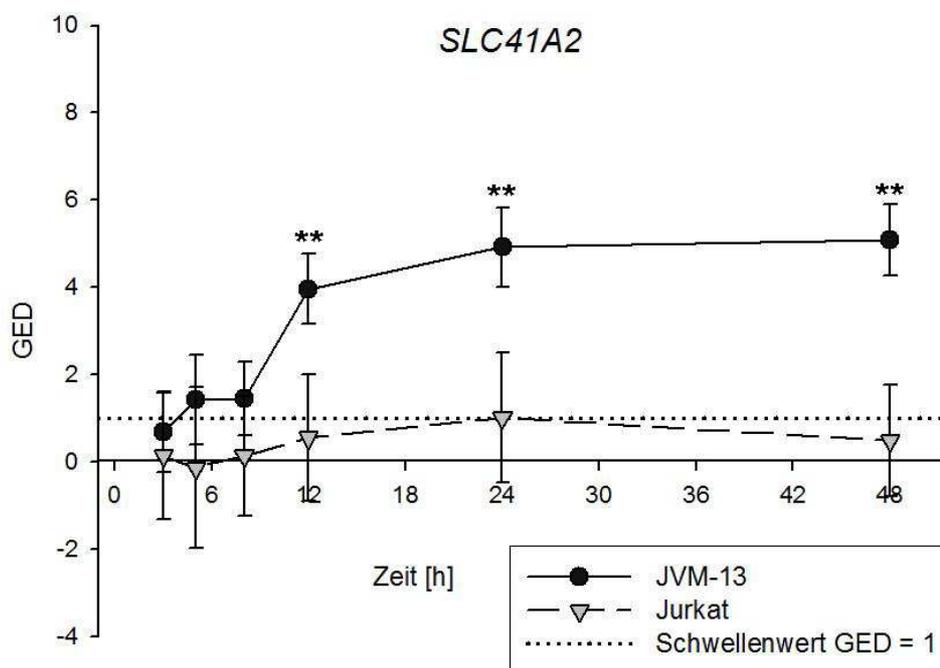


Abb.12 Expression des Gens *SLC41A2* in Jurkat- und JVM-13-Zellen über eine Zeitdauer von 48 h in Mg-freiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD (n = 3) (* entspricht p < 0,05, ** entspricht p < 0,01).

Tab.8 Übersicht über die in der Abbildung 12 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen *SLC41A2* über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium

Zeitpunkt	JVM-13				Jurkat			
	GED	SD	n	p-Wert	GED	SD	n	p-Wert
3 h	0,697	0,917	3	0,338	0,137	1,449	3	0,905
5 h	1,432	1,032	3	0,123	-0,130	1,840	3	0,925
8 h	1,455	0,851	3	0,087	0,141	1,375	3	0,900
12 h	3,963	0,811	3	0,006	0,557	1,445	3	0,633
24 h	4,927	0,912	3	0,004	1,020	1,480	3	0,404
48 h	5,093	0,819	3	0,003	0,491	1,274	3	0,651

4.1.1.3 Solute Carrier Family 41 Member A3 (SLC41A3)

Abbildung 13 zeigt den zeitlichen Verlauf der mRNA-Expression des Gens *SLC41A3* in den Jurkat- und JVM-13-Zellen. Im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen, bei denen keine signifikanten Veränderungen der Expression zu verzeichnen war, zeigten die JVM-13-Zellen einen deutlichen Anstieg in der Expression des Gens *SLC41A3* im Verlauf der Zeit. Von einer 1,7-fachen Überexpression zum Zeitpunkt 8 h stieg der GED-Wert kontinuierlich auf 5,1 zum Zeitpunkt 48 h. **Tabelle 9** zeigt die Einzelwerte der Genexpressionsbestimmung in beiden Zelllinien.

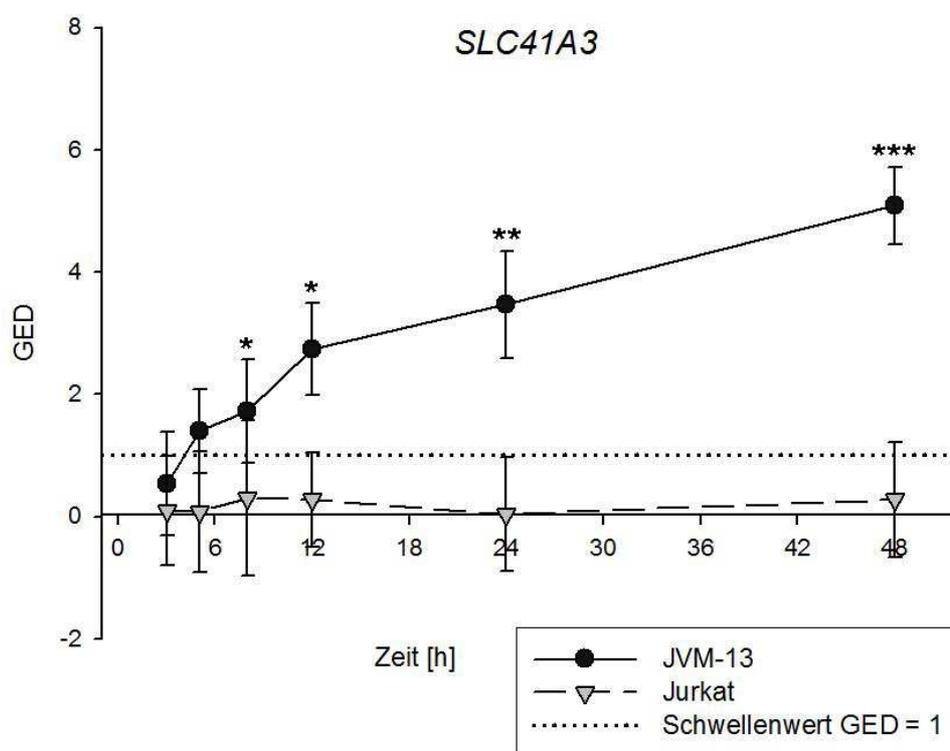


Abb.13 Expression des Gens *SLC41A3* in Jurkat- und JVM-13-Zellen über eine Zeitdauer von 48 h in Mg-freiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD (n = 3) (* entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$).

Tab.9 Übersicht über die in der Abbildung 13 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen *SLC41A3* über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium

Zeitpunkt	JVM-13				Jurkat			
	GED	SD	n	p-Wert	GED	SD	n	p-Wert
3 h	0,535	0,855	3	0,387	0,095	0,901	3	0,890
5 h	1,393	0,694	3	0,052	0,077	0,987	3	0,918
8 h	1,719	0,848	3	0,047	0,297	1,269	3	0,743
12 h	2,738	0,761	3	0,011	0,273	0,765	3	0,662
24 h	3,469	0,875	3	0,008	0,038	0,926	3	0,957
48 h	5,085	0,629	3	0,001	0,277	0,941	3	0,697

4.1.1.4 Ancient Conserved Domain Protein Subtype 2 (ACDP2, CNNM2)

Abbildung 14 zeigt den zeitlichen Verlauf der mRNA-Expression des Gens *CNNM2* in den Jurkat- und JVM-13-Zellen. Im Zellversuch war *CNNM2* eines der am stärksten auf einen Mg-Mangel reagierenden Gene über einen Zeitraum von 48 h. Beide Zelllinien reagierten mit einer Erhöhung der Expressionsrate, besonders sensibel verhielten sich die JVM-13-Zellen. Bereits nach 5 h lag bei ihnen die Expressionsrate beim 2,8-Fachen des Ausgangswertes, um 7 h später auf das 8,2-Fache (12 h) anzusteigen. Ab dem Zeitpunkt 12 h bleiben die GED-Werte weiterhin auf diesem hohen Niveau (24 h 7,0-fach; 48 h 9,9-fach). Die Expression in den Jurkat-Zellen erreicht in einem leichten, kontinuierlichen Anstieg ihr Maximum zum Zeitpunkt 48 h mit dem 2,7-Fachen des Ausgangswertes. **Tabelle 10** zeigt die Einzelwerte der Genexpressionsbestimmung in beiden Zelllinien.

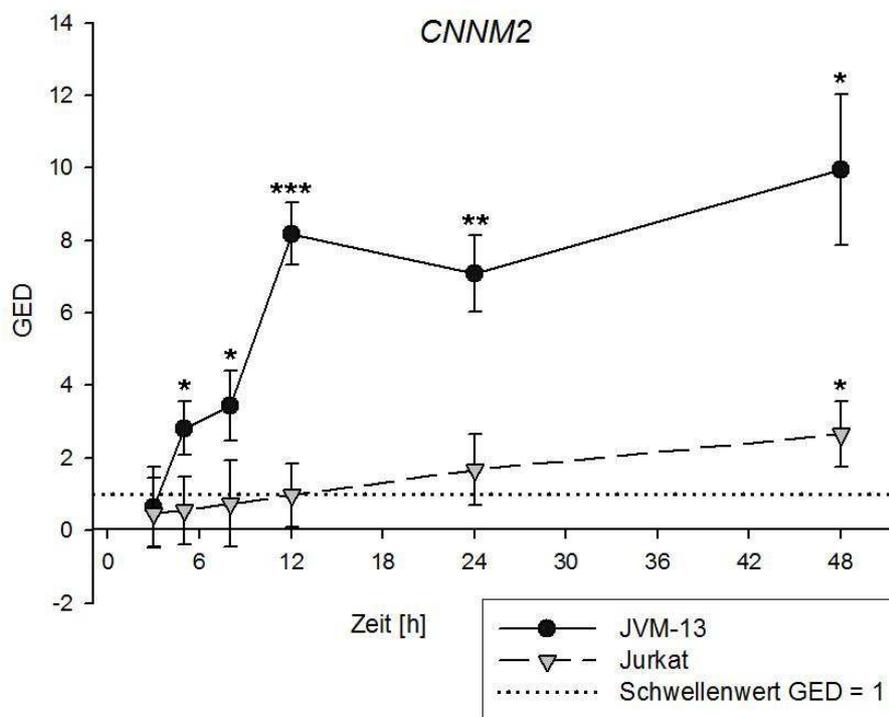


Abb.14 Expression des Gens *CNNM2* in Jurkat- und JVM-13-Zellen über eine Zeitdauer von 48 h in Mg-freiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD (n = 3) (* entspricht p < 0,05, ** entspricht p < 0,01, *** entspricht p < 0,001).

Tab.10 Übersicht über die in der Abbildung 14 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen *CNNM2* über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium

Zeitpunkt	JVM-13				Jurkat			
	GED	SD	n	p-Wert	GED	SD	n	p-Wert
3 h	0,637	1,101	3	0,419	0,478	0,966	3	0,553
5 h	2,815	0,740	3	0,011	0,560	0,935	3	0,483
8 h	3,445	0,965	3	0,011	0,731	1,191	3	0,434
12 h	8,175	0,853	3	0,001	0,974	0,866	3	0,234
24 h	7,082	1,054	3	0,002	1,672	0,980	3	0,088
48 h	9,938	2,084	3	0,015	2,654	0,900	3	0,020

4.1.1.5 Melastatin-Related Transient Receptor Potential Cation Channel (*TRPM7*)

Abbildung 15 zeigt den zeitlichen Verlauf der mRNA-Expression des Gens *TRPM7* in den Jurkat- und JVM-13-Zellen. Die JVM-13-Zellen reagierten auf den Magnesiummangel mit einem starken Anstieg der Expression des Gens *TRPM7* auf das 9-Fache des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 24 h. Dieser signifikant hohe GED-Wert wurde auch 24 h später noch berechnet. Bei den Jurkat-Zellen lag die Genexpression zum Zeitpunkt 48 h mit $GED = 1,6$ über dem Schwellenwert, war jedoch nicht signifikant erhöht. **Tabelle 11** zeigt die Einzelwerte der Genexpressionsbestimmung in beiden Zelllinien.

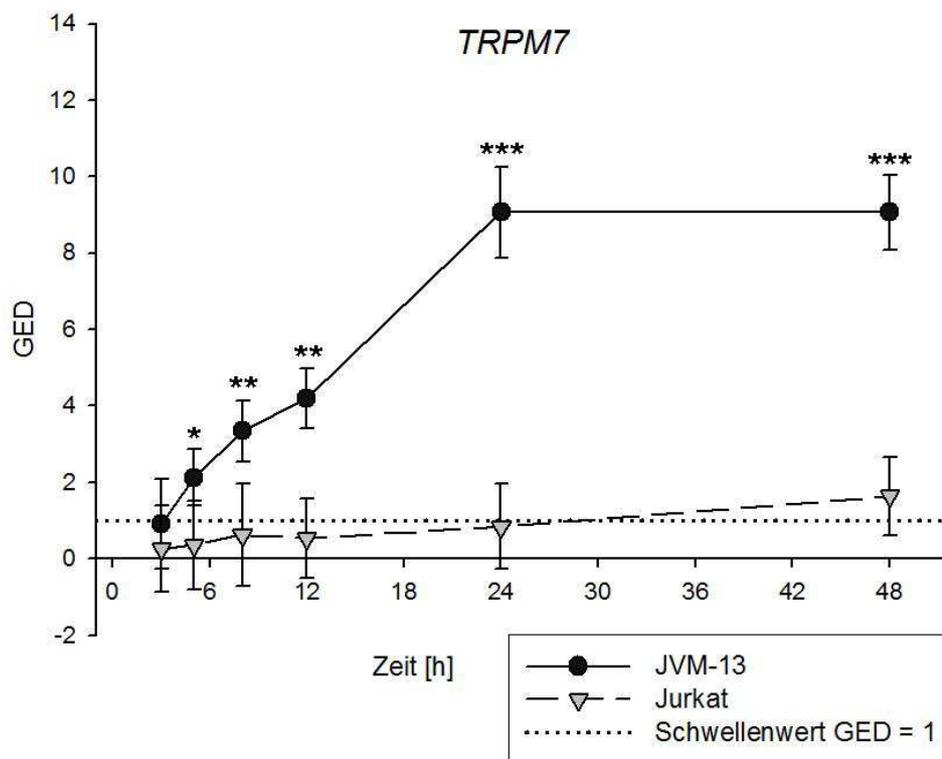


Abb.15 Expression des Gens *TRPM7* in Jurkat- und JVM-13-Zellen über eine Zeitdauer von 48 h in Mg-freiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD ($n = 3$) (* entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$).

Tab.11 Übersicht über die in der Abbildung 15 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen *TRPM7* über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium

Zeitpunkt	JVM-13				Jurkat			
	GED	SD	n	p-Wert	GED	SD	n	p-Wert
3 h	0,904	1,183	3	0,346	0,249	1,131	3	0,769
5 h	2,122	0,747	3	0,033	0,353	1,164	3	0,692
8 h	3,337	0,805	3	0,008	0,627	1,351	3	0,536
12 h	4,186	0,793	3	0,004	0,534	1,045	3	0,517
24 h	9,063	1,192	3	0,000	0,840	1,114	3	0,345
48 h	9,066	0,986	3	0,000	1,639	1,022	3	0,092

4.1.1.6 Magnesium Transporter Protein 1 (*MagT1*)

Abbildung 16 zeigt den zeitlichen Verlauf der mRNA-Expression des Gens *MagT1* in den Jurkat- und JVM-13-Zellen. In beiden Zelllinien wurde zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung der Expression gemessen. Lediglich in den JVM-13-Zellen erhöhte sich der GED-Wert ab dem Zeitpunkt 24 h auf das 2-Fache des Ausgangswerts, ebenfalls ohne Signifikanz. **Tabelle 12** zeigt die Einzelwerte der Genexpressionsbestimmung in beiden Zelllinien.

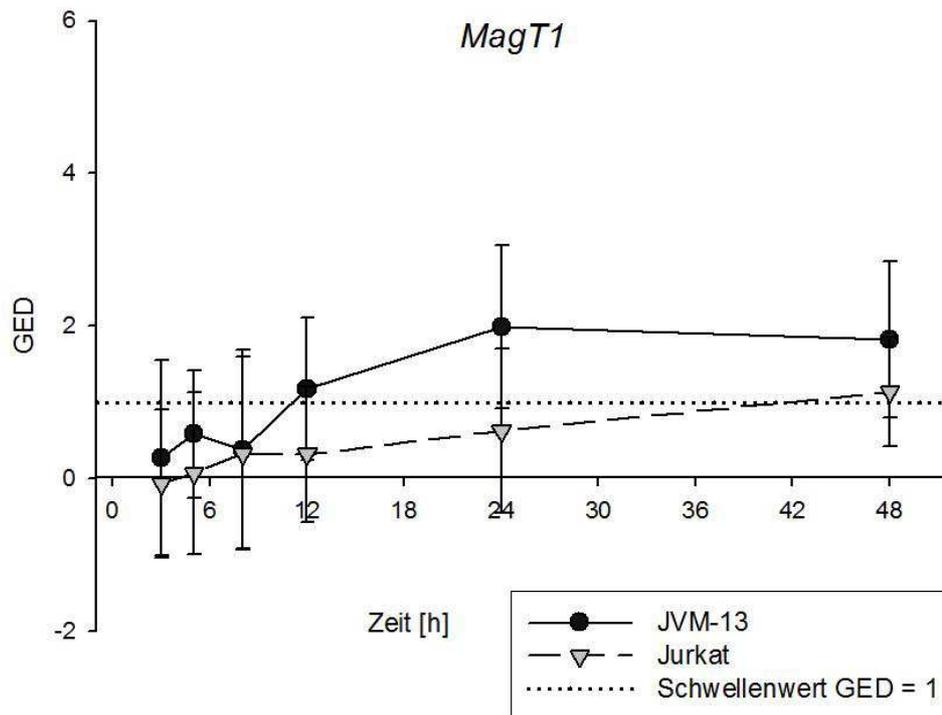


Abb.16 Expression des Gens *MagT1* in Jurkat und JVM-13-Zellen über eine Zeitdauer von 48 h in Mg-freiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD (n = 3).

Tab.12 Übersicht über die in der Abbildung 16 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen *MagT1* über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium

Zeitpunkt	JVM-13				Jurkat			
	GED	SD	n	p-Wert	GED	SD	n	p-Wert
3 h	0,269	1,276	3	0,768	-0,065	0,975	3	0,928
5 h	0,580	0,832	3	0,402	0,065	1,066	3	0,933
8 h	0,382	1,298	3	0,682	0,327	1,268	3	0,714
12 h	1,171	0,931	3	0,153	0,316	0,891	3	0,639
24 h	1,985	1,071	3	0,073	0,622	1,080	3	0,449
48 h	1,824	1,020	3	0,082	1,136	0,709	3	0,103

4.1.1.7 Non-Imprinted in Prader-Willi/ Angelman-Syndrom 1 (NIPA1)

Abbildung 17 zeigt den zeitlichen Verlauf der mRNA-Expression des Gens *NIPA1* in den Jurkat- und JVM-13-Zellen. Die JVM-13-Zellen zeigten eine deutliche Reaktion auf den Magnesiummangel. Die GED-Werte stiegen schnell auf das 2,5-Fache bis 3-Fache nach 5 h bzw. 8 h an. Zum Zeitpunkt 12 h erreicht der GED-Wert ein signifikant hohes Niveau und blieb im weiteren Verlauf in diesem Wertebereich. Die Expression in den Jurkat-Zellen war nur gering ausgeprägt und nur zum Zeitpunkt 48 h signifikant. Nach 8 h lag der GED-Wert nur gering über dem Schwellenwert, stieg jedoch kontinuierlich auf einen GED-Wert von 1,8 zum Zeitpunkt 48 h an. **Tabelle 13** zeigt die Einzelwerte der Genexpressionsbestimmung in beiden Zelllinien.

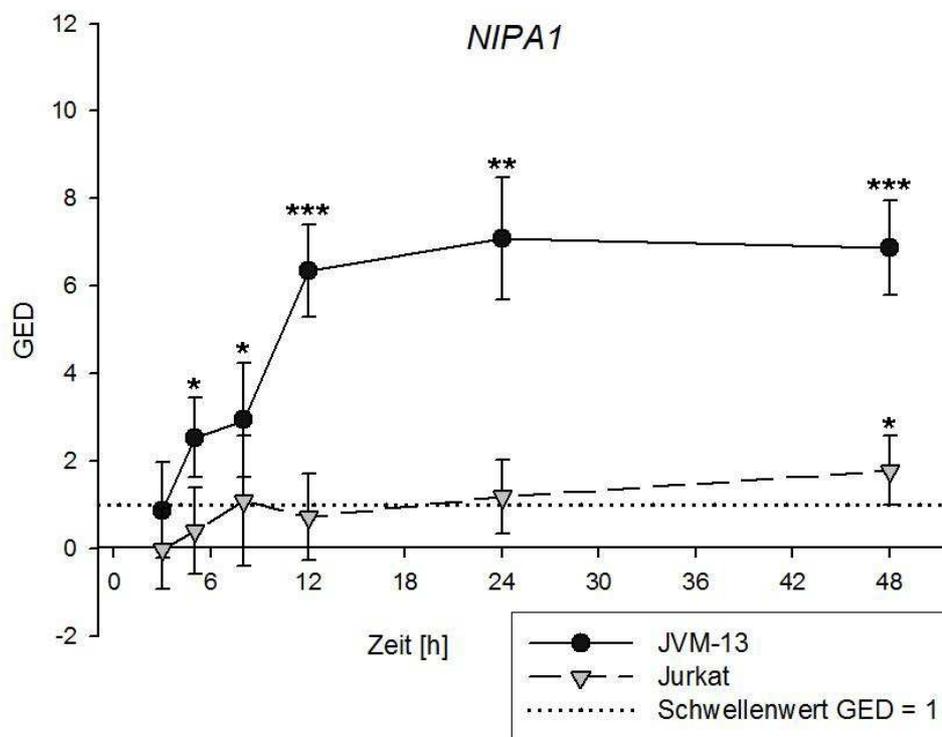


Abb.17 Expression des Gens *NIPA1* in Jurkat- und JVM-13-Zellen über eine Zeitdauer von 48 h in Mg-freiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD ($n = 3$) (* entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$).

Tab.13 Übersicht über die in der Abbildung 17 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen *NIPA1* über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium

Zeitpunkt	JVM-13				Jurkat			
	GED	SD	n	p-Wert	GED	SD	n	p-Wert
3 h	0,873	1,097	3	0,341	-0,017	0,922	3	0,981
5 h	2,534	0,907	3	0,025	0,405	0,982	3	0,592
8 h	2,933	1,304	3	0,048	1,087	1,482	3	0,334
12 h	6,346	1,058	3	0,001	0,726	0,993	3	0,359
24 h	7,075	1,395	3	0,005	1,180	0,839	3	0,135
48 h	6,879	1,086	3	0,001	1,775	0,790	3	0,044

4.1.1.8 Tumor Suppressor Candidate 3 (TUSC3, N33)

Abbildung 18 zeigt den zeitlichen Verlauf der mRNA-Expression des Gens *N33* in den Jurkat- und JVM-13-Zellen. Die Reaktion in den JVM-13-Zellen war auch hier stärker als in den Jurkat-Zellen. Deutlich erkennbar war der konstante Anstieg der GED-Werte auf 6,4 nach 48 h. Die Standardabweichung der GED-Werte war mit über 2,00 in den JVM-13-Zellen sehr hoch. In den Jurkat-Zellen war zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der Expression ermittelbar. **Tabelle 14** zeigt die Einzelwerte der Genexpressionsbestimmung in beiden Zelllinien.

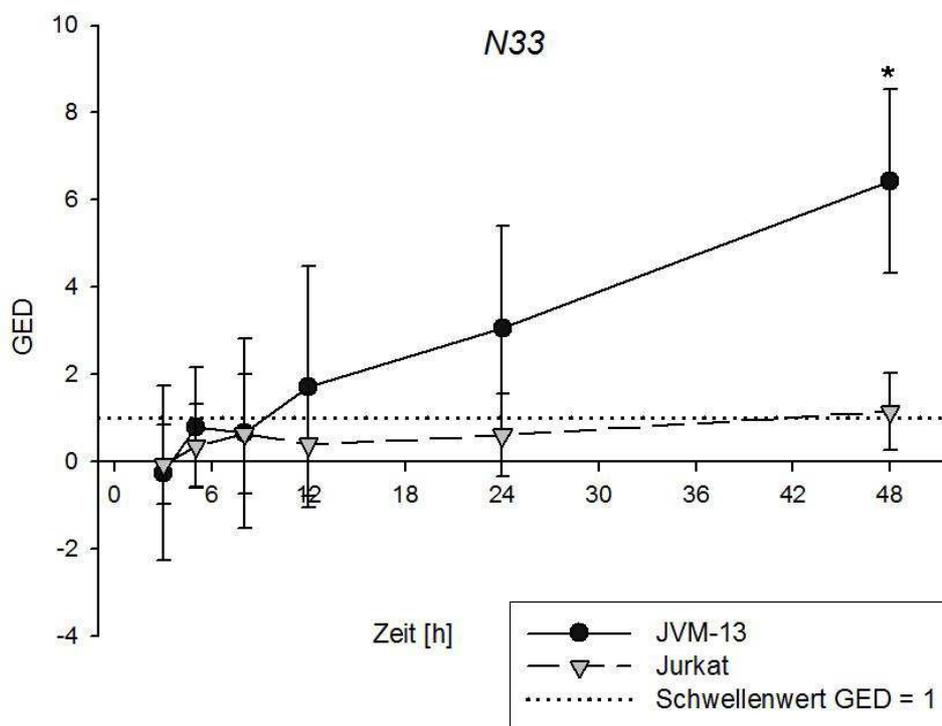


Abb.18 Expression des Gens *N33* in Jurkat- und JVM-13-Zellen über eine Zeitdauer von 48 h in Mg-freiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD ($n = 3$) (* entspricht $p < 0,05$).

Tab.14 Übersicht über die in der Abbildung 18 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen *N33* über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium

Zeitpunkt	JVM-13				Jurkat			
	GED	SD	n	p-Wert	GED	SD	n	p-Wert
3 h	-0,257	1,997	3	0,874	-0,068	0,917	3	0,925
5 h	0,791	1,373	3	0,565	0,349	0,963	3	0,645
8 h	0,657	2,178	3	0,702	0,641	1,374	3	0,529
12 h	1,721	2,765	3	0,427	0,397	1,182	3	0,656
24 h	3,055	2,343	3	0,142	0,607	0,938	3	0,429
48 h	6,428	2,104	3	0,015	1,149	0,891	3	0,162

4.2 STUDIE AN *DIABETES-MELLITUS*-PATIENTEN (IN VIVO)

Die Patientenstudie gliedert sich in zwei Phasen. In der ersten Phase der Studie wurden 115 *Diabetes-mellitus-Typ-II-Patienten* Blut entnommen. Es erfolgte die Bestimmung der Mg-Konzentration im Plasma mittels Flammenabsorptionsspektrometrie. Anhand dieser Methode wurde der Gesamt-Mg-Gehalt des Plasmas bestimmt ($[Mg]_{\text{Plasma}}$). Weiterhin wurde die intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration der Leukozyten ($[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$) mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Mag-Fura-2 gemessen. Hierbei wurde der Gehalt an freiem, ionisiertem Mg^{2+} ermittelt. Von einem Teil der separierten Leukozyten erfolgten die Isolierung der RNA und die Bestimmung der Expression Mg-sensitiver Gene. Wie schon im In-vitro-Zellversuch wurde die Expression folgender Gene in den isolierten Leukozyten ermittelt: *SLC41A1*, *SLC41A2*, *SLC41A3*, *CNNM2*, *TRPM6*, *TRPM7*, *N33*, *NIPA1* und *MagT1*. Dabei zeigte sich in Voruntersuchungen, dass *CNNM2* wie auch schon im Zellversuch eines der Mg-sensitivsten Gene war (Daten nicht gezeigt). In dieser Arbeit wurde entsprechend nur die Expression des Gens *CNNM2* untersucht. Die hier vorgelegten Resultate aus Phase 1 und 2 der *Diabetes-mellitus*-Studie betrachten somit die drei Messgrößen $[Mg]_{\text{Plasma}}$, $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ und die Expression des Gens *CNNM2* und klären die Frage nach einer Korrelation untereinander. In Phase 2 der Patientenstudie erfolgte eine Mg-Supplementierung ausgewählter Patienten aus Phase 1. Auswahlkriterien waren eine Überexpression des Gens *CNNM2* und ein $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Wert $\leq 0,55$ mmol/l in Phase 1 der Studie. Der Fokus in der zweiten Phase lag auf einer zu erwartenden Veränderung der drei Messgrößen nach 30-tägiger erhöhter Mg-Zufuhr, insbesondere auf einer Normalisierung der Messgrößen $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ und der Expressionrate des Gens *CNNM2*.

RNA-Integrität

Die isolierten RNA-Proben waren von hoher bis sehr hoher Qualität. Im Mittel wurde eine RIN von $8,5 \pm 0,9$ ($\bar{x} \pm SD$) mit einer Spanne von 6,8 bis 10 mit Hilfe des Lab-on a-Chip-Verfahren der Fa. Agilent Technologies gemessen.

Quantitativer Nachweis der GOIs

Vor der quantitativen Untersuchung der ausgewählten Gene war zu klären, ob die isolierten Leukozyten diese exprimieren. Dazu wurde eine konventionelle PCR durchgeführt und das Produkt dann im Agarosegel nachgewiesen (**Abb. 19**). Die Leukozyten exprimierten die Zielgene *SLC41A1*, *SLC41A2*, *SLC41A3*, *CNNM2*, *TRPM6*, *TRPM7*, *N33*, *NIPA1*, *MagT1* und das HKG *TUBA1B*.

Weiterhin zeigte die Auftrennung jeweils nur eine Bande pro Gen. Diese Tatsache und die korrekte Amplikongröße wurden als hinreichende Kriterien für die Spezifität der verwendeten Primer angesehen.

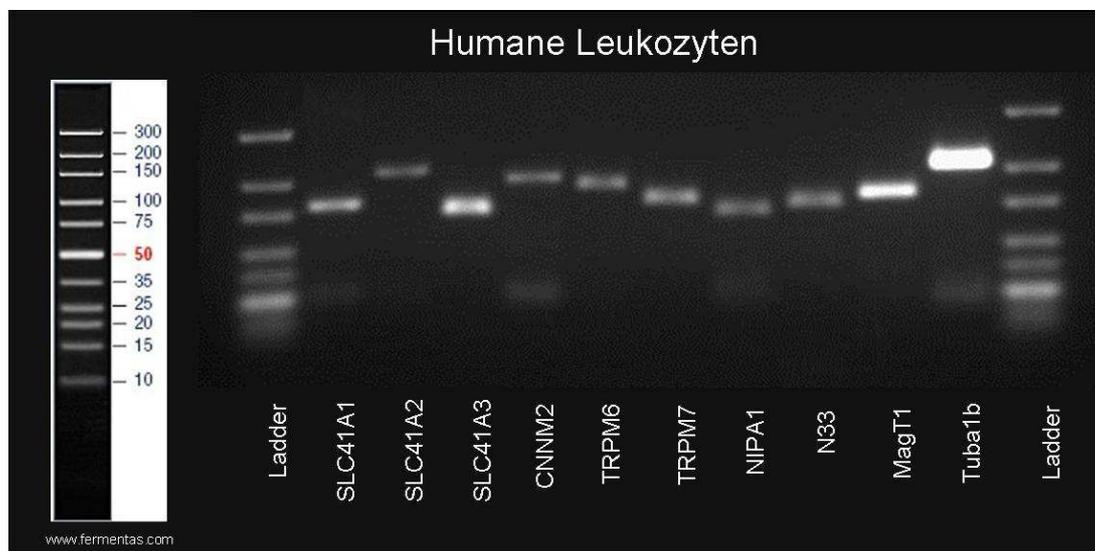


Abb.19 Ethidiumbromid-Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte aller ausgewählten Gene in humanen Leukozyten isoliert aus *Diabetes-mellitus*-Patienten (Größenstandard: GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder, Fa. Fermentas)

4.2.1 Phase 1 – Zusammenhang zwischen der *CNNM2*-Expression und dem Magnesiumstatus

4.2.1.1 Magnesiummessungen im Blut

Plasmamagnesium

Die Plasma-Mg-Konzentrationen der einzelnen Patienten sind in **Abbildung 20** dargestellt. Eine Plasma-Mg-Konzentration unterhalb der Referenzgrenze ($< 0,75$ mmol/l) wurde nur bei einem der 115 Patienten gemessen. Die mittlere Plasma-Mg-Konzentration der 115 *Diabetes-mellitus*-Typ-II-Patienten lag bei $0,94 \pm 0,01$ mmol/l ($\bar{x} \pm SD$) mit einer Spanne von 0,72 bis 1,12 mmol/l. Die obere Referenzgrenze liegt aufgrund variierender Angaben in der Literatur zwischen 0,9 und 1,2 mmol/l und ist in Abb. 20 grau gestreift unterlegt (siehe auch Kapitel 2.4.1).

Intrazelluläre Magnesiumkonzentration

Die Verteilung der intrazellulären Mg-Konzentrationen bei 115 Probanden ist in **Abbildung 21** dargestellt. Die intrazellulären Mg-Werte hatten eine viel höhere Variabilität als die Plasma-Mg-Werte. Sie reichten von 0,32 bis 1,09 mmol/l. Der Mittelwert betrug $0,68 \pm 0,17$ mmol/l ($\bar{x} \pm SD$).

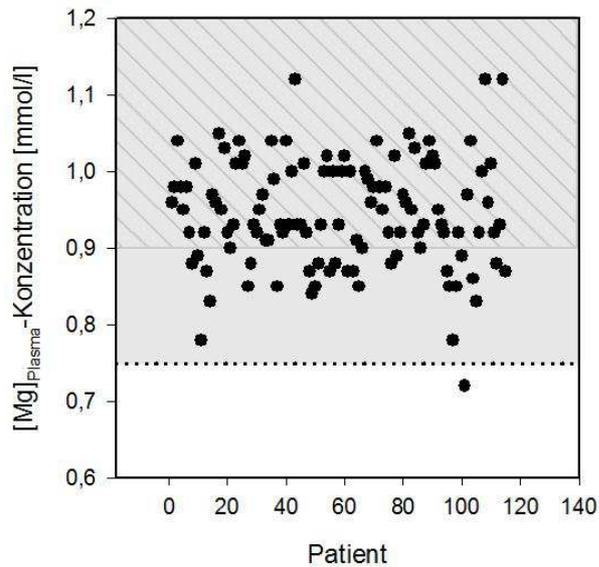


Abb.20 Plasma-Mg-Konzentration gemessen in Blutproben von 115 Probanden in Phase 1 der Studie. Der Referenzbereich wurde grau bzw. grau gestreift unterlegt. Die gestrichelte Linie markiert den unteren Referenzbereich für die $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Konzentration (0,75 mmol/l).

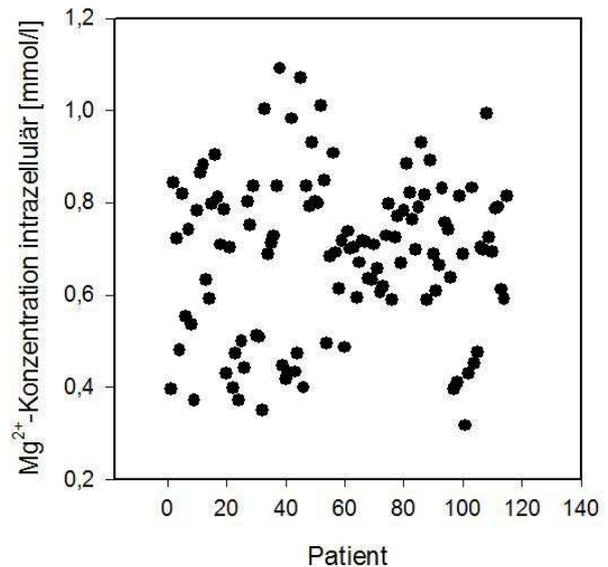


Abb.21 Intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration gemessen in Blutproben von 115 Probanden in Phase 1 der Studie.

4.2.1.2 Genexpressionsanalyse von CNNM2

Abbildung 22 zeigt die GED-Werte des Gens *CNNM2* aller 115 Diabetes-Patienten kalibriert gegen eine Misch-RNA von 15 gesunden Probanden. Bei 27 von 115 Patienten wurde eine $GED \geq 1$ ermittelt (Referenzlinie).

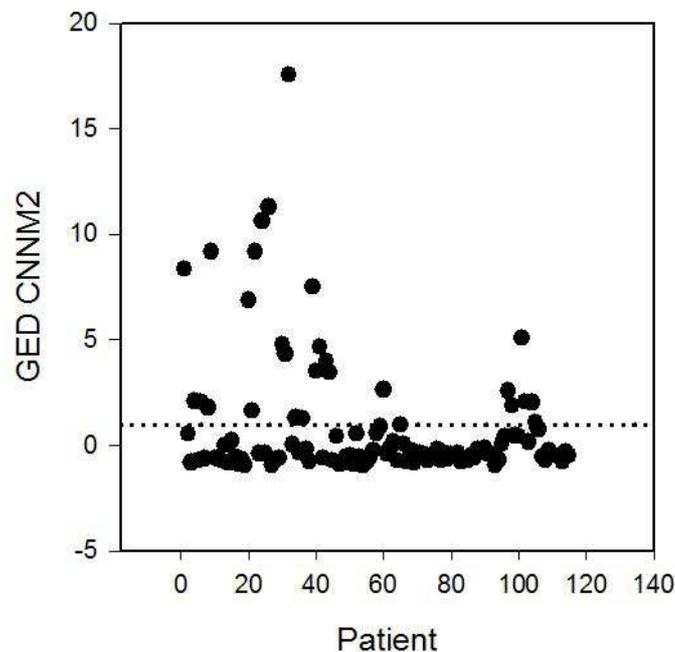


Abb.22 Expressionswerte des Gens *CNNM2* für 115 Patienten in Phase 1 der Studie. Schwellenwert $GED = 1$ (gestrichelte Linie)

Weiterhin wurde die Expression des Gens *CNNM2* bei 115 *Diabetes-mellitus*-Patienten mit den Plasma- und intrazellulären Magnesiumwerten in Beziehung gesetzt. **Abbildung 23** veranschaulicht den Zusammenhang der Plasma-Mg-Konzentration mit den ermittelten GED-Werten. Beide Parameter variierten sehr stark und es war keine Korrelation erkennbar ($r = 0,05$). Die horizontale Linie verdeutlicht den Schwellenwert $GED = 1$ und die vertikale Linie den unteren Referenzwert für die Mg-Konzentration im Plasma (0,75 mmol/l).

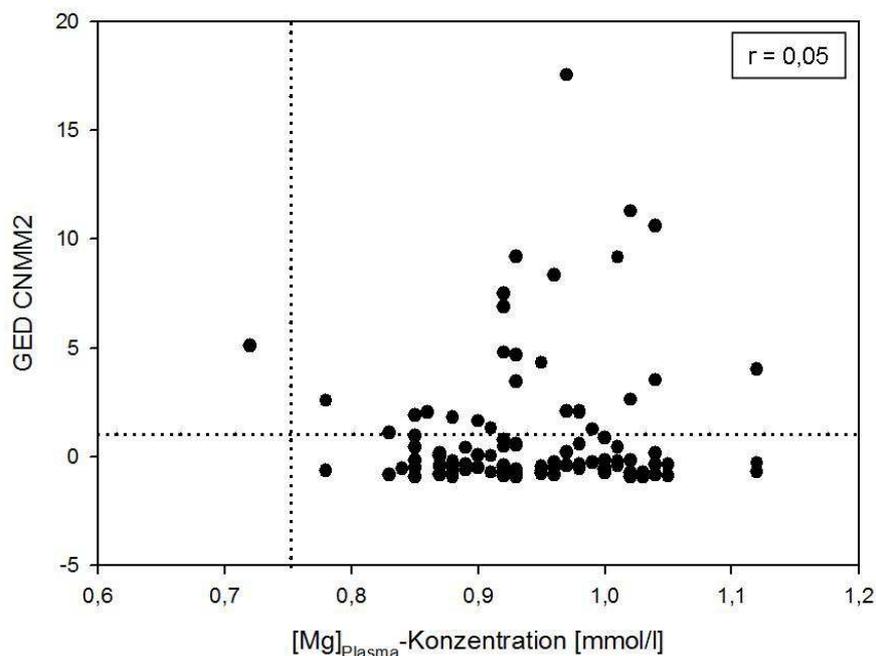


Abb.23 Plasma-Mg-Konzentration mit korrespondierenden Expressionswerten des Gens *CNNM2* aller Probanden in Phase 1 der Studie. Schwellenwert GED = 1 (horizontale, gestrichelte Linie), unterer Referenzwert für die $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Konzentration (0,75 mmol/l) (vertikale, gestrichelte Linie)

Im Gegensatz zu den Plasma-Mg-Werten korrelierten die intrazellulären Mg-Werte relativ deutlich mit der Expression des Gens *CNNM2* ($r = -0,65$) (**Abb. 24**). Es ergab sich folgender Zusammenhang: Die Expression von *CNNM2* stieg mit sinkender $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Konzentration an. In der Literatur werden für den intrazellulären Mg-Gehalt Werte zwischen 0,5 mmol/l - 1,0 mmol/l angegeben (siehe Kapitel 2.4.1). In den eigenen Untersuchungen hatten 27 von 115 Patienten einen $GED \geq 1$. Von diesen 27 Patienten wurden bei 24 Patienten ein intrazellulärer Mg-Wert $\leq 0,55$ mmol/l gemessen. Nur drei Probanden mit einer leicht erhöhten Expression von *CNNM2* lagen oberhalb von 0,55 mmol/l (GED-Wert/ $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Wert: 1,64 / 0,70 mmol/l; 1,31 / 0,69 mmol/l; 1,26 / 0,73 mmol/l)

Entsprechend dieser Ergebnisse wurde für alle weiteren Betrachtungen der untere Referenzwert für die $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Konzentration auf 0,55 mmol/l festgelegt (siehe **Abb. 24**). Dieser Grenzwert orientiert sich gleichzeitig auch an Angaben aus der Literatur (siehe Kapitel 2.4.1) und ermöglicht bzw. vereinfacht vergleichende Betrachtungen der Methoden zur Bestimmung des Mg-Status.

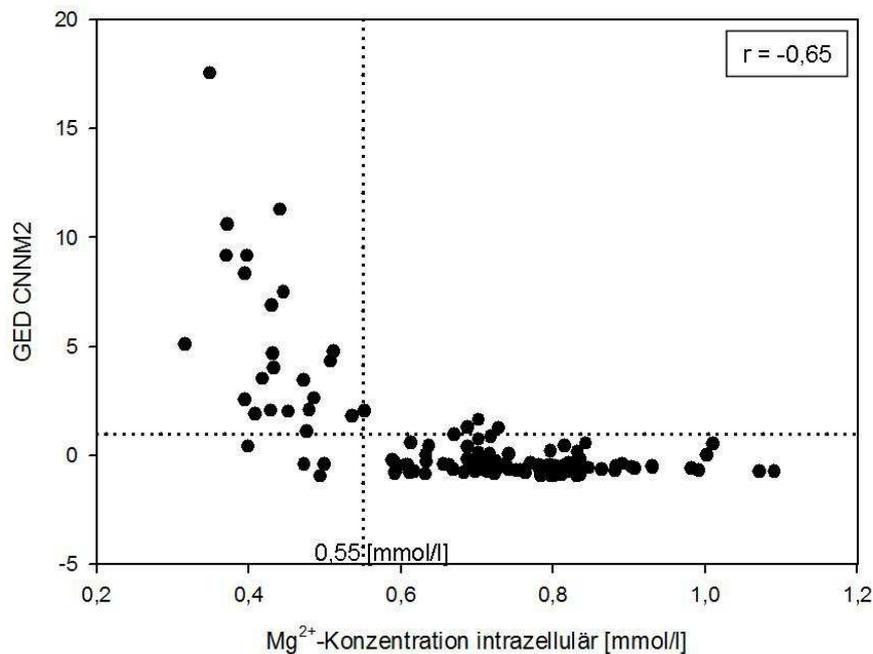


Abb.24 Intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration mit korrespondierenden Expressionswerten des Gens *CNM2* aller Probanden in Phase 1 der Studie. Schwellenwert $GED = 1$ (horizontale, gestrichelte Linie), unterer Referenzwert für die $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Konzentration (0,55 mmol/l) (vertikale, gestrichelte Linie)

Betrachtet man nun aufgrund der Daten und den Angaben in der Literatur den Wert von 0,55 mmol/l für die intrazelluläre Magnesiumkonzentration als den unteren Referenzwert, lässt sich die Abbildung 21 folgendermaßen ergänzen (**Abb. 25**):

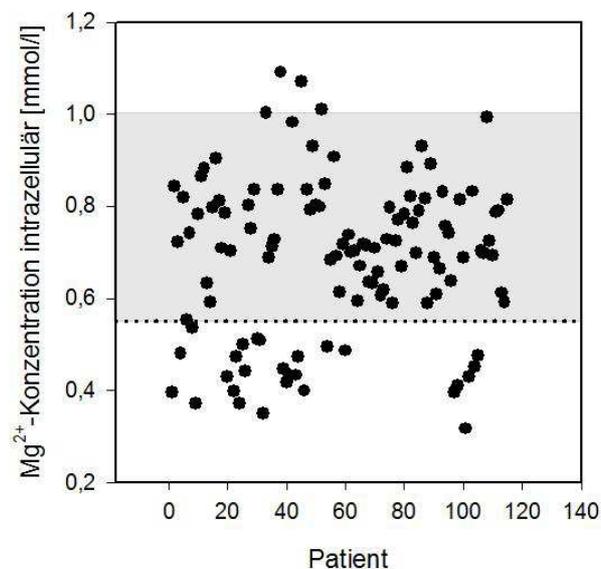


Abb.25 Intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration gemessen in Blutproben von 115 Probanden in Phase 1 der Studie. Der Referenzbereich ist grau unterlegt. Unterer Referenzwert für die $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Konzentration (0,55 mmol/l) (horizontale, gestrichelte Linie)

Abbildung 25 zeigt, dass knapp ein Viertel der Patienten (24,3 %, 28 Patienten) einen $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Wert unterhalb des Referenzbereichs aufweisen. 84 Probanden liegen innerhalb des Normbereichs von 0,55 mmol/l bis 1,0 mmol/l und bei drei Probanden wurde ein $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Wert leicht oberhalb des Referenzbereichs gemessen.

Nachfolgend sollten die Fragen geklärt werden, mit welcher Messmethode Patienten mit einem Mg-Mangel am sensitivsten erkannt werden. Noch viel wichtiger war die Frage nach dem Nichterkennen eines Mg-Defizits. Die zu vergleichenden Methoden sind zum einen die Messung von Gesamtmagnesium im Plasma zum anderen die Bestimmung der Expression des Gens *CNNM2*. Als entscheidendes Kriterium für einen vorliegenden Mg-Mangel dient der intrazelluläre Mg^{2+} -Wert, d. h. ein $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Wert $\leq 0,55$ mmol/l entspricht einem Mg-Defizit. Die 115 getesteten Patienten wurden sowohl anhand ihrer $[Mg]_{Plasma}$ -Konzentration ($< 0,75$ mmol/l und $\geq 0,75$ mmol/l), als auch anhand des GED-Werts (GED < 1 und GED ≥ 1) in zwei Gruppen unterteilt. Nun wurde ermittelt, wie viele Patienten jeweils als positiv ($[Mg^{2+}]_{intra}$ -Wert $\leq 0,55$ mmol/l), als negativ ($[Mg^{2+}]_{intra}$ -Wert $> 0,55$ mmol/l), als falsch positiv und falsch negativ eingestuft wurden (**Tab. 15**).

Folgendes ergab sich für die Bestimmung der Expression des Gens *CNNM2*:

- Von 27 positiv eingestuften Patienten sind 24 richtig positiv und 3 falsch positiv.
- Von 88 negativ eingestuften Patienten sind 84 richtig negativ und 4 falsch negativ.

Für die Plasmabestimmung ergab sich:

- Der eine als positiv eingestufte Patient ist positiv. Daraus folgt: es gibt keinen als falsch positiv eingestuften Patienten.
- Von 114 negativ eingestuften Patienten sind 87 richtig negativ und 27 falsch negativ.

Unter den obigen Einstufungsvoraussetzungen errechnet sich eine Genauigkeit der Analysemethode für die GED-Methode von 88,9 % Positivgenauigkeit (24/27) und eine Negativgenauigkeit von 95,5 % (84/87). Für die Methode der Plasmamessung errechnet sich eine Positivgenauigkeit von 100 % (1/1) und eine Negativgenauigkeit von 76,3 % (87/114).

Anders ausgedrückt: ist der GED-Wert größer als 1, dann liegt zu 88,9 % eine $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Konzentration unter 0,55 mmol/l vor. Ist der GED-Wert kleiner als 1, dann liegt zu 95,5 % eine $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Konzentration über 0,55 mmol/l vor. Analog dazu lässt sich für die Gesamt-Mg-Bestimmung im Plasma folgendes ausdrücken: Ist der Mg-Wert im Plasma kleiner als 0,75 mmol/l, dann liegt zu 100 % eine $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Konzentration unter 0,55 mmol/l vor. Ist der Mg-Wert im Plasma hingegen über 0,75 mmol/l, dann liegt zu 76 % eine $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Konzentration über 0,55 mmol/l vor.

Analyse- methode	GED ≥ 1		GED < 1		[Mg] _{Plasma} $< 0,75$ mmol/l		[Mg] _{Plasma} $\geq 0,75$ mmol/l	
	positiv		negativ		positiv		negativ	
Anzahl n	27		88		1		114	
Kriterium [Mg ²⁺] _{intra}	[Mg ²⁺] _{intra} \leq 0,55 mmol/l	[Mg ²⁺] _{intra} $>$ 0,55 mmol/l	[Mg ²⁺] _{intra} $>$ 0,55 mmol/l	[Mg ²⁺] _{intra} \leq 0,55 mmol/l	[Mg ²⁺] _{intra} \leq 0,55 mmol/l	[Mg ²⁺] _{intra} $>$ 0,55 mmol/l	[Mg ²⁺] _{intra} $>$ 0,55 mmol/l	[Mg ²⁺] _{intra} \leq 0,55 mmol/l
	positiv	falsch positiv	negativ	falsch negativ	positiv	falsch positiv	negativ	falsch negativ
Anzahl n	24	3	84	4	1	0	87	27
Genauigkeit (%)	88,9	11,1	95,5	4,5	100	0	76,3	23,7
	Positiv- genauigkeit		Negativ- genauigkeit		Positiv- genauigkeit		Negativ- genauigkeit	

Tab.15 Gruppierung der 115 Patienten anhand der Kriterien GED-Wert, [Mg]_{Plasma}-Wert und [Mg²⁺]_{intra}-Wert in richtig oder falsch positiv bzw. negativ getestet, mit Angabe der Analysegenauigkeit basierend auf dem [Mg²⁺]_{intra}-Wert

In einer zusammenfassenden Betrachtung der Resultate der Phase 1 der Patientenstudie erscheint der GED-Wert des Gens *CNNM2* als ein sensibles Kriterium zur Feststellung eines Magnesiummangels. Er korreliert im Gegensatz zur Plasma-Mg-Konzentration (**Abb. 23 und 26**) deutlich mit der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration (siehe **Abb. 24**).

Beim Vergleich beider Methoden zur Bestimmung des Mg-Status wurden anhand des GED-Werts nur 4 von 28 Patienten mit einem Mg-Defizit nicht erkannt. Dagegen blieben bei der Plasma-Mg-Bestimmung nahezu alle Patienten mit Mg-Defizit unentdeckt. Dieses Verhältnis der im Normbereich liegenden $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Werte zu den korrespondierenden niedrigen $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Werten ($\leq 0,55$ mmol/l) desselben Patienten veranschaulicht **Abbildung 26**. Von 28 Mg-defizienten Patienten wurde nur bei einem eine $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Konzentration unterhalb 0,75 mmol/l gemessen.

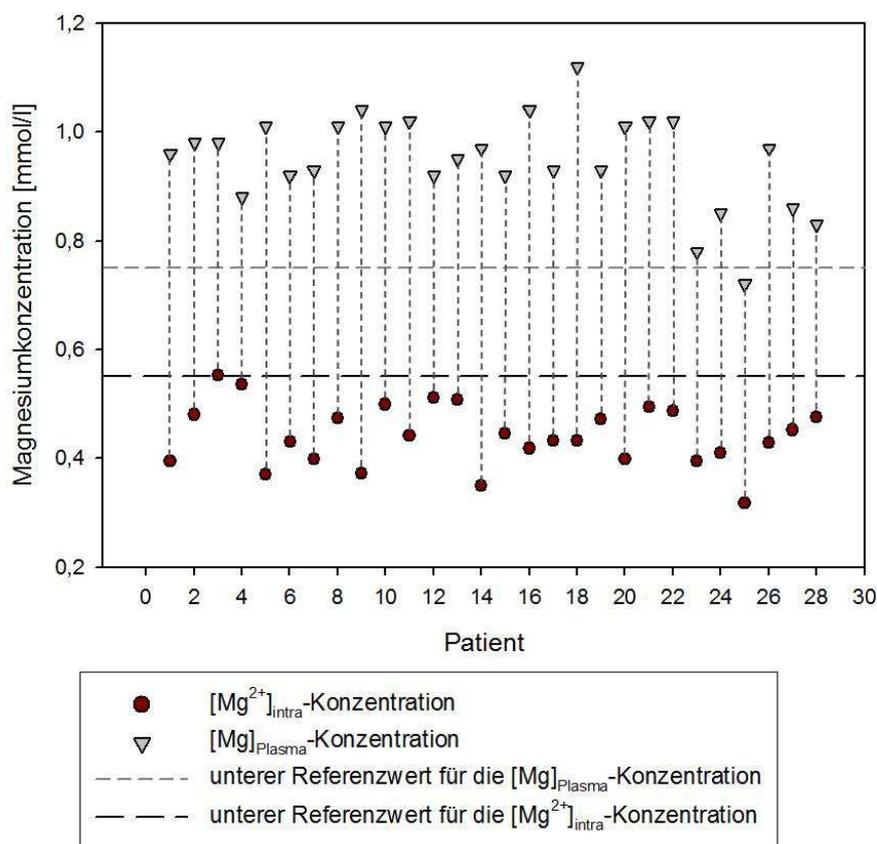


Abb.26 $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Konzentration und korrespondierende $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Konzentration von 28 ausgewählten Probanden in Phase 1 der Studie mit Angabe des jeweiligen unteren Referenzwerts für die $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Konzentration (0,75 mmol/l) und die $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Konzentration (0,55 mmol/l)

4.2.2 Phase 2 – Einfluss einer Mg-Supplementierung auf die *CNNM2*-Expression und den Magnesiumstatus

Das Ziel der Supplementierungsstudie war es, die Veränderungen der drei Parameter $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Konzentration, $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Konzentration und Expression des Gens *CNNM2* nach einer 30-tägigen erhöhten Mg-Zufuhr zu beschreiben. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Mg-Supplementierung über diesen Zeitraum die intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration anhebt und die Überexpression des Gens *CNNM2* normalisiert. Die Auswahlkriterien für den Einschluss in die Phase 2 der Studie waren ein $GED \geq 2$ für das Gen *CNNM2* und ein $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Wert $\leq 0,55$ mmol/l. Insgesamt erhielten 19 Probanden täglich 300 mg Magnesiumcitrat oral über einen Zeitraum von 30 Tagen zusätzlich zur gewohnten Nahrung. Die Probennahme erfolgte zu Beginn und am Tag 30 der Supplementierung.

4.2.2.1 Blutuntersuchung

Abbildung 27 zeigt die $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Konzentration der 19 Probanden zu Beginn der Supplementierung am Tag 0 und 30 Tage später. Die Mittelwerte sind durch eine horizontale Linie markiert. Die mittlere Plasma-Mg-Konzentration der 19 *Diabetes-mellitus*-Typ-II-Patienten lag am Tag 0 bei $0,94 \pm 0,08$ mmol/l ($\bar{x} \pm SD$) mit einer Spanne von 0,72 bis 1,09 mmol/l. Bis auf einen Wert lagen alle Werte im Normbereich.

Am Tag 30 betrug der Mittelwert unverändert $0,94 \pm 0,07$ mmol/l ($\bar{x} \pm SD$) mit einer Spanne von 0,78 bis 1,03 mmol/l. Die durchschnittliche Plasma-Mg-Konzentration der Probanden ändert sich durch die Mg-Supplementierung nicht.

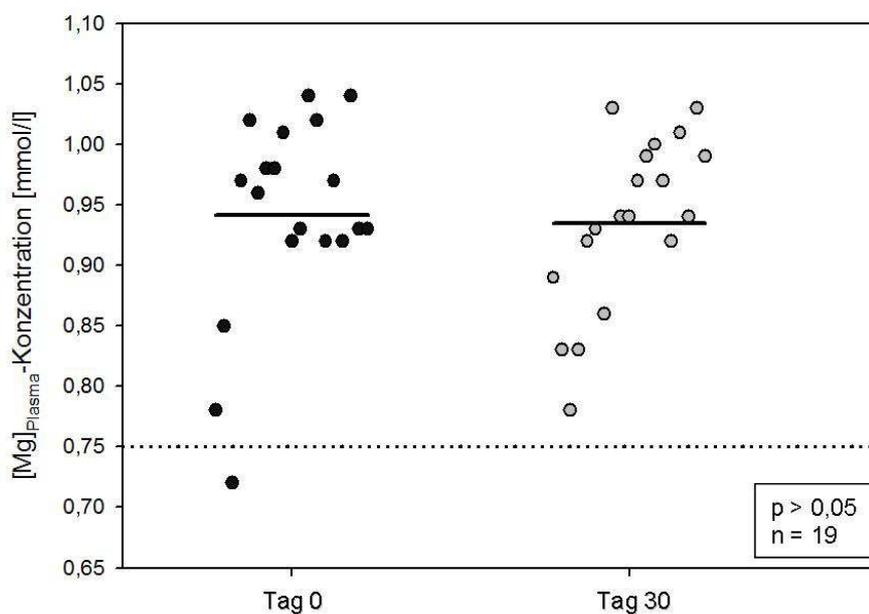


Abb.27 $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Konzentration der 19 in den Supplementierungsversuch eingeschlossenen Probanden an den Tagen 0 und 30 mit Angabe des jeweiligen Mittelwertes (durchgezogene, horizontale Linie) und des unteren Referenzwertes (0,75 mmol/l) (gepunktete, horizontale Linie). $p = \text{Signifikanzwert } 0 \text{ vs. } 30 \text{ Tage}$

Die intrazellulären Mg-Werte vor und nach Supplementierung sind in **Abbildung 28** dargestellt. Zu Beginn der Mg-Supplementierung wurden bei 18 von 19 Probanden ein intrazellulärer Mg-Gehalt unterhalb 0,55 mmol/l gemessen. Ein Proband lag mit einer Konzentration von 0,552 mmol/l nur knapp oberhalb des unteren Referenzwertes. Die einzelnen Werte am Tag 0 lagen zwischen 0,35 mmol/l und 0,55 mmol/l. Der Mittelwert betrug $0,43 \pm 0,06$ mmol/l ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

Am Tag 30 wurden bei 18 von 19 Probanden $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Werte oberhalb des Referenzwertes gemessen. Sie reichten von 0,54 mmol/l bis 0,77 mmol/l. Nur ein Proband hatte eine $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Wert von 0,54 mmol/l. Der Mittelwert betrug $0,61 \pm 0,06$ mmol/l ($\bar{x} \pm \text{SD}$). Die durchschnittliche $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Konzentration erhöhte sich durch die Mg-Supplementierung signifikant um 0,18 mmol/l.

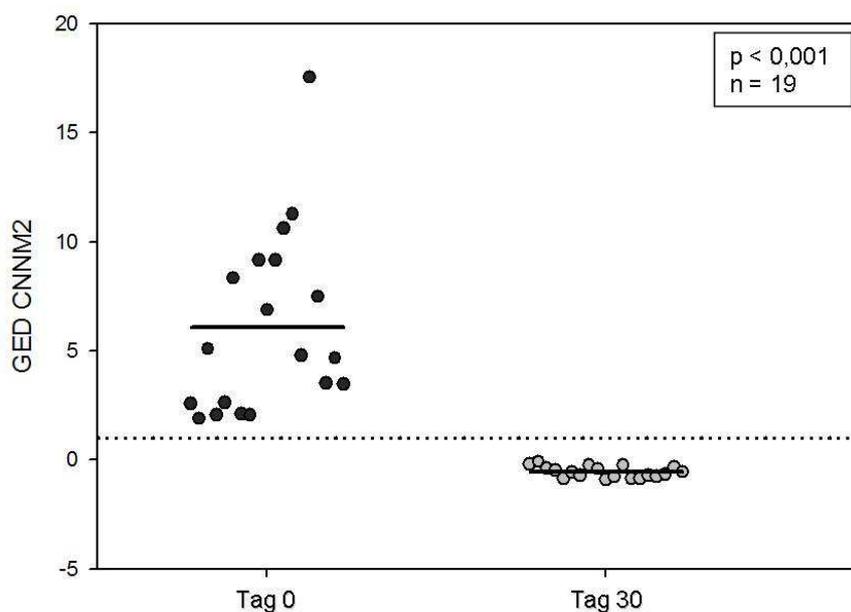


Abb.29 Expression des Gens *CNNM2* der 19 in den Supplementierungsversuch eingeschlossenen Probanden an den Tagen 0 und 30 mit Angabe der jeweiligen Mittelwerte (durchgezogene, horizontale Linie) und des Schwellenwerts $GED = 1$ (gepunktete, horizontale Linie) $p =$ Signifikanzwert 0 vs. 30 Tage

4.3 VALIDIERUNG UND OPTIMIERUNG DES HOUSEKEEPING-GENS

4.3.1 Allgemeines zum Optimierungsverfahren

Aus den Ergebnissen beider Phasen der Patientenstudie ging hervor, dass die Bestimmung der Expression des Gens *CNNM2* den intrazellulären Mg^{2+} -Status als ein zuverlässiges Maß für die Versorgung des Körpers mit dem Mikronährstoff Magnesium genauer widerspiegelt als der Plasma-Mg-Wert. Dieser wird lange Zeit konstant gehalten, obwohl bereits ein deutliches intrazelluläres Defizit vorhanden sein kann. Entsprechend stellt die Expressionsmessung des Gens *CNNM2* eine potentielle Meßmethode zur zuverlässigen Erkennung eines intrazellulären Magnesiummangels dar. Aus diesem Grund sollte die Methode für eine Anwendung in der Praxis weiter optimiert werden.

Im Rahmen der Optimierung des PCR-Assays für weiterführende Untersuchungen wurden anhand der MIQE-Richtlinien das in den Versuchen verwendete HKG *Tubulin alpha 1b* auf seine Eignung überprüft. Sowohl für die Jurkat- und JVM-13-Zellen, als auch für die humanen Leukozyten von *Diabetes-mellitus*-Patienten wurde die Stabilität des HKGs *TUBA1B* gemessen. Für die Patienten-Studie wurde weiterhin geprüft, ob durch andere

HKGs eine bessere diagnostische *CNNM2*-Bestimmung möglich wäre und die optimale Anzahl an HKGs ermittelt. Zur Auswertung wurde die Analysesoftware „geNorm“ verwendet. Vor der Bestimmung der Genstabilität und optimalen Anzahl war zu klären, ob die Zellen (Jurkat, JVM-13, Leukozyten) die ausgewählten potentiellen HKGs exprimieren bzw. die Primer spezifisch sind. Dazu wurde eine konventionelle PCR durchgeführt und das Produkt bei zehn von elf potentiellen HKGs im Agarosegel eindeutig nachgewiesen. **Abbildung 30** zeigt exemplarisch das Ergebnis für die humanen Leukozyten. Das Gen *RP II* konnte in keinem Fall nachgewiesen werden und wurde aus den folgenden Untersuchungen ausgeschlossen. Das Primerpaar wurde für einen Taq-Man-Assay designed und funktionierte nicht in einem SybrGreen-Assay. Weiterhin zeigt die Auftrennung bei neun HKGs nur eine Bande pro Gen mit der korrekten Amplikongröße. Das wurde als hinreichendes Kriterium für die Spezifität der verwendeten Primer angesehen. Nur bei *UBC* war eine zweite, sehr schwache Bande erkennbar. Das Gen *UBC* wurde entsprechend von den weiteren Betrachtungen ebenfalls ausgeschlossen.

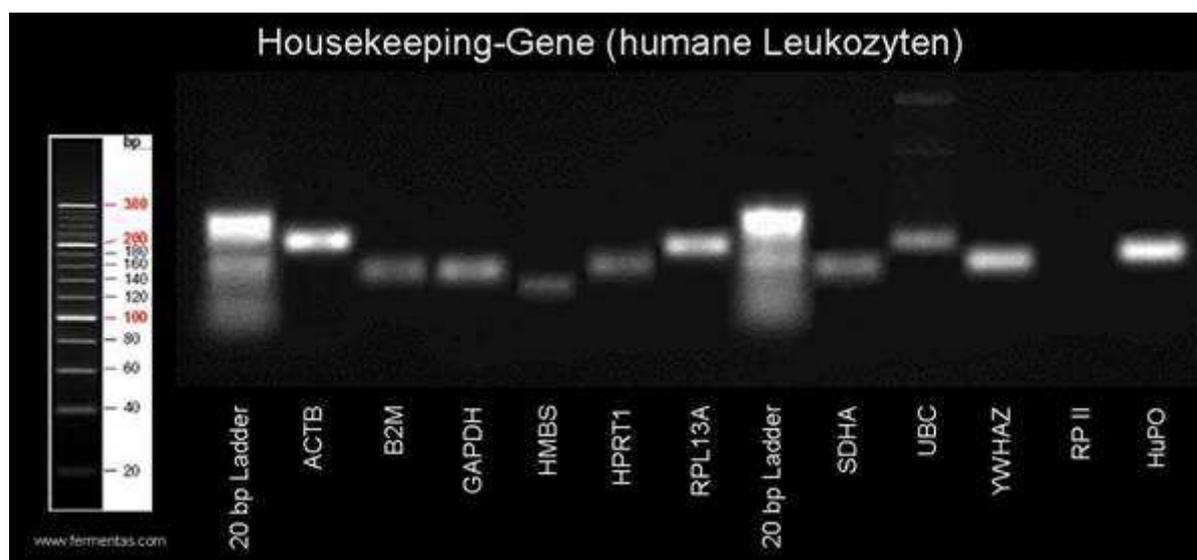


Abb.30 Ethidiumbromid-Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte der ausgewählten Housekeeping Gene in humanen Leukozyten isoliert aus *Diabetes-mellitus*-Patienten (Größenstandard: O'RangeRuler™ 20 bp DNA Ladder Fa. Fermentas)

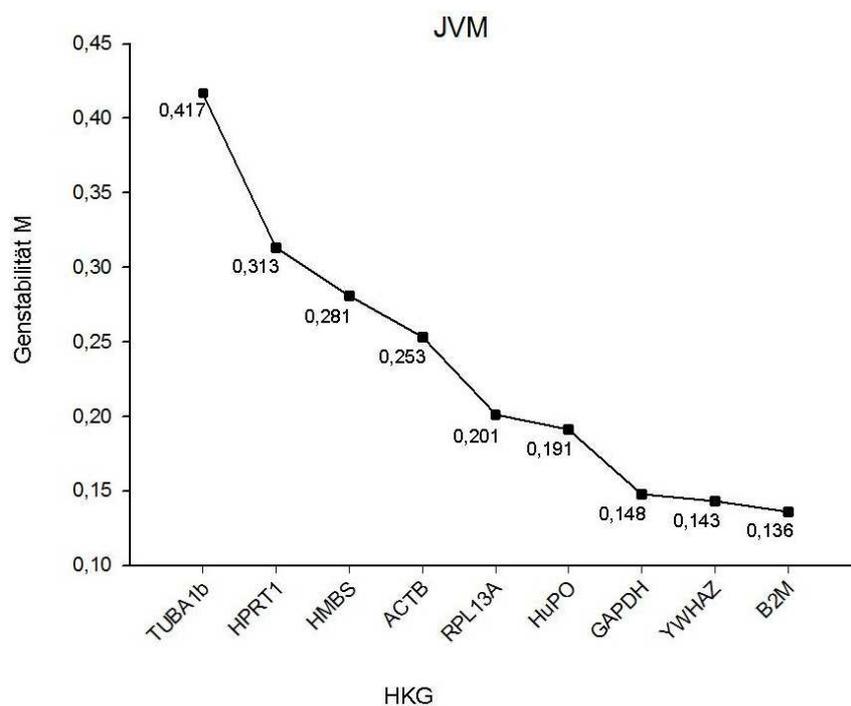
4.3.2 Quantitative und qualitative Analyse potentiell geeigneter Housekeeping-Gene mit der Analysesoftware „geNorm“

Für die quantitative und qualitative Analyse potentieller HKGs wurden elf Proben von *Diabetes-mellitus*-Patienten als Stichprobenauswahl mit elf potentiellen HKGs getestet. Die ausgewählten Proben repräsentierten die Gesamtheit der Proben der Expressionsstudie

hinsichtlich der Qualität (RIN-Wert) und Gruppenzugehörigkeit (Kontrollprobe, unbekannte Probe etc.) (siehe auch Kapitel 3.3.2).

Genstabilität M

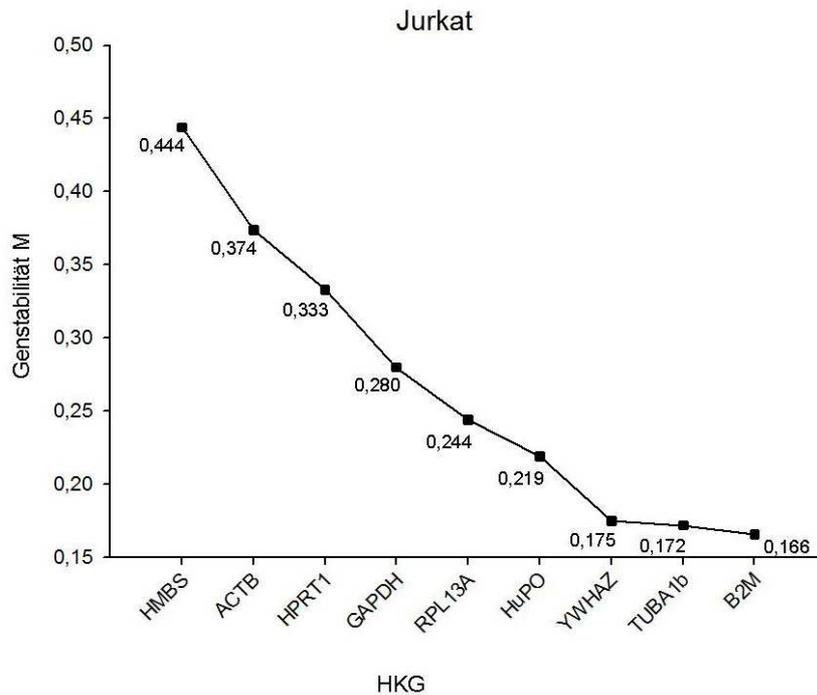
Der Parameter M ist das Maß für die Expressionsstabilität und wird durch schrittweisen Ausschluss des jeweils instabilsten Gens und einer Neuberechnung der verbleibenden Gene ermittelt (siehe Kapitel 3.3.2). Die Gene sind in der Reihenfolge ihrer M-Werte aufgeführt, von links nach rechts mit dem instabilsten Gen auf der linken Seite beginnend bis hin zum stabilsten Gen auf der rechten Seite der Abbildung. Die grafische Darstellung entspricht der der Analysesoftware „geNorm“



Der M-Wert für *Tubulin alpha 1b* in den JVM-13-Zellen lag mit 0,417 unterhalb der Grenze von $M = 0,5$ und weist auf ein stabil exprimiertes Gen innerhalb eines homogenen Probenpools hin (**Abb. 31**).

Die drei stabilsten HKGs waren *B2M*, *YWHAZ* und *GAPDH*.

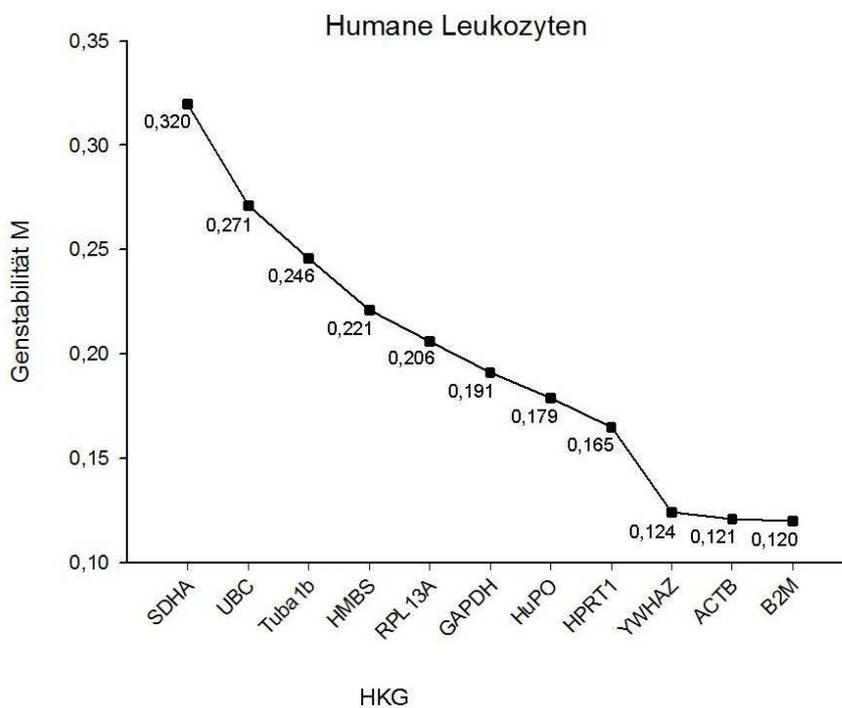
Abb.31 Nach Genstabilität M geordnete HKGs in JVM-13-Zellen



Bei den Jurkat-Zellen war *Tubulin alpha 1b* eines der beiden stabilsten HKGs. Mit einem M-Wert von 0,172 ist es innerhalb dieses Versuchssetups optimal als HKG geeignet (**Abb. 32**).

Die drei stabilsten HKGs waren *B2M*, *TUBA1B* und *YWHAZ*.

Abb.32 Nach Genstabilität M geordnete HKGs in Jurkat-Zellen



Mit einem M-Wert von 0,246 war *Tubulin alpha 1b* auch in den Leukozyten ein stabil exprimiertes HKG (**Abb. 33**).

Die drei stabilsten HKGs waren *B2M*, *ACTB* und *YWHAZ*.

Abb.33 Nach Genstabilität M geordnete HKGs in humanen Leukozyten

Zusammenfassend konnte mit der Bestimmung der Genstabilität gezeigt werden, dass die Verwendung des HKGs *Tubulin alpha 1b* aufgrund seiner stabilen Expression in Jurkat-, JVM-13-Zellen und humanen Leukozyten valide Ergebnisse lieferte. Im Rahmen der Optimierung der GED-Wert-Bestimmung in humanen Leukozyten stellten sich die HKGs *B2M* und *ACTB* als die beste Wahl für zukünftige Normalisierungen heraus. Die Ermittlung der optimalen Anzahl an zu verwendenden HKGs für die Berechnung eines exakten Normalisierungsfaktors im Falle humaner Leukozyten wird im folgenden Abschnitt erläutert.

Paarweise Variation V

Das Ergebnis der Berechnung der optimalen Anzahl an stabil exprimierten HKGs ist in **Abbildung 34** gezeigt. Von links nach rechts wird jeweils ein zusätzliches HKG in die Berechnung des Normalisierungsfaktors (NF) einbezogen, die NFs mit n und $n + 1$ Genen in Relation zueinander gebracht und die veränderte Variation V dargestellt. Bei einem Wert $V < 0,15$ ist die Hinzunahme eines weiteren HKGs nicht mehr erforderlich. Die Variation V liegt in dem gegebenen experimentellen Setup bei der Hinzunahme eines dritten HKGs bereits unterhalb des Schwellenwerts $0,15$ ($V_{2/3} = 0,038$). Der NF kann mit den Genen *B2M* und *ACTB* zuverlässig errechnet werden (**Abb. 33**). Die Hinzunahme von *YWHAZ* hätte aufgrund der niedrigen Variation V nur einen sehr geringen Einfluss auf den NF. Dieser kann mit ausreichender Genauigkeit als geometrisches Mittel aus den beiden HKGs *B2M* und *ACTB* berechnet werden.

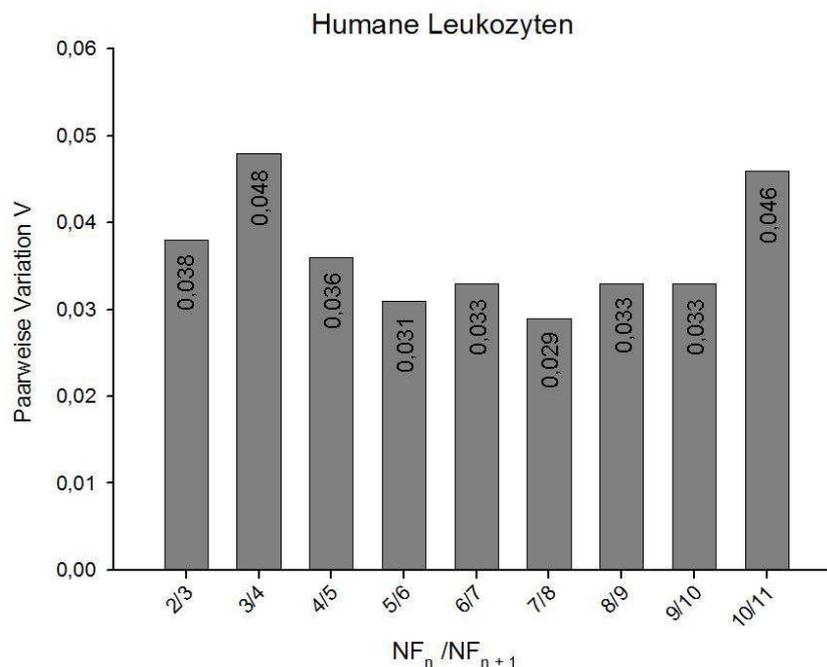


Abb.34 Paarweise Variation V des Normalisierungsfaktors NF beim Vergleich des NF aus n Genen und dem NF aus $n + 1$ Genen zur Bestimmung der optimalen Anzahl der Housekeeping-Gene (NF = Normalisierungsfaktor, n = Anzahl der HKGs)

4.3.3 Vergleichende Berechnungen unter Verwendung optimierter HKGs

Im Anschluss an die Ermittlung des optimalen Sets an Housekeeping-Genen wurde in einer vergleichenden Berechnung das bisher verwendete HKG *Tubulin alpha 1b* gegen die beiden optimalen HKGs *B2M* und *ACTB* (*beta-Actin*) hinsichtlich Unterschieden bei der *CNNM2*-Normalisierung getestet. Die Auswertung mithilfe des Programms *qbase^{Plus}* ergab die in der **Abbildung 35** dargestellten Ergebnisse. Die einzelnen Expressionsdifferenzen sind im Vergleich zum Durchschnittswert aller Proben berechnet. Dieser Durchschnittswert wurde auf 1 gesetzt. Gleichzeitig zu den Expressionsdifferenzen errechnete *qbase^{Plus}* den Standardfehler anhand des Algorithmus nach Hellemans et al. (2007). Der Standardfehler (SE) wurde nachfolgend nach der Formel $SD = SE \cdot \sqrt{n}$ in die Standardabweichung umwandelt. Die Stichprobengröße n betrug 20 Proben. Die GED-Werte der 20 Proben wiesen keinen oder einen geringen Unterschied zwischen den zur Normalisierung verwendeten HKGs auf. Die Einzelwerte sind in **Tabelle 16** aufgeführt. Die Abweichungen der relativen Expression lagen zwischen 0,004 und 0,384-fach mit einem Mittelwert von 0,109.

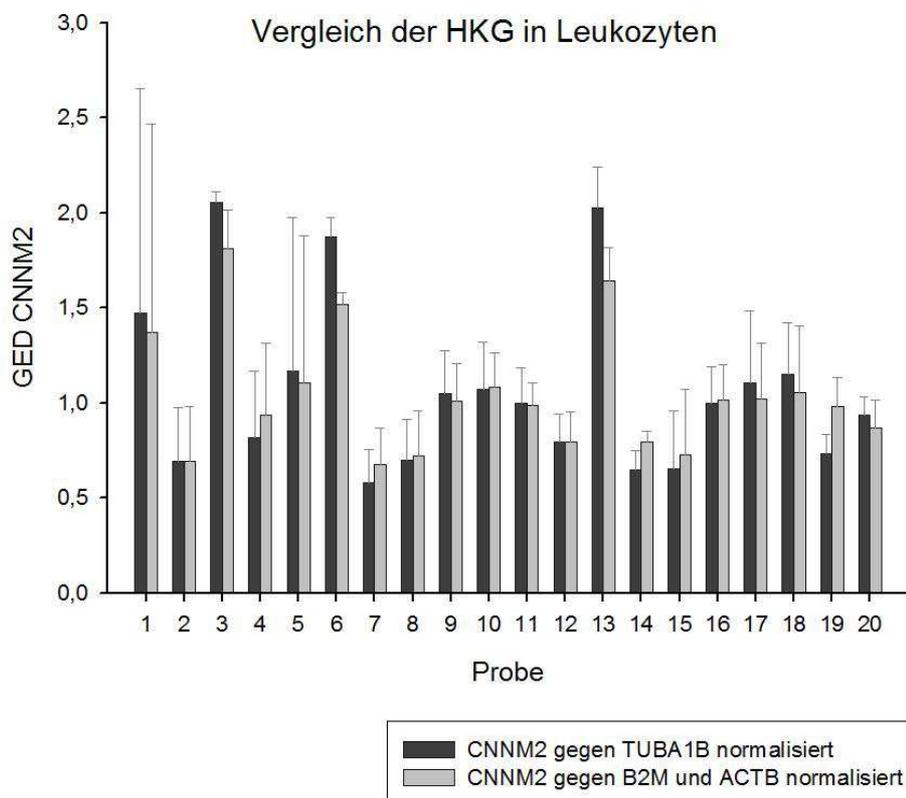


Abb.35 Vergleich der GED-Werte des Gens *CNNM2* aus 20 Proben (humane Leukozyten) in Abhängigkeit von der Wahl des HKGs. Dargestellt sind die Expressionsdifferenzen skaliert zum Mittelwert aller Proben und die SD

Tab.16 Übersicht der Einzelwerte der Bestimmung der relativen Expression des Gens *CNNM2* in humanen Leukozyten in Abhängigkeit von der Wahl des HKGs

Probe	<i>Tubulin alpha 1b</i>		<i>B2M</i> und <i>ACTB</i>	
	GED	SD	GED	SD
1	1,474	1,176	1,371	1,096
2	0,691	0,283	0,695	0,288
3	2,055	0,057	1,811	0,202
4	0,820	0,350	0,935	0,382
5	1,165	0,810	1,106	0,772
6	1,875	0,098	1,517	0,065
7	0,581	0,173	0,677	0,193
8	0,696	0,219	0,720	0,238
9	1,046	0,227	1,009	0,200
10	1,071	0,246	1,081	0,183
11	0,997	0,187	0,990	0,117
12	0,797	0,145	0,793	0,158
13	2,028	0,211	1,644	0,175
14	0,649	0,102	0,797	0,054
15	0,652	0,307	0,728	0,342
16	0,996	0,194	1,013	0,189
17	1,103	0,381	1,020	0,295
18	1,148	0,274	1,052	0,351
19	0,732	0,103	0,980	0,153
20	0,934	0,098	0,870	0,145

4.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Zellkulturversuch (in vitro)

- Die JVM-13-Zellen reagierten wesentlich sensibler auf einen Mg-Mangel mit einer Überexpression Mg-sensitiver Gene als die Jurkat-Zellen.
- Starke Überexpression (GED>6): *SLC41A1*, *CNNM2*, *TRPM7*, *NIPA1*, *N33*
- Mittlere Überexpression (GED>4): *SLC41A2*, *SLC41A3*
- Geringe Überexpression (GED>1): *MagT1*

Diabetes-mellitus-Patienten (in vivo) - Phase 1

- 114 / 115 (99 %) Patienten hatten einen $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Wert im Normbereich.
- 28 / 115 (24 %) Patienten hatten einen $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Wert $\leq 0,55$ mmol/l.
- 27 / 115 (24 %) Patienten hatten einen GED-Wert des Gens *CNNM2* ≥ 1 .
- 24 / 27 (89 %) Patienten mit einer GED ≥ 1 hatten einen $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Wert $\leq 0,55$ mmol/l.
- 23 / 24 (96 %) mit einer GED ≥ 1 und $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Wert $\leq 0,55$ mmol/l hatten einen $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Wert im Normbereich.

Diabetes-mellitus-Patienten (in vivo) - Supplementierung

- Der mittlere $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Wert änderte sich nicht.
- Der mittlere $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Wert stieg signifikant um 0,18 mmol/l auf 0,61 mmol/l (> 0,55 mmol/l).
- Die mittlere Genexpression (*CNNM2*) sank signifikant unter den Wert GED=1.

Methodenoptimierung mittels „geNorm“

- *Tubulin alpha 1b* wurde in allen Zellen stabil exprimiert ($M < 0,5$).
- Die optimale Anzahl an HKGs bei allen Zellen ist 2.
- ideale HKGs für Jurkat-Zellen: *B2M*, *TUBA1B*
- ideale HKGs für JVM-13-Zellen: *B2M*, *YWHAZ*
- ideale HKGs für humane Leukozyten: *B2M*, *ACTB*
- Im Vergleich zeigten die 20 Proben (humane Leukozyten) keine bzw. nur geringe Unterschiede in den GED-Werten (*CNNM2*) unter Verwendung des HKGs *Tubulin alpha 1b* bzw. *B2M* und *ACTB*.

5 DISKUSSION

5.1 DYNAMIK UND DIAGNOSTIK DER MAGNESIUMHOMÖOSTASE

Der Mikronährstoff Magnesium (Mg) ist für ein einwandfreies Funktionieren aller Komponenten innerhalb der Zelle lebenswichtig. Der Organismus hält dazu eine Homöostase aufrecht, ein Gleichgewicht aus Absorption im Darm, Umverteilungsvorgängen innerhalb des Körpers und Reabsorption in der Niere (Cole und Quamme 2000). Störungen dieses Gleichgewichts etwa durch eine geringe Zufuhr über die Nahrung oder einen erhöhten Verlust über die Nieren kann der Körper über einen gewissen Zeitraum durch die Aktivierung von Magnesium aus anderen Körperkompartimenten (v. a. Knochen) ausgleichen (siehe Kapitel 2.4.11.3). Studien von Alfrey, Miller et. al. (1974) zeigten eine ausgeprägte positive Korrelation zwischen dem Knochen-Mg-Gehalt und der Serum-Mg-Konzentration. Daraus zog das Forscherteam die Schlussfolgerung, dass das austauschbare Knochen-Magnesium als ein Reservoir zur Aufrechterhaltung einer normalen Serum-Mg-Konzentration dient. Sabatier, Pont et al. (2003) entwickelten ein kinetisches Kompartimentmodell des Mg-Metabolismus in gesunden Erwachsenen. Unter der Verwendung der stabilen Isotope ^{25}Mg und ^{26}Mg , oral bzw. intravenös verabreicht, konnten sie zeigen, dass innerhalb von 12 Tagen 25 % des Gesamt-Mg-Bestandes einem schnellen Austausch unterliegen. Davon entfallen 3 % auf das Magnesium im Plasma, das mit drei weiteren extraplasmatischen Kompartimenten im Austausch steht. Einer dieser drei extraplasmatischen Speicher weist eine Austauschrate von 80 % auf. Anatomische Zuordnungen waren mit diesem Kompartimentmodell schwierig.

Ein Absinken des Gesamt-Mg-Bestandes macht sich aufgrund der Mg-Austauschraten nicht unmittelbar in einer verminderten Serum-Mg-Konzentration bemerkbar. Auftretende unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Reizbarkeit, Muskelkrämpfe, Schlafstörungen und Kopfschmerzen, darunter auch Migräne, werden oft nicht mit einem Mg-Mangel in Verbindung gebracht (Tso und Barish 1992). Anhaltende Imbalancen führen so unbemerkt zu einem ausgeprägten Mangelzustand des gesamten Körpers, der erst über ein Abfallen der Serum-Mg-Werte in der klinischen Routineuntersuchung auffällig wird. Eine Hypomagnesiämie ist daher immer ein Zeichen eines massiven Mg-Mangels (Arnaud 2008). Unter Beachtung der Tatsache, dass eine Hypomagnesiämie häufig in Verbindung mit chronischen Erkrankungen wie Bluthochdruck, *Diabetes mellitus*, Metabolischem Syndrom und kardiovaskulären Erkrankungen steht, ist es von großer Bedeutung, frühzeitig eine Verminderung des Gesamt-Mg-Gehalts des Körpers zu detektieren (siehe Kapitel 2.5).

Einer der Hauptgründe, warum der Mg-Metabolismus nicht stärker im Fokus der klinischen Routineuntersuchungen steht, ist das Fehlen einer leicht zugänglichen, akkuraten und

reproduzierbaren Methode zur Bestimmung des Mg-Status. Im Jahr 1987 zeigte Whang, dass die Hypomagnesiämie eine der am häufigsten unterdiagnostizierten Elektrolytmangelzustände ist (Whang 1987). Die allgemein gängige Methode in der Praxis ist zurzeit die Bestimmung des Gesamtserum-Mg. Im Kapitel 2.4.1 wurde die Mg-Verteilung im Körper erläutert. Der Referenzbereich liegt zwischen 0,75 und 1,2 mmol/l, wobei ca. 35 % des Magnesiums im Plasma an Protein und ca. 10 % an andere Liganden gebunden sind. Der Anteil des Gesamtserum-Mg von nur 1% am Mg-Gehalt des Körpers und die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen den Kompartimenten machen diesen Laborwert nur mit Einschränkungen aussagekräftig. Wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sehr gut verdeutlichen, können die Serum-Mg-Werte im Normbereich liegen, obwohl der Körper sich schon in einer deutlichen Mangelsituation befindet. Serum-Mg-Werte oberhalb von 0,75 mmol/l schließen eine Mangelversorgung somit nicht aus, Werte unterhalb der Referenz sind ein sicheres Zeichen dafür.

Mit der Entwicklung Mg-sensitiver Elektroden ist die Bestimmung des ionisierten Magnesiums im Serum möglich, wobei der Vorteil gegenüber der Gesamtserum-Mg-Messung noch nicht geklärt ist. Eine genaue und aussagekräftige Beurteilung des Mg-Status erlaubt die Durchführung eines Magnesium-Loadingtests (Rude 1998). Dabei wird eine definierte Menge Magnesium infundiert und die Mg-Ausscheidung im Urin über 24 h gemessen. Die Aussagekraft dieses Tests wird allerdings wesentlich von der Nierenfunktion beeinflusst. Nierenwirksame Medikamente und Krankheitszustände mit erhöhten Magnesiumverlusten über den Urin (z. B. *Diabetes mellitus*) verfälschen den Test (Swaminathan 2003).

Der überwiegende Mg-Anteil des Körpers liegt intrazellulär (ca. 40%) und in der Knochenmatrix (ca. 60 %). Natürlich existieren auch Methoden zur Bestimmung des intrazellulären Mg-Gehaltes z. B. in Erythrozyten, Lymphozyten, Muskelzellen und Knochen. Dabei ist nur die ionisierte Form des Magnesiums die biologisch aktive und damit die repräsentative Form (Elin 1991).

Die Bestimmung von Magnesium in den fragilen Erythrozyten ist aufwendig und nur ein schlechtes Maß für den aktuellen Körper-Mg-Bestand. Erythrozyten besitzen keinen Zellkern und somit keinen Transkriptionsapparat. Darlu, Rao et al. (1982) stellten anhand ihrer Untersuchungen die Hypothese auf, dass genetische Faktoren eine spezifische Steady-State-Konzentration in reifen Erythrozyten aufrecht erhalten. Weiterhin sind Erythrozyten nur mit einem Teil der Transportsysteme ausgestattet und können Magnesium nur schlecht aufnehmen. Nur Retikulozyten besitzen noch ein Influxsystem und nehmen Magnesium bis zum Erreichen einer normalen intrazellulären Konzentration auf. Entsprechend ist im Durchschnitt die Erythrozyten-Mg-Konzentration für den Mg-Haushalt zur Zeit ihrer Bildung

repräsentativ. Junge Erythrozyten besitzen selbst bei niedrigen Plasma-Mg-Werten normale oder erhöhte intrazelluläre Mg-Werte (Elin et al. 1980).

Der Mg-Gehalt in Lymphozyten, Muskelzellen und Knochen korreliert zwar mit dem anderer Gewebe, allerdings ist die Bestimmungsmethode (Biopsie in den letztgenannten Geweben) für den praktischen klinischen Alltag viel zu aufwendig (Elin 1987). Eine praktikablere Bestimmung der intrazellulären Mg-Konzentration in Einzelzellen ist die rasterelektronenmikroskopische Röntgenemissionsspektralanalyse. Es wurde festgestellt, dass der Mg-Gehalt in Sublingualzellen sehr gut mit dem des Herzgewebes korreliert. Die Zellgewinnung ist einfach und nicht invasiv. Die Untersuchungsmethode existiert jedoch zurzeit nur in den USA und ist relativ teuer (Haigney et al. 1995; Haigney et al. 1997). Methoden wie ^{31}P -NMR-Spektroskopie, fast-filter-Mag-Fura-2-Spektrometrie und die Mg^{2+} -spezifische ionenselektive Elektrode finden nur in der Forschung Verwendung, da sie sehr teuer sind, Spezialausrüstung und speziell ausgebildetes Personal erfordern.

Auf der Suche nach leicht verfügbaren, für den klinischen Alltag anwendbaren und präzisen Methoden zur Bewertung der Mg-Status eines Patienten stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage, ob es möglicherweise Gene gibt, deren Expression in Abhängigkeit von der intrazellulären Mg-Konzentration reguliert werden.

Die wissenschaftliche Arbeit von Goytain, Quamme et al. (2005) und Goytain, Hines et al. (2007) war grundlegend für die Identifizierung möglicher Mg-sensitiver Gene. In den Jahren 2005 – 2007 untersuchten sie Gewebe von Mäusen, die zuvor unter Mg-Mangelbedingungen gehalten wurden, auf veränderte Expressionsprofile potentieller Kandidatengene. Dabei fielen *MagT1*, *SLC41A1*, *SLC41A2*, *NIPA1* und *CNNM2* auf, die in zahlreichen Geweben überexprimiert waren. Analoge Versuche mit Zellkulturen bestätigten das Ergebnis (näher erläutert in den Kapiteln 2.4.4 – 2.4.10 in der Literaturübersicht). In den letzten Jahren sind noch einige weitere potentielle Mg-sensitive Gene dazugekommen. Dennoch ist noch sehr wenig über die Transportvorgänge und die zugrundeliegenden exakten Mechanismen des Transports von Magnesium durch die Zellmembran bekannt. Die funktionale Identifikation und Charakterisierung der Mg-transportierenden Proteine befindet sich noch im Anfangsstadium.

5.2 VALIDIERUNG MG-SENSITIVER GENE IM IN-VITRO-ZELLVERSUCH

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Überprüfung der Eignung möglicher Kandidatengene als Biomarker zur Detektion eines Mg-Defizits ein In-vitro-Zellsystem etabliert. Klinisch relevante Routinetests nutzen in der Regel Blutproben als Probenmaterial, da es am einfachsten zu gewinnen ist. Aus diesem Grund diente ein auf Zellen des Blutes basierendes

In-vitro-Model als Grundlage für den Zellversuch. Die humanen Leukämie-Zelllinien Jurkat- und JVM-13 entstammen den T- bzw. B-Lymphozyten und stellen ein sehr gutes Referenzmodell bei der Entwicklung einer leicht verfügbaren und klinisch anwendbaren Methode zur Bestimmung des Mg-Status dar. Hinzu kommt, dass der Mg-Gehalt der Lymphozyten mit dem des Skelett- und Herzmuskels korreliert (Fatemi et al. 1991). Für die Probenentnahme, RNA-Isolierung und cDNA-Analyse sind spezielle, für diesen Zweck optimierte Entnahme- und Extraktionskits im Handel erhältlich (siehe Material- und Methodenteil).

Im vorliegenden Versuch sollten die Zellen über einen Zeitraum von 72 h in einem Versuchsmedium (HBSS) ohne Magnesium verbleiben. Vorausgehende Tests hatten gezeigt, dass die Zellen 2 - 3 Tage in diesem Minimalmedium überlebten, wobei die JVM-13-Zellen auf den Mangel sensibler reagierten, sodass der Versuch im Endeffekt auf 48 h begrenzt wurde. Die Vitalität zeigte über die ersten zwei Tage hinweg keinen Unterschied zu Zellen in Mg-haltigem Medium. Weiterhin wurde im Vorfeld untersucht, ob diese beiden Zelllinien die uns interessierenden Gene grundsätzlich exprimieren. Auf den **Abbildungen 9** und **10** ist zu erkennen, dass sowohl in den Jurkat- als auch in den JVM-13-Zellen die Gene *SLC41A1*, *SLC41A2*, *SLC41A3*, *CNNM2*, *TRPM7*, *NIPA1*, *N33* und *MagT1* exprimiert werden (Kapitel 4.1 im Ergebnisteil).

Bei der Auswertung der GED-Werte fiel auf, dass die JVM-13-Zellen wesentlich sensibler auf den Mg-Mangel reagierten als die Jurkat-Zellen. Die Ursache dafür ist möglicherweise im Ursprung der Zelllinien zu finden. Die Jurkat Zelllinie wurde aus einem Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) etabliert. Untersuchungen an Patienten mit ALL haben gezeigt, dass der Mg-Gehalt der Lymphozyten im Vergleich zu gesunden Probanden erniedrigt ist (Rzymowska 1996). Die Mg-Homöostase ist dadurch vermutlich verändert. Es ist anzunehmen, dass dieser Veränderung eine genetische oder epigenetische Ursache zugrunde liegt.

Eine andere Studie fand in den Haaren von ALL-Patienten eine ebenfalls erniedrigte Mg-Konzentration (Sahin et al. 2000). Gleichzeitig wurden die Serum-Mg-Werte bestimmt, die im Vergleich zu gesunden Probanden unverändert waren. Das Forscherteam sah in dem Serum-Mg-Wert einen sehr variablen und instabilen Laborwert zur Bestimmung des Mg-Gehalts und hielt die Messung der Haar-Mg-Konzentration für einen besseren Indikator zur Aufdeckung einer chronischen Mg-Defizienz. Carpentieri, Myers et al. (1988) beschrieben in ihrer Arbeit über die Wachstumsbedingungen von humanen Lymphozyten in der Zellkultur, dass B-Lymphozyten allgemein höhere Anforderungen an die Kalzium- und Mg-Versorgung stellen als T-Lymphozyten. Möglicherweise liegt der höhere Bedarf an der starken Proliferation in den Lymphknoten nach Antigen-Kontakt, der Bildung von Antikörpern und der dadurch höheren metabolischen Aktivität. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen den

Schluss zu, dass die Jurkat-Zellen an einen niedrigen intrazellulären Mg-Gehalt bereits adaptiert sind. Das erklärt die gute Überlebensrate nach 72 h in Mg-freiem Medium im Vergleich zu den JVM-13-Zellen. Auch der oft nicht signifikante bzw. erst spät messbare Anstieg der GED-Werte einiger Gene in den Jurkat-Zellen zum Zeitpunkt 48 h ist daraus ableitbar. Gleichzeitig reagierten die JVM-13-Zellen aufgrund ihrer höheren Anforderungen sensibler auf den Mg-Mangel.

Die Gene *SLC41A1*, *CNNM2*, *TRPM7*, *NIPA1* und *N33* zeigten bei Mg-Mangel eine starke Überexpression (GED > 6). Eine mittlere Überexpression (GED > 4) wiesen die Gene *SLC41A2* und *SLC41A3* auf. Das Gen *MagT1* war nicht signifikant überexprimiert.

Die Expression stieg bei drei von acht Genen bereits nach 5 h signifikant an. Bei der Mehrzahl der Gene war dieser Anstieg jedoch erst später messbar. Diese zeitliche Verzögerung könnte zum einen auf der Tatsache beruhen, dass zu Beginn des Experiments die intrazellulären Mg-Speicher gefüllt sind. Intrazelluläres Mg²⁺ ist überwiegend in den Mitochondrien, Golgi, ER und Mikrosomen gespeichert (Cittadini et al. 1991). Weiterhin liegen über 98 % - 99 % des gesamten Magnesiums innerhalb der Zelle in Komplexen mit Phosphonukleotiden, Bicarbonat und Citrat oder an Proteine gebunden vor (Romani 2011). Zwischen den einzelnen Kompartimenten und der gebundenen und ionisierten Form herrscht ein dynamisches Gleichgewicht, das von intrinsischen Mechanismen reguliert wird. Die Freisetzung von Mg²⁺ aus den Speichern zum Ausgleich niedriger zytosolischer Mg²⁺-Konzentrationen verändert die Konzentration des freien zytosolischen Mg²⁺ stetig (Romani 2007). Es ist anzunehmen, dass es eine Zeit dauert, bis die intrazellulären Speicher entleert sind und der zytosolische Mg-Gehalt absinkt. Ein weiterer Aspekt ist die Regulation der Expression der Membrantransporter auf der Ebene der Transkription. Auch ist davon auszugehen, dass vom Signal innerhalb der Zelle bis zur Transkription spezifischer Gene einige Zeit vergeht.

Die Resultate des vorliegenden Zellkulturversuchs entsprechen denen verschiedener, in der Literatur aufgeführter Expressionsanalysen in anderen Zellkulturen, die unter niedrigen Mg-Konzentrationen gehalten wurden, wie z. B. *TRPM6* in HC11-Zellen (Wolf et al. 2010), *SLC41A1*, *NIPA1*, *MagT1*, *CNNM2* in MDCT-Zellen (Goytain und Quamme 2005; 2007), *SLC41A1* in HEK-293-Zellen (Kolisek, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Goytain und Quamme (2005) zeigte das Gen *SLC41A2* in den JVM-13-Zellen der vorliegenden Arbeit eine deutliche Überexpression.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse aus dem Zellkulturversuch kann der Schluss gezogen werden, dass es magnesiumsensitive Gene gibt, deren Expression in Abhängigkeit vom zellulären Magnesiumstatus reguliert werden und die somit als mögliche Biomarker zur Aufdeckung eines Magnesiummangels in Betracht kommen. Am empfindlichsten reagierten die Kandidatengene *SLC41A1*, *CNNM2*, *TRPM7*, *NIPA1* und *N33* in JVM-13-Zellen auf eine Magnesiumdepletion.

5.3 **CNNM2 ALS BIOMARKER BEI DIABETES-MELLITUS-PATIENTEN**

5.3.1 Validierung von *CNNM2* an einer Patientenkohorte

Diabetes mellitus ist die häufigste Stoffwechselerkrankung, die mit einem Mg-Mangel assoziiert ist. Während der letzten Jahre hat sich immer mehr gezeigt, dass Magnesium signifikant die Häufigkeit des Auftretens, die Entwicklung und den Verlauf von *Diabetes mellitus* beeinflusst (Chaudhary et al. 2010). Es wirkt positiv auf die Parameter der glykämischen Kontrolle, indem es die Tyrosin-Kinase-Aktivität des Insulin-Rezeptors und die postrezeptionale Signaltransduktion verbessert (Barbagallo et al. 2007)(siehe auch Kapitel 2.5.1). Jedoch zeigte sich in klinischen Studien, dass nicht alle Patienten mit Diabetes gleichermaßen gut auf eine Mg-Supplementierung reagieren (Song et al. 2006). Einer der hauptsächlichen Gründe dafür ist die Tatsache, dass vorrangig Mg-defiziente Patienten von einer Supplementierung profitieren. Die Diagnose des Mg-Status basiert momentan noch auf der Bestimmung der Plasma-Mg-Konzentration.

In einer systematischen Übersicht beurteilten Witkowski, Hubert et al. (2011) die Effektivität 20 verschiedener Biomarker zur Bestimmung des Mg-Status anhand veröffentlichter Mg-Supplementierungs- bzw. Mg-Depletierungsversuche bei gesunden Probanden. Anhand 21 ausgewerteter Studien (hauptsächlich Supplementierungsstudien) kamen sie zu dem Ergebnis, dass nur drei der 20 Biomarker sensitiv auf eine erhöhte bzw. verminderte Mg-Zufuhr reagierten. So bewerteten sie die Serum/Plasma-Mg-Konzentration, die Erythrozyten-Mg-Konzentration und die Mg-Konzentration im 24-Stunden-Urin als nützliche Biomarker zur Bestimmung des Mg-Status des Körpers. Andere Marker konnten aufgrund unzureichender Daten nicht zuverlässig auf ihre Verwendbarkeit bewertet werden. Die Bestimmung der Serum/Plasma-Mg-Konzentration ist insofern zuverlässig, als das ein unterhalb der Referenz liegender Wert eindeutig auf einen schweren Mg-Mangel schließen lässt. Auch ist ein Anstieg der Plasma-Mg-Konzentration nach Supplementierung zu erwarten, da der Körper vorrangig bemüht ist, diese konstant zu halten und dazu auch auf seine intrazellulären Speicher zurückgreift. Allerdings wird keine Aussage über den intrazellulären Status und die

mögliche Verarmung großer Mg-Speicher (insbesondere des Knochens) getroffen. Es bleibt weiterhin die Frage offen, inwieweit anhand dieser Methoden zuverlässige Aussagen bei der Detektion latent Mg-defizienter Menschen mit einer Plasma-Mg-Konzentration innerhalb der Norm getroffen werden können.

Somit ist die Plasma-Mg-Konzentration für die Beurteilung des Mg-Status des Körpers nur mit Einschränkungen aussagekräftig. Aufgrund dieser Problematik besteht eine Notwendigkeit zur Entwicklung praxistauglicher Methoden zur Bewertung der intrazellulären Speicher.

Die Entdeckung Mg-sensitiver Gene, deren Expression in Abhängigkeit vom Mg-Status reguliert werden, macht diese Gene zu potentiellen Biomarkern zur Aufdeckung einer Mg-Defizienz. Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode mithilfe der qPCR soll später der Identifizierung von *Diabetes-mellitus*-Patienten dienen, die von einer alimentären Mg-Supplementierung profitieren würden. Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten In-vivo-Versuch sollte herausgefunden werden, ob ausgewählte Gene auch in humanen Leukozyten in Abhängigkeit vom Mg-Status reguliert werden. Dazu wurde die Expressionsrate eines im Zellversuch am stärksten reagierenden Kandidatengens *CNNM2* in den Leukozyten von *Diabetes-mellitus*-Typ-II-Patienten bestimmt. Gleichzeitig wurden die Plasma-Mg-Konzentration und die intrazelluläre freie Mg^{2+} -Konzentration der Leukozyten gemessen. Die Leukozyten wurden unmittelbar nach der Blutentnahme separiert und bis zur RNA-Isolierung in RNALater gelagert, um das RNA-Expressionsprofil zu stabilisieren. Im Hinblick auf zukünftige Patientenscreenings und auf die Anwendbarkeit der Genexpressionsanalyse in der Routinepraxis wird es nicht immer möglich sein, unmittelbar nach der Blutentnahme die Leukozyten zu isolieren, da in der Regel die Entnahme vom Praxis- bzw. Klinikpersonal durchgeführt wird. Bis zur RNA-Isolierung kommt es dann zu einer zeitlichen Verzögerung von mehreren Stunden bis hin zu mehreren Tagen. In dieser Zeit kann sich das Expressionsprofil einiger Zielgene signifikant verändern. Diese Instabilität ist das Ergebnis der fortschreitenden metabolischen Aktivität in den gewonnenen Blutproben. In Versuchen von Tanner, Berk et al. wurden bei verschiedenen Genen (vor allem Zytokine, Chemokine und Transkriptionsfaktoren) signifikante Veränderungen der relativen Expression (sowohl Hochregulierung als auch Herunterregulierung) aufgrund der Lagerung der Blutproben bei Raumtemperatur nach der Probenentnahme gemessen. Beispielsweise lag die relative Expression des Chemokins IL-8 nach einer Stunde bei RT um das 10-Fache höher, nach vier Stunden bereits um das 100-Fache (Tanner et al. 2002). Für eine akkurate Messung von Expressionsprofilen auch Stunden nach der Blutentnahme ist es daher wichtig, dass das Blut in ein Behältnis entnommen wird, das ein RNA-stabilisierendes Reagenz enthält, um das Expressionsprofil zum Zeitpunkt der Entnahme zu fixieren. Dafür stehen bereits mehrere kommerzielle Systeme für zukünftige Studien zur Auswahl. Zum Beispiel enthalten die

Tempus™ Blood RNA Tubes ein Reagenz, dass die Blutzellen unverzüglich lysiert, RNAsen inaktiviert und die RNA in einer Mizellenstruktur einschließt und so stabilisiert. So sind die Proben bzw. die RNA bei Raumtemperatur bis zu 5 Tagen, bei 4 °C bis zu 7 Tagen und bei -20 bis -80 °C über Monate stabil. Die Notwendigkeit einer Leukozytenisolierung in unmittelbarem Anschluss an die Blutentnahme sowie die sofortige RNA-Isolierung (bzw. Lagerung in RNALater) könnten dann in der Routinediagnostik entfallen.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der ersten Phase der Studie zeigten 114 von 115 Patienten eine Plasma-Mg-Konzentration im Normbereich. Nur ein Patient lag mit einem Wert von 0,72 mmol/l geringfügig unter dem Referenzwert 0,75 mmol/l, einem Wert, der routinemäßig zur Differenzierung einer Unterversorgung herangezogen wird. Demnach waren unter normalen klinischen Praxisbedingungen ein Patient als auffällig und 114 Patienten als unauffällig diagnostiziert worden.

In der vorliegenden Studie konnte die Expression des Mg-sensitiven Gens *CNNM2* als wesentlich sensitiverer Indikator einer unzureichenden Mg-Versorgung etabliert werden. Bei 27 von 115 Patienten (23,5 %) wurde für *CNNM2* ein GED-Wert > 1, bezogen auf 15 klinisch gesunde Probanden, ermittelt. Von den 27 Patienten mit *CNNM2*-Überexpression zeigten 24 Patienten einen niedrigen intrazellulären Mg-Gehalt ($\leq 0,55$ mmol/l). Insgesamt lagen von 115 Patienten 28 unterhalb einer $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Konzentration von 0,55 mmol/l und damit in einem Bereich der Unterversorgung. Die Überexpression einiger Gene bei Patienten mit niedrigem intrazellulärem Mg-Spiegel deutet darauf hin, dass die Zelle diesen niedrigen Mg-Status zu kompensieren versucht. Dabei werden die Gene vermehrt exprimiert, die am Transport von Magnesium durch die Zellmembran beteiligt sind.

Somit wurden über den GED-Wert des Gens *CNNM2* 24 von 28 Patienten (86 %) detektiert, die sich in einer Mg-Mangelsituation befanden (**Abb. 36** und **Tab. 15** im Ergebnisteil). Der Begriff „Mangelsituation“ wird in der vorliegenden Arbeit über einen intrazellulären Mg^{2+} -Gehalt $\leq 0,55$ mmol/l definiert. Patienten, deren Mg-Status anhand der GED-Methode beurteilt wurde, befanden sich zu 88,9 % wirklich in einer Mangelsituation. Nur vier Fälle (4,6 %) würden anhand des GED-Werts falsch negativ bewertet werden. Drei Patienten würden als falsch positiv eingestuft und ohne zwingenden Bedarf mit Magnesium supplementiert werden. Ist der Körper gut mit dem Mikronährstoff versorgt, steigt die Ausscheidung über die Niere an und ein Zuviel an Magnesium wird bei intakter Nierenfunktion einfach ausgeschieden. Eine zu hohe einmalige Einnahme führt zur Diarrhøe und zur Ausscheidung des überschüssigen Magnesiums über den Darm (Elin 1988; Fine et al. 1991). Eine Überdosierung ist somit praktisch nicht möglich.

Im Vergleich dazu ist die Genauigkeit, mit der eine Mangelsituation detektiert wird bei der Plasmamessung höher (100 %). Das bedeutet, wenn ein Plasmawert unter 0,75 mmol/l gemessen wird, liegt zu 100 % ein Mangel vor, d. h. ein $[Mg^{2+}]_{intra} < 0,55$ mmol/l. Es wurde

jedoch nur 1 Patient von 28 (3,6 %) als positiv eingestuft (**Abb. 36**). Demzufolge wären 27 Patienten (96,4 %) als falsch negativ bewertet und ohne Supplementierung entlassen worden. Damit ist die Anzahl derer, die von einer Supplementierung profitieren würden, aber als unauffällig bewertet wurden, mit 23,7 % weitaus höher als bei der relativen Expressionsbestimmung von *CNNM2* (siehe **Tab. 15** im Kapitel 4.2.1.2). Demgegenüber veranschaulicht **Abbildung 26** (im Ergebnisteil) die Diskrepanz zwischen intrazellulärem Mg^{2+} -Status und Plasma-Mg-Werten. Zu dieser Feststellung gelangten auch zahlreiche andere Untersuchungen (z. B. de Lordes Lima et al. 1998). Aus den **Abbildungen 23** und **24** (im Ergebnisteil) geht hingegen deutlich hervor, dass die GED-Werte von *CNNM2* gut mit den intrazellulären Mg-Werten, aber nicht mit denen des Plasmas korrelieren.

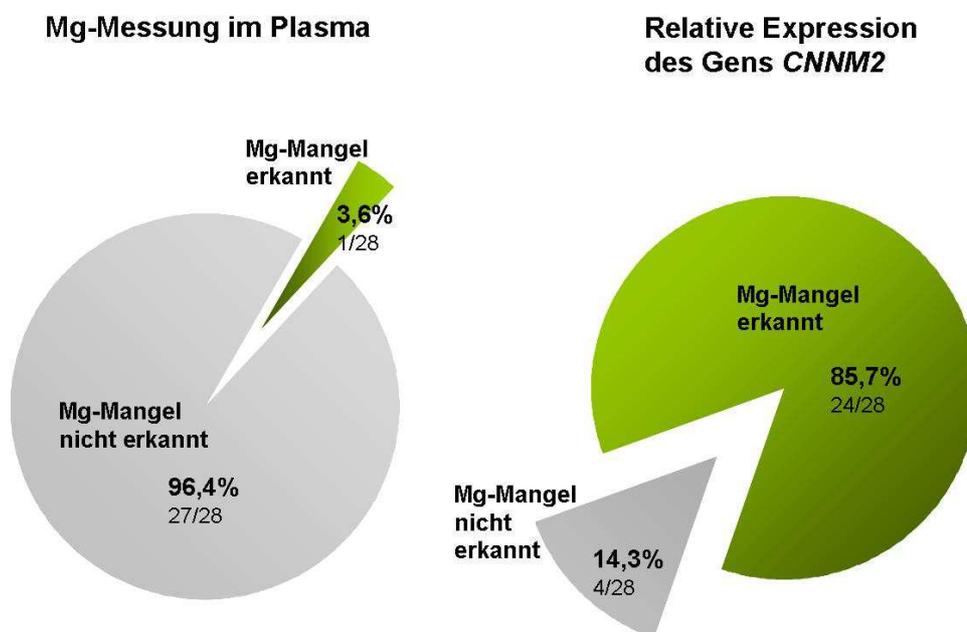


Abb.36 Gegenüberstellung der Analysemethoden Plasma-Mg-Messung und Bestimmung der relativen Genexpression des Gens *CNNM2* im Hinblick auf die Detektion einer Mg-Unterversorgung des Körpers.

Die Ergebnisse des Screenings bei Patienten mit *Diabetes mellitus* belegen, dass ein Magnesiummangel des Körpers zuverlässiger durch die leukozytäre Expression des Gens *CNNM2* als durch den Plasmamagnesiumwert detektiert wird. Aufgrund dessen kommt das Gen *CNNM2* als ein möglicher Biomarker für die Bestimmung des Magnesiumstatus des Körpers in Frage.

5.3.2 Magnesiumsupplementierung und Erfolgskontrolle mittels transkriptioneller Biomarker

Es war im Rahmen der vorliegenden Studie von besonderem Interesse, ob eine Erhöhung der täglichen Mg-Zufuhr einen positiven Effekt auf die intrazellulären Mg-Werte bzw. auf die Überexpression des Gens *CNNM2* bei ausgewählten Patienten aus Phase 1 der Studie hat. Nach Abschluss der ersten Phase wurden 19 Patienten mit einem GED-Wert (*CNNM2*) über 2 und einer intrazellulären Mg-Konzentration unter 0,55 mmol/l für eine Supplementierungsstudie ausgewählt. Nach 30 Tagen oraler Mg-Supplementierung änderte sich der mittlere Plasma-Mg-Spiegel nicht (identische Mittelwerte vor und nach Supplementierung). Der Plasma-Mg-Spiegel lag vor der Supplementierung bereits größtenteils im Normbereich. Der Plasmawert eines Patienten, der anfangs unterhalb von 0,75 mmol/l lag, normalisierte sich nach der Supplementierung. Die GED-Werte für *CNNM2* fielen bei allen Patienten unter den Schwellenwert $GED = 1$, d. h. eine Überexpression war nicht mehr detektierbar. Die intrazellulären Mg^{2+} -Werte stiegen bei 18 von 19 Patienten (95 %) über einen Wert von 0,55 mmol/l. Nur ein Patient wies zu Beginn eine derart niedrige $[Mg^{2+}]_{intra}$ -Konzentration auf, dass er nach 30 Tagen nur knapp unterhalb der Referenz lag (von 0,32 mmol/l auf 0,54 mmol/l).

Für die Supplementierung der Patienten wurde Magnesium als Salz der organischen Zitronensäure verwendet. Magnesium in Kombination mit organischen Salzen wie z. B. Zitrat, Aspartat oder Orotat wird generell vom Körper besser aufgenommen als in anorganischen Verbindungen (z. B. Chlorid, Oxid) (Walker et al. 2003). Das konnte durch eine am Institut für Veterinärphysiologie durchgeführte Studie über die Bioverfügbarkeit von Magnesiumoxid im Vergleich zu Magnesiumcitrat bestätigt werden (unveröffentlichte Daten). Magnesiumcitrat zeigt unter den organischen Verbindungen die vergleichsweise höchste Bioverfügbarkeit, wird besonders gut vom Körper aufgenommen und führt schnell zu einem deutlichen Anstieg der Mg-Konzentration im Blut. Gleichzeitig kann der „basische Effekt“ der Citrate genutzt werden, um Schmerzen zu lindern und chronischen Erkrankungen vorzubeugen (Vormann et al. 2001; Sun-Edelstein und Mauskop 2009).

Magnesium als Therapeutikum wird bereits bei einigen Erkrankungen als fester Bestandteil der Therapie angewandt. Als gesichert und etabliert gilt der Einsatz bei Muskelkrämpfen (Roffe et al. 2002), Prä-/Eklampsie (Witlin und Sibai 1998; Korish 2012), Torsade de Point (Kaye und O'Sullivan 2002) und bei der arteriokoronaren Bypass-OP zur Prävention von Vorhofflimmern (Casthely et al. 1994). Als gesichert, aber kaum etabliert ist die Anwendung bei Asthma bronchiale (Tso und Barish 1992). Zahlreiche Studien (häufig mehrere erfolgreich behandelte Einzelfälle) und die gute therapeutische Breite rechtfertigen in der ambulanten Praxis den Einsatz der Mg-Therapie darüber hinaus bei Erkrankungen, für die keine anderweitige, situationsangepasste Therapie geeignet ist, diese anderweitige Therapie kontraindiziert oder nicht ausreichend wirksam ist: z. B. Tinnitus (Cevette et al. 2010), (akute) Migräne (Pfaffenrath et al. 1996; Thomas et al. 2000), Epilepsie (Gupta et al. 1994; Yuen und Sander 2012), Major Depression (Eby und Eby 2006; Nechifor 2009), ADHD (Kozielc und Starobrat-Hermelin 1997; Starobrat-Hermelin und Kozielc 1997), Restless-Leg-Syndrom (RLS) (Hornyak et al. 1998) und schwere spastische Bronchitis während der Schwangerschaft (Skobeloff et al. 1993; von Ehrlich et al. 2010). Die Mg-Infusion ist die Behandlung der Wahl im Fall einer Eklampsie, kann aber genauso effektiv in der Prävention bei Frauen mit Präeklampsie (PE) eingesetzt werden. Geringe Mg-Zufuhr ist ein Risikofaktor für die Entwicklung einer PE. Untersuchungen von Standley et al. (1997) belegten eine inverse Beziehung zwischen ionisiertem Magnesium und dem Gesamt-Mg im Serum und einer fortschreitenden Schwangerschaft. Bei 71 % der Schwangeren wurden im Verlauf der Schwangerschaft sinkende Serum-Mg-Konzentrationen gemessen und 29 % der Frauen entwickelten eine Präeklampsie. Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine orale Supplementierung sehr effektiv bei der Reduzierung der Inzidenz von PE angewandt werden kann. Schwangerschaftsinduzierter Bluthochdruck als ein Risikofaktor von PE kann dadurch teilweise verhindert werden (Korish 2012). Auch hier könnte eine Diagnostik der Expression Mg-sensitiver Gene in Zukunft Vorteile für eine gezielte Therapie bringen. Kürzlich wurden am Institut für Veterinärphysiologie innerhalb der AG Magnesiumtransport Genexpressionsstudien an Plazenten von gesunden und von PE betroffenen Schwangeren durchgeführt. Es wurden verschiedene Mg-sensitive Gene getestet. In den Plazenten von PE-betroffener Schwangeren war jedoch nur das Gen *SLC41A1* signifikant überexprimiert im Vergleich zu Plazenten von Frauen mit ungestörtem Schwangerschaftsverlauf (unveröffentlichte Daten). Der $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austauscher scheint signifikant am maternal/fetalen Mg-Transport beteiligt und als Biomarker für die Diagnostik eines Mg-Mangels während der Schwangerschaft geeignet zu sein.

Positive Effekte einer Mg-Supplementierung auf die Knochendichte wurden durch Stendig-Lindberg (1993) und Dimai (1998) gezeigt. Im Vergleich mit anderen Supplementierungsstudien decken sich die Ergebnisse der hier aufgeführten Studie mit

denen, die in der Literatur beschrieben wurden. Allgemein lässt sich schlussfolgern, dass eine erhöhte tägliche Mg-Zufuhr gesundheitsfördernd erscheint. Epidemiologische Studien bei mehr als 500.000 Personen belegten, dass sich mit steigender Mg-Zufuhr das Risiko, einen *Diabetes mellitus* zu entwickeln, reduziert (Dong et al. 2011). Genauer betrachtet reduziert sich das *Diabetes-mellitus*-Risiko um 14 % pro 100 mg täglich zusätzlich oral zugeführtem Magnesiums (Larsson und Wolk 2007). Kontrollstudien bei hypomagnesiämischen Patienten mit Typ-II-Diabetes und Prädiabetes zeigten, dass Parameter der Glukose-Homöostase wie HbA1c, Nüchternblutzucker und Insulinresistenz durch eine Mg-Supplementierung signifikant verbessert werden (Rodriguez-Moran und Guerrero-Romero 2003; Mooren et al. 2011).

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt eine tägliche Zufuhr von 300-350 mg Magnesium über die Nahrung (WHO: 300 mg). In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass mit der in Deutschland üblichen Nahrung die empfohlene Zufuhr häufig nicht erreicht wird. Im Durchschnitt nahmen Frauen nur 210 mg und Männer 260 mg Magnesium pro Tag zu sich (Glei und Anke 1995). Das wurde durch die VERA-Studie bestätigt. Zwischen 10 - 20 % der erwachsenen Bevölkerung wiesen Serum-Mg-Konzentrationen auf, die auf einen erheblichen Mg-Mangel schließen ließen (Vormann 2010). In Anbetracht der Tatsache, dass die Mg-Zufuhr der steinzeitlichen Jäger und Sammler täglich ca. 600 mg (Vormann 2010) (1220 mg nach Eaton und Eaton 2000) betrug und sich unsere Homöostase-Mechanismen und das Genom seither nicht verändert haben, ist unser Körper bestens an eine hohe Mg-Zufuhr angepasst.

5.3.3 Funktionelle Bedeutung der Biomarker *CNNM2* und *SLC41A1*

CNNM2 war in den aufgeführten Genexpressionsstudien der vorliegenden Arbeit ein zuverlässiger Biomarker für einen Mg-Mangel bei *Diabetes mellitus*. Das weist auf einen wichtigen Beitrag zur Mg-Regulation hin. Im Hinblick auf die spezielle Funktion dieses Gens in der Mg-Homöostase stimmen unsere Resultate mit verschiedenen neueren Befunden überein, wie z. B. der Überexpression des Gens *CNNM2* in Claudin16-defizienten Mäusen zur Kompensation eines renalen Mg-Verlusts (Will et al. 2010). Es ist bekannt, dass Mutationen im humanen *CLDN16*-Gen (Claudin-16) zu schweren Mg- und Ca-Verlusten, Nephrokalzinose und Nierenversagen führen (familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose, FHHNC, [MIM 248250, 248190]). Claudin-16 ist essentiell für den parazellulären epithelialen Transport von Mg^{2+} und Ca^{2+} im TAL der Niere. Will, Breiderhoff et al. (2010) untersuchten mittels Mikroarray Nierengewebe CLN16-defizienter Mäuse und fanden eine veränderte Expression u. a. der Gene *CNNM2* und *TRPM6*. Letzteres ist der

Hauptmodulator der Mg^{2+} -Reabsorption im distalen Teil der Niere. Die Überexpression der beiden Gene führte das Forscherteam zu dem Schluss, dass unter hypomagnesiämischen Bedingungen und gleichzeitig hoher Mg^{2+} -Konzentration im Harn die verstärkte Expression der Gene einen kompensatorischen Mechanismus darstellt.

Im Jahr 2011 berichteten Stuver, Lainez et al. von einer *missense*-Mutation im *CNNM2*-Gen bei einigen seltenen Fällen von dominant familiärer Hypomagnesiämie mit hohen Mg-Verlusten über die Niere (Stuver et al. 2011). Die Forschergruppe wies in murinen DCT-Zellen eine Überexpression des *CNNM2*-Gens unter Mg-Mangelbedingungen nach. Unter Ca-Mangelbedingungen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Gleichzeitig wurde auch mittels Antikörper gegen CNNM2 eine erhöhte Konzentration des Proteins gemessen. Diese spezifische Antwort auf die Mg-Konzentration lässt auf eine wichtige Rolle in der Mg-Homöostase schließen. Der Mechanismus, wie das Genprodukt von *CNNM2* die Regulation des Mg-Status beeinflusst, ist noch unklar.

Auch andere Mg-sensitive Gene könnten als Biomarker durchaus in Betracht gezogen werden. In einigen Mg-defizienten Patienten (Daten nicht gezeigt) und in den JVM-13-Zellen (Zellversuch) war zusätzlich auch das Gen *SLC41A1* überexprimiert. Experimente mit humanem *SLC41A1*-überexprimierenden HEK-Zellen weisen auf die Rolle dieses Gens im Magnesiumtransport hin. Kolisek et al (2012) konnten kürzlich zeigen, dass *SLC41A1* den Na^+/Mg^{2+} -Antiporter codiert. Dieser stellt den Haupteffluxmechanismus von Magnesium durch die Plasmamembran dar. Dieses Gen war in den Plazenten von PE betroffenen Schwangeren deutlich überexprimiert.

Die orale Mg-Supplementierung hatte bei *Diabetes-mellitus*-Patienten einen positiven Effekt auf die intrazelluläre Magnesiumkonzentration der Blutleukozyten. Dies lässt darauf schließen, dass das Defizit des Körpers ausgeglichen wurde. Die intrazellulären Mg^{2+} -Werte stiegen in den Normbereich, was zur Förderung der Gesunderhaltung des Körpers beiträgt. Die relative Expression des Gens *CNNM2* normalisierte sich ebenfalls. Das spricht für eine gute Eignung als Biomarker bezüglich der Diagnose eines Magnesiummangels und unterstreicht seine hohe Sensitivität.

5.4 OPTIMIERUNG DER ANALYTIK DES BIOMARKERS *CNNM2* FÜR DIE ROUTINEDIAGNOSTIK

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Versuche (in vitro und in vivo) zeigten das getestete Gen *CNNM2* als einen potentiellen Biomarker zur Detektion eines Mg-Defizits bei *Diabetes mellitus*. Die sensitive Auf- und Abregulierung seiner Expression in Abhängigkeit vom intrazellulären Mg-Gehalt ermöglicht eine Anwendung der *CNNM2*-Expressionsbestimmung im klinischen Routinealltag. Auch ist die Isolierung genetischen Materials eine gängige Methode, die in klinisch-diagnostischen Laboren bereits Standard ist. Mit dem Gedanken, diese Methode der Bestimmung des Mg-Status möglicherweise in Zukunft als eine leicht praktikable Analysemethode etablieren zu können, müssen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in randomisierten klinischen Studien mit möglichst großem Stichprobenumfang auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft werden. Es ist, wie bereits in Kapitel 5.3.3 näher ausgeführt, von Vorteil, analoge Studien auch mit weiteren, mit Hypomagnesiämie assoziierten Erkrankungen durchzuführen. Gleichzeitig erweitert eine Hinzunahme weiterer Mg-sensitiver Gene in die Expressionsbestimmung das Spektrum potentieller Markergene. Es ist mit einiger Wahrscheinlichkeit möglich, dass in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Erkrankung andere Mg-sensitiven Gene in unterschiedlicher Weise reguliert werden. Ziel ist es, eine allgemeine und zuverlässige Methode für die Bestimmung des Körper-Mg-Status zu finden und zu etablieren, um Menschen mit einem Magnesiumdefizit zu detektieren und dann gezielt supplementieren zu können. In diesem Zusammenhang ist es von enormer Bedeutung, einheitliche Richtlinien zur Probengewinnung, -lagerung, -transport, -aufarbeitung, -analyse und Datenberechnung aufzustellen, um die Daten vergleichbar und reproduzierbar zu machen.

Die „Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments“ (MIQE-Richtlinien) gewinnen international immer mehr an Bedeutung. Sie dienen dem Ziel, Ergebnisse aus qPCR-Experimenten transparenter, vergleichbar und vor allem kritisch betrachtbar zu machen (siehe Kapitel 3.3.1). Im Rahmen guter wissenschaftlicher Praxis bildeten die MIQE-Richtlinien die Grundlage unserer qPCR-Experimente. Im Hinblick auf zukünftige nationale und internationale Studien zu diesem Thema wurde das gesamte Versuchs-Setup zur Untersuchung von Blutproben zur Bestimmung von Expressionsprofilen geprüft und gegebenenfalls überarbeitet. Es wurden u. a. die Housekeeping-Gene erneut auf ihre Eignung überprüft und optimiert, das Blutentnahmesystem vereinheitlicht und damit die Aufarbeitung der Proben standardisiert, die Plattenbelegung angepasst und ein kommerzielles und standardisiertes qPCR-Analyseprogramm zur Datenauswertung eingeführt (qbase^{Plus}, Fa. Biogazelle).

Die vielleicht wichtigste Rolle bei der relativen Quantifizierung spielen die HKGs. Sie haben einen starken Einfluss auf die Expressionsergebnisse der Zielgene und müssen deshalb optimal auf den qPCR-Assay abgestimmt sein. In allen unseren bisherigen Assays verwendeten wir wie weithin gebräuchlich nur ein HKG zur Normalisierung. Jedoch zeigten verschiedene Studien, dass die Expression der HKGs beträchtlich variieren kann (Hellemans et al. 2007). Die konventionelle Normalisierung mit nur einem HKG führt zu einer fehlerhaften Normalisierung vom 3,0-fachen bis hin zum 6,4-fachen in 25 % bzw. 10 % der Fälle.

Die Aussagekraft der aus den Ergebnissen gezogenen Rückschlüsse ist stark von den gewählten Kontrollen abhängig. Anhand von Studien kamen Hellemans et al. (2007) zu dem Schluss, dass es nicht das ideale und universelle HKG für alle qPCR-Assays gibt. Basierend auf der Erkenntnis entwickelten sie einen Algorithmus zur Bestimmung der optimalen HKGs für jeden individuellen Assay – die Analysesoftware „geNorm“.

Für die weiteren geplanten Patientenscreening und rückwirkend für den Zellkulturversuch wurde das von uns als HKG verwendete *Tubulin alpha 1b* mittels „geNorm“ auf seine Stabilität überprüft. Dieses HKG wurde aus Vorversuchen übernommen, in denen es sich als ein stabil exprimiertes Gen erwies. Im Hinblick auf die zukünftigen Patientenscreenings war für uns eine Optimierung der HKGs hinsichtlich der Anzahl und Auswahl von entscheidender Bedeutung.

Zur Ermittlung der M-Werte für den Zellkulturversuch wurden elf Proben pro Zelllinie mit neun potentiellen HKGs getestet. Für diese Bestimmung wurde die von Hellemans et al. (2007) empfohlene Plattenbelegung nach dem Proben-Maximierungs-Prinzip (sample-maximization) angewendet. Letzteres bietet im Gegensatz zur Gen-Maximierung den Vorteil, dass die Analyse nicht oder bei mehr als elf Proben nur sehr gering (über einen optimalen IRC) von technischen Variationen zwischen den Proben der einzelnen PCR-Läufe beeinflusst wird (**Abb. 37** im Anhang). Zum Vergleich der Expressionslevel eines spezifischen Gens in unterschiedlichen Proben wird diese Methode der Plattenbelegung sehr empfohlen.

Im Zellkulturversuch konnte *Tubulin alpha 1b* im Vergleich mit acht häufig verwendeten HKGs in beiden Zelllinien als ein stabil exprimiertes Gen beurteilt werden. In einem homogenen Probenpool, wie in diesem Fall die Zellkultur, wird der Grenzwert für die Stabilität mit $M = 0,5$ ausgegeben. In den Jurkat-Zellen lag der M-Wert mit 0,172 weit unterhalb des Grenzwertes von $M = 0,5$. Es wurde als das zweitstabilste Gen mit einer sehr hohen Stabilität ($M < 0,2$) getestet und ist somit als HKG optimal gewählt. Bei den JVM-13-Zellen lag der M-Wert von 0,417 ebenfalls unterhalb des Grenzwertes von $M = 0,5$ und kann als ein stabil exprimiertes HKG verwendet werden. Ungeachtet dessen wurden zum Zeitpunkt 72 h in beiden Zelllinien Abweichungen im Ct-Wert festgestellt, weshalb dieser Zeitpunkt aus allen Berechnungen ausgeschlossen werden musste.

Zur Bestimmung der M- und V-Werte für die Patientenversuche wurden elf Proben als Stichprobenauswahl mit elf potentiellen HKGs getestet. Das Setup des qPCR-Laufs war so optimiert, dass alle Proben für ein zu untersuchendes HKG im selben Lauf gemessen wurden (Proben-Maximierung nach Hellemans et al. 2007)). Die Berechnung des M-Wertes für *Tubulin alpha 1b* in humanen Leukozyten ergab 0,246. Unterhalb des Grenzwerts liegend, kann es für dieses Versuchssetup als ein stabil exprimiertes Gen verwendet werden. Hinsichtlich der Optimierung des Assays wurde eine Kombination aus den beiden HKGs *B2M* und *ACTB* empfohlen. Beide Gene erreichten M-Werte unterhalb von 0,2. Dies zeigt eine sehr hohe Stabilität und wird gewöhnlich bei der Verwendung von genomischer DNA als Probe oder bei sehr stabil exprimierten Genen beobachtet. Vandesompele et al. (2002) beschreibt *B2M* als eine gute Wahl für die Normalisierung von Expressionswerten in Leukozyten, obwohl es allgemein als eines der weniger stabilen HKG gilt. Das zeigt deutlich, dass die Wahl des besten Housekeeping-Gens stark vom Gewebe bzw. den Zellen abhängig ist und immer individuell ermittelt werden sollte.

Die optimale Anzahl an zu verwendenden HKGs für eine zuverlässige Normalisierung lag in der vorliegenden Studie bei zwei. Der optimale Normalisierungsfaktor kann als geometrisches Mittel aus den Expressionswerten von *B2M* und *ACTB* berechnet werden. Die Hinzunahme von *YWHAZ* als drittstabilstes HKG hat keinen signifikanten Effekt, da der V-Wert beim Vergleich zwei zu drei HKGs sehr niedrig ist (unterhalb des Grenzwerts von $V = 0,15$). Generell lagen alle berechneten V-Werte unterhalb des Grenzwerts. Hellemans et al. (2007) empfehlen die Verwendung von drei HKGs zur optimalen Normalisierung. Im vorliegenden Fall brachte jedoch die Hinzunahme eines dritten HKGs keine signifikant verbesserte, diagnostische Aussagekraft. Entsprechend kann auch unter Berücksichtigung der Wirtschaftlichkeit die Verwendung von *B2M* und *ACTB* als hinreichend für eine genaue Diagnostik angesehen werden. Nach der Optimierung der HKGs war es von Interesse, inwieweit diese Änderung Einfluss auf das Ergebnis der relativen Quantifizierung hat. Dazu wurden stichprobenartig 20 Proben (RNA-Isolierung aus Vollblut) untersucht. Die Normalisierung der Ct-Werte erfolgte zum einen nur mit dem HKG *Tubulin alpha 1b* und zum anderen mit dem Normalisierungsfaktor aus den HKGs *B2M* und *ACTB*. Das Ergebnis der vergleichenden Berechnungen zeigte keinen bzw. nur einen geringen Unterschied der Expressionswerte der 20 Proben. Die Ergebnisse aus den Patientenversuchen können somit als prinzipiell zuverlässig eingestuft werden, zumal *Tubulin alpha 1b* als ein für dieses Setup stabil exprimiertes HKG eingestuft wurde.

Auf Basis der MIQE-Richtlinien wurde unter Verwendung von „geNorm“ das in der vorliegenden Arbeit verwendete HKG Tubulin alpha 1b als stabil exprimiertes Gen bestätigt. Für zukünftige Projekte im Bereich Patientenscreening wurde mit der Neubestimmung der HKGs B2M und ACTB das qPCR-Setup hinsichtlich Auswahl und Anzahl optimiert.

5.5 AUSBLICKE

Die Problematik der zuverlässigen Beurteilung des Mg-Status des Körpers ist generell anerkannt. Die Herausforderungen ergeben sich aus der Verteilung von Magnesium im Körper und der Aufrechterhaltung der Homöostase (siehe Kapitel 2.4.1 in der Literaturübersicht). Die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer, präziser und praxistauglicher Methoden ist offensichtlich. Dabei steht vor allem die Bestimmung der intrazellulären Mg-Konzentration im Fokus. Genetische Faktoren, die sowohl den intrazellulären als auch den extrazellulären Mg-Status kontrollieren, sollten bei der Suche nach neuen Biomarkern bedacht werden. Der Fortschritt bei der Identifizierung Mg-sensitiver Gene eröffnet neue Möglichkeiten für die Erforschung neuer, exakter Methoden der Beurteilung des Mg-Status.

Die AG Magnesiumtransport des Instituts für Veterinär-Physiologie der FU Berlin ist zurzeit an verschiedenen internationalen Kooperationsprojekten mit Partnern aus Schweden und Mexiko beteiligt. Ziel dieser umfangreichen Studien ist u. a. die Identifizierung Mg-sensitiver Gene bei schwangeren Frauen und die systematische Untersuchung des Einflusses einer Mg-Supplementierung auf die Entwicklung einer Prä-/Eklampsie.

Analog zu der hier vorgestellten *Diabetes-mellitus*-Typ-II-Studie sind Studien mit Patienten mit Osteoporose- oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen unter besonderer Beachtung der Magnesiumzufuhr über die Nahrung und des klinischen Protokolls zur Identifizierung möglicher Korrelationen denkbar. Die Ergebnisse dieser, auf fundierter Diagnostik basierenden Studien, dienen der Entwicklung von Ernährungsempfehlungen, die sich gezielt vor allem an Risikogruppen richten und zu einer Risikosenkung beitragen können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Validierung magnesiumsensitiver Gene als Biomarker für den intrazellulären Magnesiumstatus von *Diabetes-mellitus*-Typ-II-Patienten

In einem Zellkulturversuch wurde die Expression magnesiumsensitiver Gene in Abhängigkeit von der extrazellulären Mg-Konzentration untersucht. Unter hypomagnesiämischen Bedingungen exprimierten Zellen der Linien JVM-13 und Jurkat die Gene *SLC41A1*, *CNNM2*, *TRPM7*, *NIPA1* und *N33* besonders stark. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die Bestimmung der Expressionsraten dieser Gene Rückschlüsse hinsichtlich des intrazellulären Magnesiumstatus gezogen werden können. Das Gen *CNNM2* wurde als möglicher Biomarker für ein Screening von Patienten mit *Diabetes mellitus* Typ II getestet. Die Expressionswerte des Gens wurden mit den korrespondierenden $[Mg]_{\text{Plasma}}$ - und $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Konzentrationen der Leukozyten in Beziehung gesetzt. Obwohl die $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Konzentration bei 114 von 115 Patienten im Normbereich lag, wurde bei etwa $\frac{1}{4}$ aller Patienten eine $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Konzentration unter 0,55 mmol/l nachgewiesen. Ein intrazelluläres Magnesiumdefizits korrelierte mit einer erhöhten Expression des Gens *CNNM2*. Die Ergebnisse des Patientenscreenings belegen, dass ein Magnesiummangel des Körpers durch die relative Expression des Gens *CNNM2* zuverlässiger als durch die $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Konzentration detektiert wird. Wurden mit der $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Messung 96 % der defizienten Patienten nicht erkannt, waren es bei der Expressionswert-Bestimmung nur 14 %. Als magnesiumdefizient gilt ein $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Wert von unter 0,55mmol.

Die tägliche Mg-Supplementierung von 300 mg über einen Monat normalisierte sowohl die Expression des Gens *CNNM2* als auch die $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Konzentration. Letztere stieg im Mittel von 0,43 mmol/l auf 0,61 mmol/l signifikant an, während der mittlere $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Wert weiterhin im Normbereich lag. Die Bestimmung der Expression des magnesiumsensitiven Gens *CNNM2* erlaubt die Identifizierung von Patienten, die ein intrazelluläres Defizit aufweisen und auf eine gezielte Mg-Supplementierung ansprechen. Aufgrund dessen kommt das Gen *CNNM2* als ein möglicher Biomarker bei der Bestimmung des Magnesiumstatus des Körpers, insbesondere bei *Diabetes mellitus* Typ II, in Frage.

Im Hinblick auf umfangreichere, zukünftige nationale sowie internationale Studien auf diesem Gebiet wurde das gesamte Versuchsssetup anhand der MIQE-Richtlinien optimiert. Unter Verwendung der Analysesoftware „geNorm“ wurden die optimalen Housekeeping Gene (HKGs) für Genexpressionsanalysen in JVM-13- und Jurkat-Zellen sowie humanen Leukozyten bestimmt. Hierbei wurde für JVM-13-Zellen *B2M* und *YWHAZ*, für Jurkat-Zellen *B2M* und *TUBA1B* und für humane Leukozyten *B2M* und *ACTB* als die stabilsten HKGs

ermittelt. Die Normalisierung mit *TUBA1B* im Vergleich zu *B2M* und *ACTB* zeigte keine oder nur sehr geringe Abweichungen der GED-Werte der 20 Proben. Das HKG *TUBA1B* ist in Jurkat-, JVM-13-Zellen und humanen Leukozyten ein stabil exprimiertes Gen. Den Berechnungen der Expressionsdaten der vorliegenden Arbeit liegt somit eine zuverlässige Normalisierung zugrunde.

7 SUMMARY

Validation of magnesium sensitive genes as a biomarker for the intracellular magnesium status of patients with diabetes mellitus

The expression of magnesium sensitive genes as a function of the extracellular magnesium concentration was investigated in a cell culture experiment. At low magnesium condition, cells of JVM-13 and Jurkat lines exhibited high expression of *SLC41A1*, *CNNM2*, *TRPM7*, *NIPA1* and *N33* genes. It was hypothesized, that with knowledge of the expression rate of these genes, one gains insight about the intracellular magnesium status. The capability of the *CNNM2* gene as a biomarker was tested in a screening of patients diagnosed with diabetes mellitus type II. The expression levels of the gene were compared to the corresponding $[Mg]_{\text{plasma}}$ and $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ concentration of leukocytes. Although the $[Mg]_{\text{plasma}}$ concentrations of 114 from 115 patients were within normal range, about a quarter of all patients showed a low $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ concentration. However, an intracellular magnesium deficiency correlated with an increased expression of the *CNNM2* gene. The results of the screening showed that a magnesium deficiency of the body is more reliably detected by the relative expression of the gene *CNNM2* than by the $[Mg]_{\text{plasma}}$ concentration. An evaluation of the $[Mg]_{\text{plasma}}$ concentration failed to detect 96% of the patients determined to be deficient by intra-cellular measurement whereas determination by gene *CNNM2* expression missed only 14%. The daily supplementation of 300 mg magnesium over the course of one month normalized both the gene *CNNM2* expression and the $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ concentration. The average $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ concentration increased significantly from 0.43 mmol/l to 0.61 mmol/l while the mean of the $[Mg]_{\text{plasma}}$ value remained within the normal range. Determination of the expression of the magnesium sensitive gene *CNNM2* enables the identification of patients with an intracellular deficiency and might respond to a purposeful magnesium supplementation. Therefore the *CNNM2* gene is a promising biomarker of the magnesium status, especially in diabetes mellitus type II.

To optimize the assay for extensive future studies in this field of research, the experiments were reviewed and the design improved according to the MIQE guidelines. The ideal housekeeping genes for an expression analysis in JVM-13 and Jurkat cells as well in leukocytes were determined using the analysis software „geNorm“.

- Expression rate analysis in JVM-13 cells was best normalized by *YWHAZ*.
- Expression rate analysis in Jurkat cells was best normalized by *TUBA1B*.
- Expression rate analysis in leukocytes was best normalized by *ACTB*.

- *B2M* was equally suitable as HKG for JVM-13 and Jurkat cells, as well as for human leukocytes.

A comparison of the normalizations by *B2M*, *ACTB* and *TUBA1B* showed no or very small deviations of the GED values of 20 samples. The housekeeping gene *TUBA1B* used for normalization was a stably expressed gene in JVM-13 and Jurkat cells and human leukocytes. Therefore the calculations of the expression data in this thesis were based on a reliable normalization.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Agus, Z. S. und Morad, M. (1991)
"Modulation of cardiac ion channels by magnesium." Annu Rev Physiol **53**: 299-307, PMID: 1710436.
- al-Ghamdi, S. M., Cameron, E. C. und Sutton, R. A. (1994)
"Magnesium deficiency: pathophysiologic and clinical overview." Am J Kidney Dis **24**(5): 737-752, PMID: 7977315.
- Alfrey, A. C., Miller, N. L. und Butkus, D. (1974)
"Evaluation of body magnesium stores." J Lab Clin Med **84**(2): 153-162, PMID: 4843222.
- Altura, B. M. und Altura, B. T. (1984)
"Magnesium, electrolyte transport and coronary vascular tone." Drugs **28 Suppl 1**: 120-142, PMID: 6149922.
- Alzaid, A. A., Dinneen, S. F., Moyer, T. P. und Rizza, R. A. (1995)
"Effects of insulin on plasma magnesium in noninsulin-dependent diabetes mellitus: evidence for insulin resistance." J Clin Endocrinol Metab **80**(4): 1376-1381, PMID: 7714113.
- Anast, C. S., Winnacker, J. L., Forte, L. R. und Burns, T. W. (1976)
"Impaired release of parathyroid hormone in magnesium deficiency." J Clin Endocrinol Metab **42**(4): 707-717, PMID: 177448.
- Arnaud, M. J. (2008)
"Update on the assessment of magnesium status." Br J Nutr **99 Suppl 3**: S24-36, PMID: 18598586.
- Ascherio, A., Rimm, E. B., Giovannucci, E. L., Colditz, G. A., Rosner, B., Willett, W. C., Sacks, F. und Stampfer, M. J. (1992)
"A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men." Circulation **86**(5): 1475-1484, PMID: 1330360.
- Aslanyan, S., Weir, C. J., Muir, K. W. und Lees, K. R. (2007)
"Magnesium for treatment of acute lacunar stroke syndromes: further analysis of the IMAGES trial." Stroke **38**(4): 1269-1273, PMID: 17347471.
- Bapty, B. W., Dai, L. J., Ritchie, G., Canaff, L., Hendy, G. N. und Quamme, G. A. (1998)
"Mg²⁺/Ca²⁺ sensing inhibits hormone-stimulated Mg²⁺ uptake in mouse distal convoluted tubule cells." Am J Physiol **275**(3 Pt 2): F353-360, PMID: 9729507.
- Bar, T., Stahlberg, A., Muszta, A. und Kubista, M. (2003)
"Kinetic Outlier Detection (KOD) in real-time PCR." Nucleic Acids Res **31**(17): e105, PMID: 12930979.

- Barbagallo, M. und Dominguez, L. J. (2007)
 "Magnesium metabolism in type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and insulin resistance." Arch Biochem Biophys **458**(1): 40-47, PMID: 16808892.
- Barbagallo, M., Dominguez, L. J., Galioto, A., Ferlisi, A., Cani, C., Malfa, L., Pineo, A., Busardo, A. und Paolisso, G. (2003)
 "Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X." Mol Aspects Med **24**(1-3): 39-52, PMID: 12537988.
- Barbagallo, M., Dominguez, L. J. und Resnick, L. M. (2007)
 "Magnesium metabolism in hypertension and type 2 diabetes mellitus." Am J Ther **14**(4): 375-385, PMID: 17667214.
- Barbagallo, M., Gupta, R. K., Bardicef, O., Bardicef, M. und Resnick, L. M. (1997)
 "Altered ionic effects of insulin in hypertension: role of basal ion levels in determining cellular responsiveness." J Clin Endocrinol Metab **82**(6): 1761-1765, PMID: 9177378.
- Barbagallo, M., Gupta, R. K. und Resnick, L. M. (1993)
 "Cellular ionic effects of insulin in normal human erythrocytes: a nuclear magnetic resonance study." Diabetologia **36**(2): 146-149, PMID: 8458528.
- Belfort, M. A. und Moise, K. J., Jr. (1992)
 "Effect of magnesium sulfate on maternal brain blood flow in preeclampsia: a randomized, placebo-controlled study." Am J Obstet Gynecol **167**(3): 661-666, PMID: 1530019.
- Belin, R. J. und He, K. (2007)
 "Magnesium physiology and pathogenic mechanisms that contribute to the development of the metabolic syndrome." Magnes Res **20**(2): 107-129, PMID: 18062585.
- Berggren, P. O., Bergsten, P., Gylfe, E., Larsson, R. und Hellman, B. (1983)
 "Interactions between magnesium and calcium in beta-cell-rich pancreatic islets." Am J Physiol **244**(6): E541-547, PMID: 6344652.
- Böni-Schnetzler, M., Scott, W., Waugh, S. M., DiBella, E. und Pilch, P. F. (1987)
 "The insulin receptor. Structural basis for high affinity ligand binding." J Biol Chem **262**(17): 8395-8401, PMID: 3597378.
- Bustin, S. A. (2004)
A-Z of Quantitative PCR, Intl Univ Line, ISBN: 0963681788 (978-0963681782)
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. und Wittwer, C. T. (2009)
 "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." Clin Chem **55**(4): 611-622, PMID: 19246619.
- Carpentieri, U., Myers, J., Daeschner, C. W., 3rd und Haggard, M. E. (1988)
 "Effects of iron, copper, zinc, calcium, and magnesium on human lymphocytes in culture." Biol Trace Elem Res **16**(2): 165-176, PMID: 2484545.

- Casthely, P. A., Yoganathan, T., Komer, C. und Kelly, M. (1994)
"Magnesium and arrhythmias after coronary artery bypass surgery." J Cardiothorac Vasc Anesth **8**(2): 188-191, PMID: 7515706.
- Cefaratti, C., Romani, A. und Scarpa, A. (1998)
"Characterization of two Mg²⁺ transporters in sealed plasma membrane vesicles from rat liver." Am J Physiol **275**(4 Pt 1): C995-C1008, PMID: 9755053.
- Cefaratti, C., Romani, A. und Scarpa, A. (2000)
"Differential localization and operation of distinct Mg(2+) transporters in apical and basolateral sides of rat liver plasma membrane." J Biol Chem **275**(6): 3772-3780, PMID: 10660526.
- Cevette, M., Barrs, D., Patel, A., Conroy, K., Sydlowski, S., Nelson, B. und Stepanek, J. (2010)
"Phase 2 study examining magnesium-dependent tinnitus." Int Tinnitus J **16**(2): 168-173, PMID: 22249877.
- Chai, J. H., Locke, D. P., Grealley, J. M., Knoll, J. H., Ohta, T., Dunai, J., Yavor, A., Eichler, E. E. und Nicholls, R. D. (2003)
"Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons." Am J Hum Genet **73**(4): 898-925, PMID: 14508708.
- Chakraborti, S., Chakraborti, T., Mandal, M., Mandal, A., Das, S. und Ghosh, S. (2002)
"Protective role of magnesium in cardiovascular diseases: a review." Mol Cell Biochem **238**(1-2): 163-179, PMID: 12349904.
- Chaudhary, D. P., Boparai, R. K., Sharma, R. und Bansal, D. D. (2004)
"Studies on the development of an insulin resistant rat model by chronic feeding of low magnesium high sucrose diet." Magnes Res **17**(4): 293-300, PMID: 15726905.
- Chaudhary, D. P., Sharma, R. und Bansal, D. D. (2010)
"Implications of magnesium deficiency in type 2 diabetes: a review." Biol Trace Elem Res **134**(2): 119-129, PMID: 19629403.
- Chubanov, V., Mederos y Schnitzler, M., Waring, J., Plank, A. und Gudermann, T. (2005)
"Emerging roles of TRPM6/TRPM7 channel kinase signal transduction complexes." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **371**(4): 334-341, PMID: 15902429.
- Chubanov, V., Waldegger, S., Mederos y Schnitzler, M., Vitzthum, H., Sassen, M. C., Seyberth, H. W., Konrad, M. und Gudermann, T. (2004)
"Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2894-2899, PMID: 14976260.
- Cittadini, A., Wolf, F. I., Bossi, D. und Calviello, G. (1991)
"Magnesium in normal and neoplastic cell proliferation: state of the art on in vitro data." Magnes Res **4**(1): 23-33, PMID: 1907476.

- Clark, K., Langeslag, M., van Leeuwen, B., Ran, L., Ryazanov, A. G., Figdor, C. G., Moolenaar, W. H., Jalink, K. und van Leeuwen, F. N. (2006)
"TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion." Embo J **25**(2): 290-301, PMID: 16407977.
- Classen, H. G. und Nowitzki, S. (1990)
"[Clinical significance of magnesium. 1: Distribution in the organism, evaluation of current supply]." Fortschr Med **108**(8): 148-151, PMID: 2186988.
- Coetzee, E. J., Dommissie, J. und Anthony, J. (1998)
"A randomised controlled trial of intravenous magnesium sulphate versus placebo in the management of women with severe pre-eclampsia." Br J Obstet Gynaecol **105**(3): 300-303, PMID: 9532990.
- Colditz, G. A., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rosner, B., Willett, W. C. und Speizer, F. E. (1992)
"Diet and risk of clinical diabetes in women." Am J Clin Nutr **55**(5): 1018-1023, PMID: 1315120.
- Cole, D. E. und Quamme, G. A. (2000)
"Inherited disorders of renal magnesium handling." J Am Soc Nephrol **11**(10): 1937-1947, PMID: 11004227.
- Costello, R. B. und Moser-Veillon, P. B. (1992)
"A review of magnesium intake in the elderly. A cause for concern?" Magnes Res **5**(1): 61-67, PMID: 1591145.
- Cowan, J. A. (1995)
The Biological Chemistry of Magnesium, Wiley-VCH Verlag GmbH, Ed.:1, ISBN: 978-0471185833
- D'Angelo, E. K., Singer, H. A. und Rembold, C. M. (1992)
"Magnesium relaxes arterial smooth muscle by decreasing intracellular Ca²⁺ without changing intracellular Mg²⁺." J Clin Invest **89**(6): 1988-1994, PMID: 1602005.
- Dai, L. J., Ritchie, G., Kerstan, D., Kang, H. S., Cole, D. E. und Quamme, G. A. (2001)
"Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule." Physiol Rev **81**(1): 51-84, PMID: 11152754.
- Darlu, P., Rao, D. C., Henrotte, J. G. und Lalouel, J. M. (1982)
"Genetic regulation of plasma and red blood cell magnesium concentrations in man. I. Univariate and bivariate path analyses." Am J Hum Genet **34**(6): 874-887, PMID: 6891178.
- de Baaij, J. H., Stuver, M., Meij, I. C., Lainez, S., Kopplin, K., Venselaar, H., Muller, D., Bindels, R. J. und Hoenderop, J. G. (2012)
"Membrane Topology and Intracellular Processing of Cyclin M2 (CNNM2)." J Biol Chem **287**(17): 13644-13655, PMID: 22399287.

- de Lordes Lima, M., Cruz, T., Pousada, J. C., Rodrigues, L. E., Barbosa, K. und Cangucu, V. (1998)
 "The effect of magnesium supplementation in increasing doses on the control of type 2 diabetes." Diabetes Care **21**(5): 682-686, PMID: 9589224.
- de Luca, C. und Olefsky, J. M. (2008)
 "Inflammation and insulin resistance." FEBS Lett **582**(1): 97-105, PMID: 18053812.
- de Rouffignac, C. und Quamme, G. (1994)
 "Renal magnesium handling and its hormonal control." Physiol Rev **74**(2): 305-322, PMID: 8171116.
- de Valk, H. W. (1999)
 "Magnesium in diabetes mellitus." Neth J Med **54**(4): 139-146, PMID: 10218382.
- Del Castillo, J. und Engbaek, L. (1953)
 "The nature of the neuromuscular block produced by magnesium." J Physiol **120**(4): 54P, PMID: 13070255.
- Delva, P., Pastori, C., Montesi, G., Degan, M., Micciolo, R., Paluani, F. und Lechi, A. (1998)
 "Intralymphocyte free magnesium and calcium and insulin tolerance test in a group of essential hypertensive patients." Life Sci **63**(16): 1405-1415, PMID: 9952286.
- Demeuse, P., Penner, R. und Fleig, A. (2006)
 "TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain." J Gen Physiol **127**(4): 421-434, PMID: 16533898.
- Dhanasekaran, S., Doherty, T. M. und Kenneth, J. (2010)
 "Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification." J Immunol Methods **354**(1-2): 34-39, PMID: 20109462.
- Di Stefano, A., Elalouf, J. M., Garel, J. M. und de Rouffignac, C. (1985)
 "Modulation by calcitonin of magnesium and calcium urinary excretion in the rat." Kidney Int **27**(2): 394-400, PMID: 3990091.
- Di Stefano, A., Wittner, M., Nitschke, R., Braitsch, R., Greger, R., Bailly, C., Amiel, C., Roinel, N. und de Rouffignac, C. (1990)
 "Effects of parathyroid hormone and calcitonin on Na⁺, Cl⁻, K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ transport in cortical and medullary thick ascending limbs of mouse kidney." Pflugers Arch **417**(2): 161-167, PMID: 2084613.
- Dimai, H. P., Porta, S., Wirnsberger, G., Lindschinger, M., Pamperl, I., Dobnig, H., Wilders-Truschnig, M. und Lau, K. H. (1998)
 "Daily oral magnesium supplementation suppresses bone turnover in young adult males." J Clin Endocrinol Metab **83**(8): 2742-2748, PMID: 9709941.
- Djurhuus, M. S., Skott, P., Hother-Nielsen, O., Klitgaard, N. A. und Beck-Nielsen, H. (1995)
 "Insulin increases renal magnesium excretion: a possible cause of magnesium depletion in hyperinsulinaemic states." Diabet Med **12**(8): 664-669, PMID: 7587003.

- Djurhuus, M. S., Skott, P., Vaag, A., Hother-Nielsen, O., Andersen, P., Parving, H. H. und Klitgaard, N. A. (2000)
"Hyperglycaemia enhances renal magnesium excretion in type 1 diabetic patients." Scand J Clin Lab Invest **60**(5): 403-409, PMID: 11003260.
- Dong, J. Y., Xun, P., He, K. und Qin, L. Q. (2011)
"Magnesium intake and risk of type 2 diabetes: meta-analysis of prospective cohort studies." Diabetes Care **34**(9): 2116-2122, PMID: 21868780.
- Dorovkov, M. V. und Ryazanov, A. G. (2004)
"Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase." J Biol Chem **279**(49): 50643-50646, PMID: 15485879.
- Eaton, S. B. und Eaton, S. B., 3rd (2000)
"Paleolithic vs. modern diets--selected pathophysiological implications." Eur J Nutr **39**(2): 67-70, PMID: 10918987.
- Eby, G. A. und Eby, K. L. (2006)
"Rapid recovery from major depression using magnesium treatment." Med Hypotheses **67**(2): 362-370, PMID: 16542786.
- Elin, R. J. (1987)
"Assessment of magnesium status." Clin Chem **33**(11): 1965-1970, PMID: 3315301.
- Elin, R. J. (1988)
"Magnesium metabolism in health and disease." Dis Mon **34**(4): 161-218, PMID: 3282851.
- Elin, R. J. (1991)
"Laboratory tests for the assessment of magnesium status in humans." Magnes Trace Elem **10**(2-4): 172-181, PMID: 1844550.
- Elin, R. J. (2010)
"Assessment of magnesium status for diagnosis and therapy." Magnes Res **23**(4): S194-198, PMID: 20736141.
- Elin, R. J., Utter, A., Tan, H. K. und Corash, L. (1980)
"Effect of magnesium deficiency on erythrocyte aging in rats." Am J Pathol **100**(3): 765-778, PMID: 6106388.
- Estep, H., Shaw, W. A., Watlington, C., Hobe, R., Holland, W. und Tucker, S. G. (1969)
"Hypocalcemia due to hypomagnesemia and reversible parathyroid hormone unresponsiveness." J Clin Endocrinol Metab **29**(6): 842-848, PMID: 5783583.
- Evangelopoulos, A. A., Vallianou, N. G., Panagiotakos, D. B., Georgiou, A., Zacharias, G. A., Alevra, A. N., Zalokosta, G. J., Vogiatzakis, E. D. und Avgerinos, P. C. (2008)
"An inverse relationship between cumulating components of the metabolic syndrome and serum magnesium levels." Nutr Res **28**(10): 659-663, PMID: 19083473.

- Fagan, T. E. und Romani, A. (2000)
"Activation of Na(+)- and Ca(2+)-dependent Mg(2+) extrusion by alpha(1)- and beta-adrenergic agonists in rat liver cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(5): G943-950, PMID: 11052991.
- Fagan, T. E. und Romani, A. (2001)
"alpha(1)-Adrenoceptor-induced Mg²⁺ extrusion from rat hepatocytes occurs via Na(+)-dependent transport mechanism." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(6): G1145-1156, PMID: 11352807.
- Fatemi, S., Ryzen, E., Flores, J., Endres, D. B. und Rude, R. K. (1991)
"Effect of experimental human magnesium depletion on parathyroid hormone secretion and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism." J Clin Endocrinol Metab **73**(5): 1067-1072, PMID: 1939521.
- Fatholahi, M., LaNoue, K., Romani, A. und Scarpa, A. (2000)
"Relationship between total and free cellular Mg(2+) during metabolic stimulation of rat cardiac myocytes and perfused hearts." Arch Biochem Biophys **374**(2): 395-401, PMID: 10666323.
- Fawcett, W. J., Haxby, E. J. und Male, D. A. (1999)
"Magnesium: physiology and pharmacology." Br J Anaesth **83**(2): 302-320, PMID: 10618948.
- Feillet-Coudray, C., Coudray, C., Gueux, E., Mazur, A. und Rayssiguier, Y. (2002)
"A new approach to evaluate magnesium status: determination of exchangeable Mg pool masses using Mg stable isotope." Magnes Res **15**(3-4): 191-198, PMID: 12635871.
- Feray, J. C. und Garay, R. (1986)
"An Na⁺-stimulated Mg²⁺-transport system in human red blood cells." Biochim Biophys Acta **856**(1): 76-84, PMID: 3955035.
- Feray, J. C. und Garay, R. (1987)
"A one-to-one Mg²⁺:Mn²⁺ exchange in rat erythrocytes." J Biol Chem **262**(12): 5763-5768, PMID: 3571233.
- Feray, J. C. und Garay, R. (1988)
"Demonstration of a Na⁺: Mg²⁺ exchange in human red cells by its sensitivity to tricyclic antidepressant drugs." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **338**(3): 332-337, PMID: 3194041.
- Ferre, S., Hoenderop, J. G. und Bindels, R. J. (2011)
"Insight into renal Mg²⁺ transporters." Curr Opin Nephrol Hypertens **20**(2): 169-176, PMID: 21191290.
- Ferreira, A., Rivera, A. und Romero, J. R. (2004)
"Na⁺/Mg²⁺ exchange is functionally coupled to the insulin receptor." J Cell Physiol **199**(3): 434-440, PMID: 15095290.

- Fine, K. D., Santa Ana, C. A. und Fordtran, J. S. (1991)
"Diagnosis of magnesium-induced diarrhea." N Engl J Med **324**(15): 1012-1017, PMID: 2005938.
- Fine, K. D., Santa Ana, C. A., Porter, J. L. und Fordtran, J. S. (1991)
"Intestinal absorption of magnesium from food and supplements." J Clin Invest **88**(2): 396-402, PMID: 1864954.
- Fink, J. K., Jones, S. M., Sharp, G. B., Lange, B. M., Otterud, B. und Leppert, M. (1996)
"Hereditary spastic paraplegia linked to chromosome 15q: Analysis of candidate genes." Neurology **46**(3): 835-836, PMID: 8618696.
- Fink, J. K., Sharp, G. B., Lange, B. M., Wu, C. B., Haley, T., Otterud, B., Peacock, M. und Leppert, M. (1995)
"Autosomal dominant, familial spastic paraplegia, type I: clinical and genetic analysis of a large North American family." Neurology **45**(2): 325-331, PMID: 7854534.
- Flatman, P. W. (1991)
"Mechanisms of magnesium transport." Annu Rev Physiol **53**: 259-271, PMID: 2042962.
- Flatman, P. W. und Lew, V. L. (1980)
"Magnesium buffering in intact human red blood cells measured using the ionophore A23187." J Physiol **305**: 13-30, PMID: 6777486.
- Flatman, P. W. und Lew, V. L. (1981)
"The magnesium dependence of sodium-pump-mediated sodium-potassium and sodium-sodium exchange in intact human red cells." J Physiol **315**: 421-446, PMID: 6796677.
- Flatman, P. W. und Smith, L. M. (1990)
"Magnesium transport in ferret red cells." J Physiol **431**: 11-25, PMID: 2100303.
- Flink, E. B. (1986)
"Magnesium deficiency in alcoholism." Alcohol Clin Exp Res **10**(6): 590-594, PMID: 3544909.
- Freedman, A. M., Cassidy, M. M. und Weglicki, W. B. (1991)
"Magnesium-deficient myocardium demonstrates an increased susceptibility to an in vivo oxidative stress." Magnes Res **4**(3-4): 185-189, PMID: 1799553.
- Freitag, J. J., Martin, K. J., Conrades, M. B., Bellorin-Font, E., Teitelbaum, S., Klahr, S. und Slatopolsky, E. (1979)
"Evidence for skeletal resistance to parathyroid hormone in magnesium deficiency. Studies in isolated perfused bone." J Clin Invest **64**(5): 1238-1244, PMID: 227929.
- Freshney, R. I. (1987)
Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Alan R. Liss, Inc., New York, Ed.:2., ISBN: 0845142410 (978-0845142417)

- Fuller, K., Owens, J. M. und Chambers, T. J. (1998)
"Induction of osteoclast formation by parathyroid hormone depends on an action on stromal cells." J Endocrinol **158**(3): 341-350, PMID: 9846163.
- Garshasbi, M., Hadavi, V., Habibi, H., Kahrizi, K., Kariminejad, R., Behjati, F., Tzschach, A., Najmabadi, H., Ropers, H. H. und Kuss, A. W. (2008)
"A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation." Am J Hum Genet **82**(5): 1158-1164, PMID: 18452889.
- Garshasbi, M., Kahrizi, K., Hosseini, M., Nouri Vahid, L., Falah, M., Hemmati, S., Hu, H., Tzschach, A., Ropers, H. H., Najmabadi, H. und Kuss, A. W. (2011)
"A novel nonsense mutation in TUSC3 is responsible for non-syndromic autosomal recessive mental retardation in a consanguineous Iranian family." Am J Med Genet A **155A**(8): 1976-1980, PMID: 21739581.
- Gesek, F. A. und White, K. E. (1997)
"Molecular and functional identification of beta-adrenergic receptors in distal convoluted tubule cells." Am J Physiol **272**(6 Pt 2): F712-720, PMID: 9227631.
- Glei, M. und Anke, M. (1995)
"Der Magnesiumgehalt der Lebensmittel und Getränke und die Magnesiumaufnahme Erwachsener in Deutschland." Magnesium-Bulletin **17**: 22-28, PMID.
- Goytain, A., Hines, R. M., El-Husseini, A. und Quamme, G. A. (2007)
"NIPA1 (SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg²⁺ transporter." J Biol Chem **282**(11): 8060-8068, PMID: 17166836.
- Goytain, A. und Quamme, G. A. (2005)
"Functional characterization of ACDP2 (ancient conserved domain protein), a divalent metal transporter." Physiol Genomics **22**(3): 382-389, PMID: 15899945.
- Goytain, A. und Quamme, G. A. (2005)
"Functional characterization of human SLC41A1, a Mg²⁺ transporter with similarity to prokaryotic MgtE Mg²⁺ transporters." Physiol Genomics **21**(3): 337-342, PMID: 15713785.
- Goytain, A. und Quamme, G. A. (2005)
"Functional characterization of the mouse [corrected] solute carrier, SLC41A2." Biochem Biophys Res Commun **330**(3): 701-705, PMID: 15809054.
- Goytain, A. und Quamme, G. A. (2005)
"Identification and characterization of a novel mammalian Mg²⁺ transporter with channel-like properties." BMC Genomics **6**: 48, PMID: 15804357.
- Groenestege, W. M., Hoenderop, J. G., van den Heuvel, L., Knoers, N. und Bindels, R. J. (2006)
"The epithelial Mg²⁺ channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg²⁺ content and estrogens." J Am Soc Nephrol **17**(4): 1035-1043, PMID: 16524949.

- Grubbs, R. D., Collins, S. D. und Maguire, M. E. (1984)
"Differential compartmentation of magnesium and calcium in murine S49 lymphoma cells." J Biol Chem **259**(19): 12184-12192, PMID: 6480604.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R. Y. (1985)
"A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450, PMID: 3838314.
- Gueux, E. und Rayssiguier, Y. (1983)
"The effect of magnesium deficiency on glucose stimulated insulin secretion in rats." Horm Metab Res **15**(12): 594-597, PMID: 6363243.
- Günther, T. (1993)
"Mechanisms and regulation of Mg²⁺ efflux and Mg²⁺ influx." Miner Electrolyte Metab **19**(4-5): 259-265, PMID: 8264512.
- Günther, T. (2006)
"Concentration, compartmentation and metabolic function of intracellular free Mg²⁺." Magnes Res **19**(4): 225-236, PMID: 17402290.
- Günther, T. (2010)
"The biochemical function of Mg(2)+ in insulin secretion, insulin signal transduction and insulin resistance." Magnes Res **23**(1): 5-18, PMID: 20228013.
- Günther, T. und Vormann, J. (1985)
"Mg²⁺ efflux is accomplished by an amiloride-sensitive Na⁺/Mg²⁺ antiport." Biochem Biophys Res Commun **130**(2): 540-545, PMID: 2992474.
- Günther, T. und Vormann, J. (1987)
"Characterization of Na⁺/Mg²⁺ antiport by simultaneous 28Mg²⁺ influx." Biochem Biophys Res Commun **148**(3): 1069-1074, PMID: 3689385.
- Günther, T. und Vormann, J. (1990)
"Characterization of Na(+)-independent Mg²⁺ efflux from erythrocytes." FEBS Lett **271**(1-2): 149-151, PMID: 2171998.
- Günther, T. und Vormann, J. (1992)
"Activation of Na⁺/Mg²⁺ antiport in thymocytes by cAMP." FEBS Lett **297**(1-2): 132-134, PMID: 1312946.
- Günther, T., Vormann, J. und Forster, R. (1984)
"Regulation of intracellular magnesium by Mg²⁺ efflux." Biochem Biophys Res Commun **119**(1): 124-131, PMID: 6422934.
- Guo, J., Liu, M., Yang, D., Bouxsein, M. L., Thomas, C. C., Schipani, E., Bringhurst, F. R. und Kronenberg, H. M. (2010)
"Phospholipase C signaling via the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is essential for normal bone responses to PTH." Endocrinology **151**(8): 3502-3513, PMID: 20501677.

- Gupta, S. K., Manhas, A. S., Gupta, V. K. und Bhatt, R. (1994)
 "Serum magnesium levels in idiopathic epilepsy." J Assoc Physicians India **42**(6): 456-457, PMID: 7852227.
- Haigney, M. C., Berger, R., Schulman, S., Gerstenblith, G., Tunin, C., Silver, B., Silverman, H. S., Tomaselli, G. und Calkins, H. (1997)
 "Tissue magnesium levels and the arrhythmic substrate in humans." J Cardiovasc Electrophysiol **8**(9): 980-986, PMID: 9300294.
- Haigney, M. C., Silver, B., Tanglao, E., Silverman, H. S., Hill, J. D., Shapiro, E., Gerstenblith, G. und Schulman, S. P. (1995)
 "Noninvasive measurement of tissue magnesium and correlation with cardiac levels." Circulation **92**(8): 2190-2197, PMID: 7554201.
- Handy, R. D., Gow, I. F., Ellis, D. und Flatman, P. W. (1996)
 "Na-dependent regulation of intracellular free magnesium concentration in isolated rat ventricular myocytes." J Mol Cell Cardiol **28**(8): 1641-1651, PMID: 8877774.
- Hardwick, L. L., Jones, M. R., Brautbar, N. und Lee, D. B. (1990)
 "Site and mechanism of intestinal magnesium absorption." Miner Electrolyte Metab **16**(2-3): 174-180, PMID: 2250624.
- Hartwig, A. (2001)
 "Role of magnesium in genomic stability." Mutat Res **475**(1-2): 113-121, PMID: 11295157.
- Hasebe, N. und Kikuchi, K. (2006)
 Cardiovascular Disease and Magesium. New Perspectives in Magnesium Research: Nutrition and Health. Y. Nishizawa, H. Morii and J. Durlach, Springer London, Ed.:1., 227-238, ISBN: 1846283884 (978-1846283888)
- Hayes, J. P., Ryan, M. F., Brazil, N., Riordan, T. O., Walsh, J. B. und Coakley, D. (1989)
 "Serum hypomagnesaemia in an elderly day-hospital population." Ir Med J **82**(3): 117-119, PMID: 2599834.
- He, K., Liu, K., Daviglius, M. L., Morris, S. J., Loria, C. M., Van Horn, L., Jacobs, D. R., Jr. und Savage, P. J. (2006)
 "Magnesium intake and incidence of metabolic syndrome among young adults." Circulation **113**(13): 1675-1682, PMID: 16567569.
- He, Y., Yao, G., Savoia, C. und Touyz, R. M. (2005)
 "Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II." Circ Res **96**(2): 207-215, PMID: 15591230.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. und Vandesomepele, J. (2007)
 "qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data." Genome Biol **8**(2): R19, PMID: 17291332.

- Hermosura, M. C. und Garruto, R. M. (2007)
"TRPM7 and TRPM2-Candidate susceptibility genes for Western Pacific ALS and PD?" Biochim Biophys Acta **1772**(8): 822-835, PMID: 17395433.
- Hill, D. J. und Milner, R. D. (1985)
"Insulin as a growth factor." Pediatr Res **19**(9): 879-886, PMID: 2413420.
- Hollifield, J. W. (1987)
"Magnesium depletion, diuretics, and arrhythmias." Am J Med **82**(3A): 30-37, PMID: 2436474.
- Holroyde, M. J., Robertson, S. P., Johnson, J. D., Solaro, R. J. und Potter, J. D. (1980)
"The calcium and magnesium binding sites on cardiac troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase." J Biol Chem **255**(24): 11688-11693, PMID: 6449512.
- Horne, W. C., Shyu, J. F., Chakraborty, M. und Baron, R. (1994)
"Signal transduction by calcitonin Multiple ligands, receptors, and signaling pathways." Trends Endocrinol Metab **5**(10): 395-401, PMID: 18407235.
- Hornyak, M., Voderholzer, U., Hohagen, F., Berger, M. und Riemann, D. (1998)
"Magnesium therapy for periodic leg movements-related insomnia and restless legs syndrome: an open pilot study." Sleep **21**(5): 501-505, PMID: 9703590.
- Hou, J. und Goodenough, D. A. (2010)
"Claudin-16 and claudin-19 function in the thick ascending limb." Curr Opin Nephrol Hypertens **19**(5): 483-488, PMID: 20616717.
- Huijgen, H. J., van Ingen, H. E., Kok, W. T. und Sanders, G. T. (1996)
"Magnesium fractions in serum of healthy individuals and CAPD patients, measured by an ion-selective electrode and ultrafiltration." Clin Biochem **29**(3): 261-266, PMID: 8740513.
- Hwang, D. L., Yen, C. F. und Nadler, J. L. (1993)
"Insulin increases intracellular magnesium transport in human platelets." J Clin Endocrinol Metab **76**(3): 549-553, PMID: 8445010.
- IDF (2009)
IDF Diabetes Atlas, International Diabetes Federation, Ed.:5., ISBN: 2-930229-28-4 (2. edition)
- Ignoul, S. und Eggermont, J. (2005)
"CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins." Am J Physiol Cell Physiol **289**(6): C1369-1378, PMID: 16275737.
- Iseri, L. T. und French, J. H. (1984)
"Magnesium: nature's physiologic calcium blocker." Am Heart J **108**(1): 188-193, PMID: 6375330.

- Ishimi, Y. (2010)
"[Nutrition and bone health. Magnesium and bone]." Clin Calcium **20**(5): 762-767, PMID: 20445288.
- Itani, S. I., Pories, W. J., Macdonald, K. G. und Dohm, G. L. (2001)
"Increased protein kinase C theta in skeletal muscle of diabetic patients." Metabolism **50**(5): 553-557, PMID: 11319716.
- Itani, S. I., Zhou, Q., Pories, W. J., MacDonald, K. G. und Dohm, G. L. (2000)
"Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity." Diabetes **49**(8): 1353-1358, PMID: 10923637.
- Jurcovicova, J., Krueger, K. S., Nandy, I., Lewis, D. F., Brooks, G. G. und Brown, E. G. (1998)
"Expression of platelet-derived growth factor-A mRNA in human placenta: effect of magnesium infusion in pre-eclampsia." Placenta **19**(5-6): 423-427, PMID: 9699964.
- Kandee, F. R., Balon, E., Scott, S. und Nadler, J. L. (1996)
"Magnesium deficiency and glucose metabolism in rat adipocytes." Metabolism **45**(7): 838-843, PMID: 8692018.
- Kao, W. H., Folsom, A. R., Nieto, F. J., Mo, J. P., Watson, R. L. und Brancati, F. L. (1999)
"Serum and dietary magnesium and the risk for type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study." Arch Intern Med **159**(18): 2151-2159, PMID: 10527292.
- Kasapkara, C. S., Tumer, L., Okur, I. und Hasanoglu, A. (2011)
"A novel mutation of the claudin 16 gene in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis mimicking rickets." Genet Couns **22**(2): 187-192, PMID: 21848011.
- Kawano, S. (1998)
"Dual mechanisms of Mg²⁺ block of ryanodine receptor Ca²⁺ release channel from cardiac sarcoplasmic reticulum." Receptors Channels **5**(6): 405-416, PMID: 9826916.
- Kawasaki, T., Itoh, K. und Kawasaki, M. (1998)
"Reduction in blood pressure with a sodium-reduced, potassium- and magnesium-enriched mineral salt in subjects with mild essential hypertension." Hypertens Res **21**(4): 235-243, PMID: 9877516.
- Kaye, P. und O'Sullivan, I. (2002)
"The role of magnesium in the emergency department." Emerg Med J **19**(4): 288-291, PMID: 12101132.
- Kayne, L. H. und Lee, D. B. (1993)
"Intestinal magnesium absorption." Miner Electrolyte Metab **19**(4-5): 210-217, PMID: 8264506.

- Keenan, D., Romani, A. und Scarpa, A. (1996)
"Regulation of Mg²⁺ homeostasis by insulin in perfused rat livers and isolated hepatocytes." FEBS Lett **395**(2-3): 241-244, PMID: 8898104.
- Kelleher, D. J., Karaoglu, D., Mandon, E. C. und Gilmore, R. (2003)
"Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties." Mol Cell **12**(1): 101-111, PMID: 12887896.
- Kimura, M. (2006)
Overview of Magnesium Nutrition. New Perspectives in Magnesium Research: Nutrition and Health. Y. Nishizawa, H. Morii and J. Durlach, Springer London, Ed.:1., 69-93, ISBN: 1846283884 (978-1846283888)
- Kingston, M. E., Al-Siba'i, M. B. und Skooge, W. C. (1986)
"Clinical manifestations of hypomagnesemia." Crit Care Med **14**(11): 950-954, PMID: 3769507.
- Kisters, K., Gremmler, B. und Hausberg, M. (2008)
"Disturbed Mg⁺⁺ transporters in hypertension." J Hypertens **26**(12): 2450; author reply 2450-2451, PMID: 19008726.
- Kisters, K., Tokmak, F., Kosch, M. und Hausberg, M. (2003)
"Role of the Na⁺/Mg²⁺ exchanger in hypertensions." Am J Hypertens **16**(1): 95-96, PMID: 12517692.
- Knoers, N. V. und Levchenko, E. N. (2008)
"Gitelman syndrome." Orphanet J Rare Dis **3**: 22, PMID: 18667063.
- Kolisek, M., Launay, P., Beck, A., Sponder, G., Serafini, N., Brenkus, M., Froschauer, E. M., Martens, H., Fleig, A. und Schweigel, M. (2008)
"SLC41A1 is a novel mammalian Mg²⁺ carrier." J Biol Chem **283**(23): 16235-16247, PMID: 18367447.
- Kolisek, M., Nestler, A., Vormann, J. und Schweigel-Rontgen, M. (2012)
"Human gene SLC41A1 encodes for the Na⁺/Mg(2)⁺ exchanger." Am J Physiol Cell Physiol **302**(1): C318-326, PMID: 22031603.
- Kolisek, M., Zsurka, G., Samaj, J., Weghuber, J., Schweyen, R. J. und Schweigel, M. (2003)
"Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria." Embo J **22**(6): 1235-1244, PMID: 12628916.
- Kolterman, O. G., Gray, R. S., Griffin, J., Burstein, P., Insel, J., Scarlett, J. A. und Olefsky, J. M. (1981)
"Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus." J Clin Invest **68**(4): 957-969, PMID: 7287908.

- Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A. V., Waldegger, S., Lesslauer, A., Vitzthum, H., Suzuki, Y., Luk, J. M., Becker, C., Schlingmann, K. P., Schmid, M., Rodriguez-Soriano, J., Ariceta, G., Cano, F., Enriquez, R., Juppner, H., Bakaloglu, S. A., Hediger, M. A., Gallati, S., Neuhaus, S. C., Nurnberg, P. und Weber, S. (2006)
"Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement." Am J Hum Genet **79**(5): 949-957, PMID: 17033971.
- Konrad, M., Schlingmann, K. P. und Gudermann, T. (2004)
"Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis." Am J Physiol Renal Physiol **286**(4): F599-605, PMID: 15001450.
- Korish, A. A. (2012)
"Magnesium sulfate therapy of preeclampsia: an old tool with new mechanism of action and prospect in management and prophylaxis." Hypertens Res PMID: 22763474.
- Kozielec, T. und Starobrat-Hermelin, B. (1997)
"Assessment of magnesium levels in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)." Magnes Res **10**(2): 143-148, PMID: 9368235.
- Krapivinsky, G., Mochida, S., Krapivinsky, L., Cibulsky, S. M. und Clapham, D. E. (2006)
"The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles and affects transmitter release." Neuron **52**(3): 485-496, PMID: 17088214.
- Kumeda, Y. und Inaba, M. (2005)
"[Metabolic syndrome and magnesium]." Clin Calcium **15**(11): 97-104, PMID: 16272619.
- Kumeda, Y. und Inaba, M. (2006)
Review of Magnesium and Metabolic Syndrome. New Perspectives in Magnesium Research: Nutrition and Health. Y. Nishizawa, H. Morii and J. Durlach, Springer London, Ed.:1., 189-196, ISBN: 1846283884 (978-1846283888)
- Laires, M. J. und Monteiro, C. (2006)
Exercise and Magnesium. New Perspectives in Magnesium Research: Nutrition and Health. Y. Nishizawa, H. Morii and J. Durlach, Springer London, Ed.:1., 173-188, ISBN: 1846283884 (978-1846283888)
- Landau, R., Scott, J. A. und Smiley, R. M. (2004)
"Magnesium-induced vasodilation in the dorsal hand vein." BJOG **111**(5): 446-451, PMID: 15104608.
- Langeslag, M., Clark, K., Moolenaar, W. H., van Leeuwen, F. N. und Jalink, K. (2007)
"Activation of TRPM7 channels by phospholipase C-coupled receptor agonists." J Biol Chem **282**(1): 232-239, PMID: 17095511.
- Larsson, S. C. und Wolk, A. (2007)
"Magnesium intake and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis." J Intern Med **262**(2): 208-214, PMID: 17645588.

- Launius, B. K., Brown, P. A., Cush, E. M. und Mancini, M. C. (2004)
"Osteoporosis: The dynamic relationship between magnesium and bone mineral density in the heart transplant patient." Crit Care Nurs Q **27**(1): 96-100, PMID: 14974529.
- Laurant, P. und Touyz, R. M. (2000)
"Physiological and pathophysiological role of magnesium in the cardiovascular system: implications in hypertension." J Hypertens **18**(9): 1177-1191, PMID: 10994748.
- Li, F. Y., Chaigne-Delalande, B., Kanellopoulou, C., Davis, J. C., Matthews, H. F., Douek, D. C., Cohen, J. I., Uzel, G., Su, H. C. und Lenardo, M. J. (2011)
"Second messenger role for Mg²⁺ revealed by human T-cell immunodeficiency." Nature **475**(7357): 471-476, PMID: 21796205.
- Li, J., Zhang, Q., Zhang, M. und Egger, M. (2007)
"Intravenous magnesium for acute myocardial infarction." Cochrane Database Syst Rev(2): CD002755, PMID: 17443517.
- Li, M., Jiang, J. und Yue, L. (2006)
"Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7." J Gen Physiol **127**(5): 525-537, PMID: 16636202.
- Liao, F., Folsom, A. R. und Brancati, F. L. (1998)
"Is low magnesium concentration a risk factor for coronary heart disease? The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study." Am Heart J **136**(3): 480-490, PMID: 9736141.
- Lima Mde, L., Cruz, T., Rodrigues, L. E., Bomfim, O., Melo, J., Correia, R., Porto, M., Cedro, A. und Vicente, E. (2009)
"Serum and intracellular magnesium deficiency in patients with metabolic syndrome--evidences for its relation to insulin resistance." Diabetes Res Clin Pract **83**(2): 257-262, PMID: 19124169.
- Lostroh, A. J. und Krahl, M. E. (1973)
"Insulin action. Accumulation in vitro of Mg²⁺ and K⁺ in rat uterus: ion pump activity." Biochim Biophys Acta **291**(1): 260-268, PMID: 4265272.
- Lowney, P., Hannon, T. S. und Baron, A. D. (1995)
"Magnesium deficiency enhances basal glucose disposal in the rat." Am J Physiol **268**(5 Pt 1): E925-931, PMID: 7762647.
- Lucas, M. J., Leveno, K. J. und Cunningham, F. G. (1995)
"A comparison of magnesium sulfate with phenytoin for the prevention of eclampsia." N Engl J Med **333**(4): 201-205, PMID: 7791836.
- Ludi, H. und Schatzmann, H. J. (1987)
"Some properties of a system for sodium-dependent outward movement of magnesium from metabolizing human red blood cells." J Physiol **390**: 367-382, PMID: 3443939.

- Ma, J., Folsom, A. R., Melnick, S. L., Eckfeldt, J. H., Sharrett, A. R., Nabulsi, A. A., Hutchinson, R. G. und Metcalf, P. A. (1995)
"Associations of serum and dietary magnesium with cardiovascular disease, hypertension, diabetes, insulin, and carotid arterial wall thickness: the ARIC study. Atherosclerosis Risk in Communities Study." J Clin Epidemiol **48**(7): 927-940, PMID: 7782801.
- MacGrogan, D., Levy, A., Bova, G. S., Isaacs, W. B. und Bookstein, R. (1996)
"Structure and methylation-associated silencing of a gene within a homozygously deleted region of human chromosome band 8p22." Genomics **35**(1): 55-65, PMID: 8661104.
- Maguire, M. E. und Cowan, J. A. (2002)
"Magnesium chemistry and biochemistry." Biometals **15**(3): 203-210, PMID: 12206387.
- Maj-Zurawska, M. (1994)
"Clinical findings on human blood with the KONE ISE for Mg²⁺." Scand J Clin Lab Invest Suppl **217**: 69-76, PMID: 7939387.
- Mason, B. A., Standley, C. A., Whitty, J. E. und Cotton, D. B. (1996)
"Fetal ionized magnesium levels parallel maternal levels during magnesium sulfate therapy for preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **175**(1): 213-217, PMID: 8694054.
- Matsushita, M., Kozak, J. A., Shimizu, Y., McLachlin, D. T., Yamaguchi, H., Wei, F. Y., Tomizawa, K., Matsui, H., Chait, B. T., Cahalan, M. D. und Nairn, A. C. (2005)
"Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1." J Biol Chem **280**(21): 20793-20803, PMID: 15781465.
- Matsuura, T., Kanayama, Y., Inoue, T., Takeda, T. und Morishima, I. (1993)
"cAMP-induced changes of intracellular free Mg²⁺ levels in human erythrocytes." Biochim Biophys Acta **1220**(1): 31-36, PMID: 8268241.
- McHugh, D. und Beech, D. J. (1996)
"Modulation of Ca²⁺ channel activity by ATP metabolism and internal Mg²⁺ in guinea-pig basilar artery smooth muscle cells." J Physiol **492** (Pt 2): 359-376, PMID: 9019535.
- McNair, P., Christensen, M. S., Christiansen, C., Madsbad, S. und Transbol, I. (1982)
"Renal hypomagnesaemia in human diabetes mellitus: its relation to glucose homeostasis." Eur J Clin Invest **12**(1): 81-85, PMID: 6802656.
- McNeill, D. A., Herbein, J. H. und Ritchey, S. J. (1982)
"Hepatic gluconeogenic enzymes, plasma insulin and glucagon response to magnesium deficiency and fasting." J Nutr **112**(4): 736-743, PMID: 6279807.
- Meij, I. C., Koenderink, J. B., van Bokhoven, H., Assink, K. F., Groenestege, W. T., de Pont, J. J., Bindels, R. J., Monnens, L. A., van den Heuvel, L. P. und Knoers, N. V. (2000)
"Dominant isolated renal magnesium loss is caused by misrouting of the Na(+),K(+)-ATPase gamma-subunit." Nat Genet **26**(3): 265-266, PMID: 11062458.

- Molinari, F., Foulquier, F., Tarpey, P. S., Morelle, W., Boissel, S., Teague, J., Edkins, S., Futreal, P. A., Stratton, M. R., Turner, G., Matthijs, G., Gecz, J., Munnich, A. und Colleaux, L. (2008)
 "Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation." Am J Hum Genet **82**(5): 1150-1157, PMID: 18455129.
- Monteilh-Zoller, M. K., Hermosura, M. C., Nadler, M. J., Scharenberg, A. M., Penner, R. und Fleig, A. (2003)
 "TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions." J Gen Physiol **121**(1): 49-60, PMID: 12508053.
- Montell, C. (2003)
 "Mg²⁺ homeostasis: the Mg²⁺-sensitive TRPM channels." Curr Biol **13**(20): R799-801, PMID: 14561419.
- Mooren, F. C., Kruger, K., Volker, K., Golf, S. W., Wadepuhl, M. und Kraus, A. (2011)
 "Oral magnesium supplementation reduces insulin resistance in non-diabetic subjects - a double-blind, placebo-controlled, randomized trial." Diabetes Obes Metab **13**(3): 281-284, PMID: 21205110.
- Morii, H., Kawata, T., Nagano, N., Shimada, T., Motonaga, C., Okamori, M., Nohmi, T., Miki, T., Kobayashi, M., Hara, K. und Akiyama, Y. (2006)
 Magnesium and Osteoporosis. New Perspectives in Magnesium Research: Nutrition and Health. Y. Nishizawa, H. Morii and J. Durlach, Springer London, Ed.:1., 266-271, ISBN: 1846283884 (978-1846283888)
- Mundy, G. R. und Guise, T. A. (1999)
 "Hormonal control of calcium homeostasis." Clin Chem **45**(8 Pt 2): 1347-1352, PMID: 10430817.
- Murakami, M., Ishizuka, J., Sumi, S., Nickols, G. A., Cooper, C. W., Townsend, C. M., Jr. und Thompson, J. C. (1992)
 "Role of extracellular magnesium in insulin secretion from rat insulinoma cells." Proc Soc Exp Biol Med **200**(4): 490-494, PMID: 1508939.
- Nadler, J. L., Buchanan, T., Natarajan, R., Antonipillai, I., Bergman, R. und Rude, R. (1993)
 "Magnesium deficiency produces insulin resistance and increased thromboxane synthesis." Hypertension **21**(6 Pt 2): 1024-1029, PMID: 8505087.
- Nadler, J. L. und Rude, R. K. (1995)
 "Disorders of magnesium metabolism." Endocrinol Metab Clin North Am **24**(3): 623-641, PMID: 8575413.
- Navarro, J. F. und Mora-Fernández, C. (2006)
 Magnesium in Chronic Renal Failure. New Perspectives in Magnesium Research: Nutrition and Health. Y. Nishizawa, H. Morii and J. Durlach, Springer London, Ed.:1., 303-315, ISBN: 1846283884 (978-1846283888)
- Nechifor, M. (2009)
 "Magnesium in major depression." Magnes Res **22**(3): 163S-166S, PMID: 19780403.

- Nicholls, R. D. und Knepper, J. L. (2001)
 "Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes." Annu Rev Genomics Hum Genet **2**: 153-175, PMID: 11701647.
- Norman, A. W. und Litwack, G. (1997)
Hormones, Academic Press, Ed.:2., ISBN: 0125214413
- Noronha, J. L. und Matuschak, G. M. (2002)
 "Magnesium in critical illness: metabolism, assessment, and treatment." Intensive Care Med **28**(6): 667-679, PMID: 12107669.
- Okada, K., Ishikawa, S. und Saito, T. (1992)
 "Cellular mechanisms of vasopressin and endothelin to mobilize [Mg²⁺]_i in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol **263**(4 Pt 1): C873-878, PMID: 1415672.
- Paolisso, G. und Barbagallo, M. (1997)
 "Hypertension, diabetes mellitus, and insulin resistance: the role of intracellular magnesium." Am J Hypertens **10**(3): 346-355, PMID: 9056694.
- Paolisso, G., Passariello, N., Sgambato, S., Torecca, R., Buoninconti, R., Varricchio, M. und D'Onofrio, F. (1987)
 "Impaired insulin-mediated erythrocyte magnesium accumulation in essential hypertension." Clin Sci (Lond) **73**(5): 535-539, PMID: 3315399.
- Paolisso, G., Sgambato, S., Passariello, N., Giugliano, D., Scheen, A., D'Onofrio, F. und Lefebvre, P. J. (1986)
 "Insulin induces opposite changes in plasma and erythrocyte magnesium concentrations in normal man." Diabetologia **29**(9): 644-647, PMID: 3539681.
- Pearce, S. H., Williamson, C., Kifor, O., Bai, M., Coulthard, M. G., Davies, M., Lewis-Barned, N., McCredie, D., Powell, H., Kendall-Taylor, P., Brown, E. M. und Thakker, R. V. (1996)
 "A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor." N Engl J Med **335**(15): 1115-1122, PMID: 8813042.
- Peirson, S. N., Butler, J. N. und Foster, R. G. (2003)
 "Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis." Nucleic Acids Res **31**(14): e73, PMID: 12853650.
- Penner, R. und Fleig, A. (2007)
 "The Mg²⁺ and Mg(2+)-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7." Handb Exp Pharmacol(179): 313-328, PMID: 17217066.
- Pfaffenrath, V., Wessely, P., Meyer, C., Isler, H. R., Evers, S., Grotemeyer, K. H., Taneri, Z., Soyka, D., Gobel, H. und Fischer, M. (1996)
 "Magnesium in the prophylaxis of migraine--a double-blind placebo-controlled study." Cephalalgia **16**(6): 436-440, PMID: 8902254.

- Picado, M. J., de la Sierra, A., Aguilera, M. T., Coca, A. und Urbano-Marquez, A. (1994)
 "Increased activity of the Mg²⁺/Na⁺ exchanger in red blood cells from essential hypertensive patients." Hypertension **23**(6 Pt 2): 987-991, PMID: 8206640.
- Pils, D., Horak, P., Gleiss, A., Sax, C., Fabjani, G., Moebus, V. J., Zielinski, C., Reinthaller, A., Zeillinger, R. und Krainer, M. (2005)
 "Five genes from chromosomal band 8p22 are significantly down-regulated in ovarian carcinoma: N33 and EFA6R have a potential impact on overall survival." Cancer **104**(11): 2417-2429, PMID: 16270321.
- Porschke, D. (1995)
 Modes and dynamics of Mg²⁺-polynucleotide interactions. The biological chemistry of magnesium, Wiley-VCH, ISBN: 978-0471185833
- Poujeol, P., Touvay, C., Roinel, N. und de Rouffignac, C. (1980)
 "Stimulation of renal magnesium reabsorption by calcitonin in the rat." Am J Physiol **239**(6): F524-532, PMID: 7470228.
- Pschyrembel (1994)
Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, Gruyter, Walter de GmbH, Ed.:257., ISBN: 3110141833
- Quamme, G. A. (1980)
 "Effect of calcitonin on calcium and magnesium transport in rat nephron." Am J Physiol **238**(6): E573-578, PMID: 7386624.
- Quamme, G. A., Dai, L. J. und Rabkin, S. W. (1993)
 "Dynamics of intracellular free Mg²⁺ changes in a vascular smooth muscle cell line." Am J Physiol **265**(1 Pt 2): H281-288, PMID: 8342644.
- Quamme, G. A. und de Rouffignac, C. (2000)
 "Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney." Front Biosci **5**: D694-711, PMID: 10922295.
- Quamme, G. A. und Rabkin, S. W. (1990)
 "Cytosolic free magnesium in cardiac myocytes: identification of a Mg²⁺ influx pathway." Biochem Biophys Res Commun **167**(3): 1406-1412, PMID: 2322282.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. und Nitsche, A. (2004)
 "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR." Biochem Biophys Res Commun **313**(4): 856-862, PMID: 14706621.
- Rainier, S., Chai, J. H., Tokarz, D., Nicholls, R. D. und Fink, J. K. (2003)
 "NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6)." Am J Hum Genet **73**(4): 967-971, PMID: 14508710.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. und Moorman, A. F. (2003)
 "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data." Neurosci Lett **339**(1): 62-66, PMID: 12618301.

- Ravn, H. B., Moeldrup, U., Brookes, C. I., Ilkjaer, L. B., White, P., Chew, M., Jensen, L., Johnsen, S., Birk-Soerensen, L. und Hjortdal, V. E. (1999)
"Intravenous magnesium reduces infarct size after ischemia/reperfusion injury combined with a thrombogenic lesion in the left anterior descending artery." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(3): 569-574, PMID: 10073959.
- Reed, J. A., Wilkinson, P. A., Patel, H., Simpson, M. A., Chatonnet, A., Robay, D., Patton, M. A., Crosby, A. H. und Warner, T. T. (2005)
"A novel NIPA1 mutation associated with a pure form of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia." Neurogenetics **6**(2): 79-84, PMID: 15711826.
- Reinhart, R. A. (1992)
"Magnesium deficiency: recognition and treatment in the emergency medicine setting." Am J Emerg Med **10**(1): 78-83, PMID: 1736922.
- Resnick, L. M., Laragh, J. H., Sealey, J. E. und Alderman, M. H. (1983)
"Divalent cations in essential hypertension. Relations between serum ionized calcium, magnesium, and plasma renin activity." N Engl J Med **309**(15): 888-891, PMID: 6350880.
- Rink, T. J., Tsien, R. Y. und Pozzan, T. (1982)
"Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes." J Cell Biol **95**(1): 189-196, PMID: 6815204.
- Risco, F., Traba, M. L. und de la Piedra, C. (1995)
"Possible alterations of the in vivo 1,25(OH)₂D₃ synthesis and its tissue distribution in magnesium-deficient rats." Magnes Res **8**(1): 27-35, PMID: 7669505.
- Rodriguez-Moran, M. und Guerrero-Romero, F. (2003)
"Oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity and metabolic control in type 2 diabetic subjects: a randomized double-blind controlled trial." Diabetes Care **26**(4): 1147-1152, PMID: 12663588.
- Roffe, C., Sills, S., Crome, P. und Jones, P. (2002)
"Randomised, cross-over, placebo controlled trial of magnesium citrate in the treatment of chronic persistent leg cramps." Med Sci Monit **8**(5): CR326-330, PMID: 12011773.
- Romani, A. (2007)
"Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells." Arch Biochem Biophys **458**(1): 90-102, PMID: 16949548.
- Romani, A., Marfella, C. und Scarpa, A. (1993)
"Regulation of magnesium uptake and release in the heart and in isolated ventricular myocytes." Circ Res **72**(6): 1139-1148, PMID: 8495544.
- Romani, A. und Scarpa, A. (1990)
"Norepinephrine evokes a marked Mg²⁺ efflux from liver cells." FEBS Lett **269**(1): 37-40, PMID: 2167243.

- Romani, A. und Scarpa, A. (1992)
 "Regulation of cell magnesium." Arch Biochem Biophys **298**(1): 1-12, PMID: 1524417.
- Romani, A. M. (2011)
 "Cellular magnesium homeostasis." Arch Biochem Biophys **512**(1): 1-23, PMID: 21640700.
- Romani, A. M. und Maguire, M. E. (2002)
 "Hormonal regulation of Mg²⁺ transport and homeostasis in eukaryotic cells." Biometals **15**(3): 271-283, PMID: 12206393.
- Romani, A. M., Matthews, V. D. und Scarpa, A. (2000)
 "Parallel stimulation of glucose and Mg(2+) accumulation by insulin in rat hearts and cardiac ventricular myocytes." Circ Res **86**(3): 326-333, PMID: 10679485.
- Romani, A. M. und Scarpa, A. (2000)
 "Regulation of cellular magnesium." Front Biosci **5**: D720-734, PMID: 10922296.
- Rosamond, W. D., Folsom, A. R., Chambless, L. E. und Wang, C. H. (2001)
 "Coronary heart disease trends in four United States communities. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study 1987-1996." Int J Epidemiol **30** **Suppl 1**: S17-22, PMID: 11759846.
- Roth, P. und Werner, E. (1979)
 "Intestinal absorption of magnesium in man." Int J Appl Radiat Isot **30**(9): 523-526, PMID: 478675.
- Rude, R. K. (1998)
 "Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans." J Bone Miner Res **13**(4): 749-758, PMID: 9556074.
- Rude, R. K. und Gruber, H. E. (2004)
 "Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations." J Nutr Biochem **15**(12): 710-716, PMID: 15607643.
- Rude, R. K., Oldham, S. B. und Singer, F. R. (1976)
 "Functional hypoparathyroidism and parathyroid hormone end-organ resistance in human magnesium deficiency." Clin Endocrinol (Oxf) **5**(3): 209-224, PMID: 182417.
- Runyan, A. L., Sun, Y., Bhattacharya, S. K., Ahokas, R. A., Chhokar, V. S., Gerling, I. C. und Weber, K. T. (2005)
 "Responses in extracellular and intracellular calcium and magnesium in aldosteronism." J Lab Clin Med **146**(2): 76-84, PMID: 16099237.
- Ryan, M. F. (1991)
 "The role of magnesium in clinical biochemistry: an overview." Ann Clin Biochem **28** (**Pt 1**): 19-26, PMID: 2024929.

- Ryzen, E. (1989)
 "Magnesium homeostasis in critically ill patients." Magnesium **8**(3-4): 201-212, PMID: 2682045.
- Ryzen, E. und Rude, R. K. (1990)
 "Low intracellular magnesium in patients with acute pancreatitis and hypocalcemia." West J Med **152**(2): 145-148, PMID: 2407029.
- Rzymowska, J. (1996)
 "Magnesium and iron contents of leukemic lymphocytes in acute leukemias and hemolytic anemia." Biol Trace Elem Res **53**(1-3): 235-239, PMID: 8862752.
- Sabatier, M., Pont, F., Arnaud, M. J. und Turnlund, J. R. (2003)
 "A compartmental model of magnesium metabolism in healthy men based on two stable isotope tracers." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **285**(3): R656-663, PMID: 12775558.
- Sahin, G., Ertem, U., Duru, F., Birgen, D. und Yuksek, N. (2000)
 "High prevalence of chronic magnesium deficiency in T cell lymphoblastic leukemia and chronic zinc deficiency in children with acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma." Leuk Lymphoma **39**(5-6): 555-562, PMID: 11342338.
- Sahni, J., Nelson, B. und Scharenberg, A. M. (2007)
 "SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg²⁺ transporter." Biochem J **401**(2): 505-513, PMID: 16984228.
- Saris, N. E., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A. und Lewenstam, A. (2000)
 "Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects." Clin Chim Acta **294**(1-2): 1-26, PMID: 10727669.
- Satake, K., Lee, J. D., Shimizu, H., Uzui, H., Mitsuke, Y., Yue, H. und Ueda, T. (2004)
 "Effects of magnesium on prostacyclin synthesis and intracellular free calcium concentration in vascular cells." Magnes Res **17**(1): 20-27, PMID: 15083565.
- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., Takeda, A., Tomiyama, H., Nakashima, K., Hasegawa, K., Obata, F., Yoshikawa, T., Kawakami, H., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M., Nakamura, Y. und Toda, T. (2009)
 "Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease." Nat Genet **41**(12): 1303-1307, PMID: 19915576.
- Satur, C. M., Stubington, S. R., Jennings, A., Newton, K., Martin, P. G., Gebitekin, C. und Walker, D. R. (1995)
 "Magnesium flux during and after open heart operations in children." Ann Thorac Surg **59**(4): 921-927, PMID: 7695419.
- Scharenberg, A. M. (2005)
 "TRPM2 and TRPM7: channel/enzyme fusions to generate novel intracellular sensors." Pflugers Arch **451**(1): 220-227, PMID: 16001276.

- Scheffe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T. und Funke-Kaiser, H. (2006)
"Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula." J Mol Med (Berl) **84**(11): 901-910, PMID: 16972087.
- Schlingmann, K. P. (2006)
Calcium-Sensing Receptor and Magnesium. New Perspectives in Magnesium Research: Nutrition and Health. Y. Nishizawa, H. Morii and J. Durlach, Springer London, Ed.:1., 272-288, ISBN: 1846283884 (978-1846283888)
- Schlingmann, K. P., Waldegger, S., Konrad, M., Chubanov, V. und Gudermann, T. (2007)
"TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism." Biochim Biophys Acta **1772**(8): 813-821, PMID: 17481860.
- Schlingmann, K. P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsum, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H. W. und Konrad, M. (2002)
"Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family." Nat Genet **31**(2): 166-170, PMID: 12032568.
- Schmitz, C., Deason, F. und Perraud, A. L. (2007)
"Molecular components of vertebrate Mg²⁺-homeostasis regulation." Magnes Res **20**(1): 6-18, PMID: 17536484.
- Schmitz, C., Dorovkov, M. V., Zhao, X., Davenport, B. J., Ryazanov, A. G. und Perraud, A. L. (2005)
"The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant." J Biol Chem **280**(45): 37763-37771, PMID: 16150690.
- Schmitz, C., Perraud, A. L., Johnson, C. O., Inabe, K., Smith, M. K., Penner, R., Kurosaki, T., Fleig, A. und Scharenberg, A. M. (2003)
"Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7." Cell **114**(2): 191-200, PMID: 12887921.
- Schweigel, M., Kolisek, M., Nikolic, Z. und Kuzinski, J. (2008)
"Expression and functional activity of the Na/Mg exchanger, TRPM7 and MagT1 are changed to regulate Mg homeostasis and transport in rumen epithelial cells." Magnes Res **21**(2): 118-123, PMID: 18705540.
- Schweigel, M., Vormann, J. und Martens, H. (2000)
"Mechanisms of Mg(2+) transport in cultured ruminal epithelial cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **278**(3): G400-408, PMID: 10712259.
- Shalev, H., Phillip, M., Galil, A., Carmi, R. und Landau, D. (1998)
"Clinical presentation and outcome in primary familial hypomagnesaemia." Arch Dis Child **78**(2): 127-130, PMID: 9579153.

- Shinoda, Y., Kawaguchi, H., Higashikawa, A., Hirata, M., Miura, T., Saito, T., Nakamura, K., Chung, U. I. und Ogata, N. (2010)
"Mechanisms underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells." J Cell Biochem **109**(4): 755-763, PMID: 20058231.
- Sigel, H. und Sigel, A. (1990)
Metal Ions in Biological Systems, CRC Press, Ed.:1, ISBN: 978-0824783150
- Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S. und Lifton, R. P. (1999)
"Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption." Science **285**(5424): 103-106, PMID: 10390358.
- Sircar, S. (2008)
Principles of Medical Physiology, Thieme, Ed.:1. Edition, ISBN: 1588905721
- Skelin, M., Rupnik, M. und Cencic, A. (2010)
"Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research." ALTEX **27**(2): 105-113, PMID: 20686743.
- Skobeloff, E. M., Kim, D. und Spivey, W. H. (1993)
"Magnesium sulfate for the treatment of bronchospasm complicating acute bronchitis in a four-months'-pregnant woman." Ann Emerg Med **22**(8): 1365-1367, PMID: 8333646.
- Soltani, N., Keshavarz, M., Sohanaki, H., Dehpour, A. R. und Zahedi Asl, S. (2005)
"Oral magnesium administration prevents vascular complications in STZ-diabetic rats." Life Sci **76**(13): 1455-1464, PMID: 15680310.
- Song, Y., He, K., Levitan, E. B., Manson, J. E. und Liu, S. (2006)
"Effects of oral magnesium supplementation on glycaemic control in Type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized double-blind controlled trials." Diabet Med **23**(10): 1050-1056, PMID: 16978367.
- Song, Y., Manson, J. E., Buring, J. E. und Liu, S. (2004)
"Dietary magnesium intake in relation to plasma insulin levels and risk of type 2 diabetes in women." Diabetes Care **27**(1): 59-65, PMID: 14693967.
- Song, Y., Sesso, H. D., Manson, J. E., Cook, N. R., Buring, J. E. und Liu, S. (2006)
"Dietary magnesium intake and risk of incident hypertension among middle-aged and older US women in a 10-year follow-up study." Am J Cardiol **98**(12): 1616-1621, PMID: 17145221.
- Sontia, B. und Touyz, R. M. (2007)
"Role of magnesium in hypertension." Arch Biochem Biophys **458**(1): 33-39, PMID: 16762312.

- Sponder, G., Svidova, S., Schweigel, M., Vormann, J. und Kolisek, M. (2010)
"Splice-variant 1 of the ancient domain protein 2 (ACDP2) complements the magnesium-deficient growth phenotype of *Salmonella enterica* sv. typhimurium strain MM281." Magnes Res **23**(2): 105-114, PMID: 20519162.
- Standley, C. A., Whitty, J. E., Mason, B. A. und Cotton, D. B. (1997)
"Serum ionized magnesium levels in normal and preeclamptic gestation." Obstet Gynecol **89**(1): 24-27, PMID: 8990431.
- Starobrat-Hermelin, B. und Kozielec, T. (1997)
"The effects of magnesium physiological supplementation on hyperactivity in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Positive response to magnesium oral loading test." Magnes Res **10**(2): 149-156, PMID: 9368236.
- Stendig-Lindberg, G., Tepper, R. und Leichter, I. (1993)
"Trabecular bone density in a two year controlled trial of peroral magnesium in osteoporosis." Magnes Res **6**(2): 155-163, PMID: 8274361.
- Stephenson, E. W. und Podolsky, R. J. (1977)
"Regulation by magnesium of intracellular calcium movement in skinned muscle fibers." J Gen Physiol **69**(1): 1-16, PMID: 299886.
- Straus, D. S. (1984)
"Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo." Endocr Rev **5**(2): 356-369, PMID: 6376081.
- Stryer, L. (2007)
Stryer Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Ed.:6., ISBN: 978-3827418005
- Stuiver, M., Lainez, S., Will, C., Terryn, S., Gunzel, D., Debaix, H., Sommer, K., Kopplin, K., Thumfart, J., Kampik, N. B., Querfeld, U., Willnow, T. E., Nemecek, V., Wagner, C. A., Hoenderop, J. G., Devuyst, O., Knoers, N. V., Bindels, R. J., Meij, I. C. und Muller, D. (2011)
"CNNM2, encoding a basolateral protein required for renal Mg²⁺ handling, is mutated in dominant hypomagnesemia." Am J Hum Genet **88**(3): 333-343, PMID: 21397062.
- Su, L. T., Agapito, M. A., Li, M., Simonson, W. T., Huttenlocher, A., Habas, R., Yue, L. und Runnels, L. W. (2006)
"TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium-dependent protease calpain." J Biol Chem **281**(16): 11260-11270, PMID: 16436382.
- Sun-Edelstein, C. und Mauskop, A. (2009)
"Role of magnesium in the pathogenesis and treatment of migraine." Expert Rev Neurother **9**(3): 369-379, PMID: 19271946.
- Sun, G. und Budde, R. J. (1997)
"Requirement for an additional divalent metal cation to activate protein tyrosine kinases." Biochemistry **36**(8): 2139-2146, PMID: 9047313.

- Swaminathan, R. (2003)
"Magnesium metabolism and its disorders." Clin Biochem Rev **24**(2): 47-66, PMID: 18568054.
- Takezawa, R., Schmitz, C., Demeuse, P., Scharenberg, A. M., Penner, R. und Fleig, A. (2004)
"Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6009-6014, PMID: 15069188.
- Tanner, M. A., Berk, L. S., Felten, D. L., Blidy, A. D., Bit, S. L. und Ruff, D. W. (2002)
"Substantial changes in gene expression level due to the storage temperature and storage duration of human whole blood." Clinical and Laboratory Haematology **24**(6): 337-341, PMID.
- Tashiro, M. und Konishi, M. (1997)
"Na⁺ gradient-dependent Mg²⁺ transport in smooth muscle cells of guinea pig tenia cecum." Biophys J **73**(6): 3371-3384, PMID: 9414247.
- The-Eclampsia-Trail-Collaborative-Group (1995)
"Which anticonvulsant for women with eclampsia? Evidence from the Collaborative Eclampsia Trial." Lancet **345**(8963): 1455-1463, PMID: 7769899.
- Thebault, S., Alexander, R. T., Tiel Groenestege, W. M., Hoenderop, J. G. und Bindels, R. J. (2009)
"EGF increases TRPM6 activity and surface expression." J Am Soc Nephrol **20**(1): 78-85, PMID: 19073827.
- Thomas, J., Millot, J. M., Sebille, S., Delabroise, A. M., Thomas, E., Manfait, M. und Arnaud, M. J. (2000)
"Free and total magnesium in lymphocytes of migraine patients - effect of magnesium-rich mineral water intake." Clin Chim Acta **295**(1-2): 63-75, PMID: 10767394.
- Touyz, R. M., Mercure, C. und Reudelhuber, T. L. (2001)
"Angiotensin II type I receptor modulates intracellular free Mg²⁺ in renally derived cells via Na⁺-dependent Ca²⁺-independent mechanisms." J Biol Chem **276**(17): 13657-13663, PMID: 11278387.
- Touyz, R. M. und Schiffrin, E. L. (1993)
"The effect of angiotensin II on platelet intracellular free magnesium and calcium ionic concentrations in essential hypertension." J Hypertens **11**(5): 551-558, PMID: 8390527.
- Tso, E. L. und Barish, R. A. (1992)
"Magnesium: clinical considerations." J Emerg Med **10**(6): 735-745, PMID: 1491157.
- Tucci, A., Nalls, M. A., Houlden, H., Revesz, T., Singleton, A. B., Wood, N. W., Hardy, J. und Paisan-Ruiz, C. (2010)
"Genetic variability at the PARK16 locus." Eur J Hum Genet **18**(12): 1356-1359, PMID: 20683486.

- Turekian, K. K. (1968)
Oceans (Foundations of Earth Science), Englewood, Cliffs, N.J., Prentice-Hall, ISBN: 0136303684 (978-0136303688)
- Turner, R. J. und Vink, R. (2006)
Magnesium in the Central Nervous System. New Perspectives in Magnesium Research: Nutrition and Health. Y. Nishizawa, H. Morii and J. Durlach, Springer London, Ed.:1., 338-258, ISBN: 1846283884 (978-1846283888)
- Uy, H. L., Guise, T. A., De La Mata, J., Taylor, S. D., Story, B. M., Dallas, M. R., Boyce, B. F., Mundy, G. R. und Roodman, G. D. (1995)
"Effects of parathyroid hormone (PTH)-related protein and PTH on osteoclasts and osteoclast precursors in vivo." Endocrinology **136**(8): 3207-3212, PMID: 7628353.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. und Speleman, F. (2002)
"Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034, PMID: 12184808.
- Vicario, P. P. und Bennun, A. (1990)
"Separate effects of Mg²⁺, MgATP, and ATP⁴⁻ on the kinetic mechanism for insulin receptor tyrosine kinase." Arch Biochem Biophys **278**(1): 99-105, PMID: 2157363.
- Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A. W., Droogmans, G., Bindels, R. J. und Hoenderop, J. G. (2004)
"TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption." J Biol Chem **279**(1): 19-25, PMID: 14576148.
- Volpe, S. L. (2008)
"Magnesium, the metabolic syndrome, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus." Crit Rev Food Sci Nutr **48**(3): 293-300, PMID: 18274977.
- von Ehrlich, B., Mathan, C., Negele, H., El-Bakari, N. und von Ehrlich, S. (2010)
"Erfahrungen mit wiederholter und langfristiger additiver parenteraler Magnesium-Therapie (pMgT) bei Patienten mit Tinnitus, Epilepsie, Migräne, Diabetes mellitus und Cisplatin-Nephropathie." 30. Magnesium-Symposium der Gesellschaft für Magnesium-Forschung e.V., Herne, Deutschland.
- Vormann, J. (2003)
"Magnesium: nutrition and metabolism." Mol Aspects Med **24**(1-3): 27-37, PMID: 12537987.
- Vormann, J. (2010)
"Physiologie und Pathophysiologie von Magnesium." Schweizer Zeitschrift für Ernährungsmedizin **Jahrgang 8**(1/2010): 8-12, PMID.
- Vormann, J. und Günther, T. (1987)
"Amiloride-sensitive net Mg²⁺ efflux from isolated perfused rat hearts." Magnesium **6**(4): 220-224, PMID: 3669732.

- Vormann, J., Günther, T., Magdorf, K. und Wahn, U. (1992)
"Mineral metabolism in erythrocytes from patients with cystic fibrosis." Eur J Clin Chem Clin Biochem **30**(4): 193-196, PMID: 1525247.
- Vormann, J., Worlitschek, M., Goedecke, T. und Silver, B. (2001)
"Supplementation with alkaline minerals reduces symptoms in patients with chronic low back pain." J Trace Elem Med Biol **15**(2-3): 179-183, PMID: 11787986.
- Wabakken, T., Rian, E., Kveine, M. und Aasheim, H. C. (2003)
"The human solute carrier SLC41A1 belongs to a novel eukaryotic subfamily with homology to prokaryotic MgtE Mg²⁺ transporters." Biochem Biophys Res Commun **306**(3): 718-724, PMID: 12810078.
- Walder, R. Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M. B., Beck, G. E., Englehardt, R. K., Carmi, R. und Sheffield, V. C. (2002)
"Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia." Nat Genet **31**(2): 171-174, PMID: 12032570.
- Walker, A. F., Marakis, G., Christie, S. und Byng, M. (2003)
"Mg citrate found more bioavailable than other Mg preparations in a randomised, double-blind study." Magnes Res **16**(3): 183-191, PMID: 14596323.
- Wallach, S. (1990)
"Effects of magnesium on skeletal metabolism." Magnes Trace Elem **9**(1): 1-14, PMID: 2184830.
- Wang, C. Y., Yang, P., Shi, J. D., Purohit, S., Guo, D., An, H., Gu, J. G., Ling, J., Dong, Z. und She, J. X. (2004)
"Molecular cloning and characterization of the mouse *Acdp* gene family." BMC Genomics **5**(1): 7, PMID: 14723793.
- Watson, K. V., Moldow, C. F., Ogburn, P. L. und Jacob, H. S. (1986)
"Magnesium sulfate: rationale for its use in preeclampsia." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(4): 1075-1078, PMID: 3513161.
- Weber, S., Hoffmann, K., Jeck, N., Saar, K., Boeswald, M., Kuwertz-Broeking, E., Meij, II, Knoers, N. V., Cochat, P., Sulakova, T., Bonzel, K. E., Soergel, M., Manz, F., Schaerer, K., Seyberth, H. W., Reis, A. und Konrad, M. (2000)
"Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the *PCLN-1* gene." Eur J Hum Genet **8**(6): 414-422, PMID: 10878661.
- Weisinger, J. R. und Bellorin-Font, E. (1998)
"Magnesium and phosphorus." Lancet **352**(9125): 391-396, PMID: 9717944.
- Whang, R. (1987)
"Routine serum magnesium determination--a continuing unrecognized need." Magnesium **6**(1): 1-4, PMID: 3821170.

- Whang, R., Oei, T. O., Aikawa, J. K., Watanabe, A., Vannatta, J., Fryer, A. und Markanich, M. (1984)
 "Predictors of clinical hypomagnesemia. Hypokalemia, hypophosphatemia, hyponatremia, and hypocalcemia." Arch Intern Med **144**(9): 1794-1796, PMID: 6476998.
- Widman, L., Wester, P. O., Stegmayr, B. K. und Wirell, M. (1993)
 "The dose-dependent reduction in blood pressure through administration of magnesium. A double blind placebo controlled cross-over study." Am J Hypertens **6**(1): 41-45, PMID: 8427660.
- Will, C., Breiderhoff, T., Thumfart, J., Stuiver, M., Kopplin, K., Sommer, K., Gunzel, D., Querfeld, U., Meij, I. C., Shan, Q., Bleich, M., Willnow, T. E. und Muller, D. (2010)
 "Targeted deletion of murine Cldn16 identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca²⁺ and Mg²⁺ wasting." Am J Physiol Renal Physiol PMID: 20147368.
- Witkowski, M., Hubert, J. und Mazur, A. (2011)
 "Methods of assessment of magnesium status in humans: a systematic review." Magnes Res **24**(4): 163-180, PMID: 22064327.
- Witlin, A. G. und Sibai, B. M. (1998)
 "Magnesium sulfate therapy in preeclampsia and eclampsia." Obstet Gynecol **92**(5): 883-889, PMID: 9794688.
- Witteman, J. C., Willett, W. C., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Sacks, F. M., Speizer, F. E., Rosner, B. und Hennekens, C. H. (1989)
 "A prospective study of nutritional factors and hypertension among US women." Circulation **80**(5): 1320-1327, PMID: 2805268.
- Wolf, F. I. und Cittadini, A. (2003)
 "Chemistry and biochemistry of magnesium." Mol Aspects Med **24**(1-3): 3-9, PMID: 12537985.
- Wolf, F. I., Di Francesco, A., Covacci, V. und Cittadini, A. (1994)
 "cAMP activates magnesium efflux via the Na/Mg antiporter in ascites cells." Biochem Biophys Res Commun **202**(3): 1209-1214, PMID: 8060294.
- Wolf, F. I., Di Francesco, A., Covacci, V. und Cittadini, A. (1997)
 "Regulation of magnesium efflux from rat spleen lymphocytes." Arch Biochem Biophys **344**(2): 397-403, PMID: 9264554.
- Wolf, F. I., Trapani, V. und Cittadini, A. (2009)
 "Magnesium and cancer: from bench to bedside - an update." XII. International Magnesium Symposium, Iasi, Romania.
- Wolf, F. I., Trapani, V., Simonacci, M., Mastrototaro, L., Cittadini, A. und Schweigel, M. (2010)
 "Modulation of TRPM6 and Na(+)/Mg(2+) exchange in mammary epithelial cells in response to variations of magnesium availability." J Cell Physiol **222**(2): 374-381, PMID: 19890837.

- Wong, E. T., Rude, R. K., Singer, F. R. und Shaw, S. T., Jr. (1983)
"A high prevalence of hypomagnesemia and hypermagnesemia in hospitalized patients." Am J Clin Pathol **79**(3): 348-352, PMID: 6829504.
- Wu, N. und Veillette, A. (2011)
"Immunology: Magnesium in a signalling role." Nature **475**(7357): 462-463, PMID: 21796201.
- Yan, Y., Tian, J., Mo, X., Zhao, G., Yin, X., Pu, J. und Zhang, B. (2011)
"Genetic Variants in the RAB7L1 and SLC41A1 Genes of the PARK16 Locus in Chinese Parkinson's Disease Patients." Int J Neurosci **121**(11): 632-636, PMID: 21812739.
- Yang, C. Y. und Chiu, H. F. (1999)
"Calcium and magnesium in drinking water and the risk of death from hypertension." Am J Hypertens **12**(9 Pt 1): 894-899, PMID: 10509547.
- Yang, C. Y., Chiu, H. F., Cheng, M. F., Tsai, S. S., Hung, C. F. und Tseng, Y. T. (1999)
"Magnesium in drinking water and the risk of death from diabetes mellitus." Magnes Res **12**(2): 131-137, PMID: 10423708.
- Yuen, A. W. und Sander, J. W. (2012)
"Can magnesium supplementation reduce seizures in people with epilepsy? A hypothesis." Epilepsy Res **100**(1-2): 152-156, PMID: 22406257.
- Zaloga, G. P., Chernow, B., Pock, A., Wood, B., Zaritsky, A. und Zucker, A. (1984)
"Hypomagnesemia is a common complication of aminoglycoside therapy." Surg Gynecol Obstet **158**(6): 561-565, PMID: 6729676.
- Zhang, A., Cheng, T. P. und Altura, B. M. (1992)
"Magnesium regulates intracellular free ionized calcium concentration and cell geometry in vascular smooth muscle cells." Biochim Biophys Acta **1134**(1): 25-29, PMID: 1543756.
- Zhao, J., Matthies, D. S., Botzolakis, E. J., Macdonald, R. L., Blakely, R. D. und Hedera, P. (2008)
"Hereditary spastic paraplegia-associated mutations in the NIPA1 gene and its *Caenorhabditis elegans* homolog trigger neural degeneration in vitro and in vivo through a gain-of-function mechanism." J Neurosci **28**(51): 13938-13951, PMID: 19091982.
- Zhou, H. und Clapham, D. E. (2009)
"Mammalian MagT1 and TUSC3 are required for cellular magnesium uptake and vertebrate embryonic development." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(37): 15750-15755, PMID: 19717468.

9 ANHANG

9.1 KULTURMEDIUM FÜR JURKAT UND JVM-13-ZELLEN

Zusammensetzung des zur Kultivierung der Jurkat und JVM-13-Zellen benötigten Mediums (Tab. 17)

Tab.17 Zusammensetzung des Wachstumsmediums

Medium	Volumen	Firma
RPMI 1640 mit L-Glutamine (300 mg/l) mit 2,0 g/l NaHCO ₃	90%	Biochrom AG
FBS	10%	PAN Biotech GmbH
10000 Units/ml Penicillin 10000 µg/ml Streptomycin	1%	PAN Biotech GmbH

9.2 BEDINGUNGEN DES MAGNESIUMVERSUCHS IN VITRO

Zusammensetzung des Versuchsmediums (Tab. 18)

Tab.18 Zusammensetzung des Versuchsmediums

Medium	Volumen	Firma
HBSS (Mg ²⁺ -frei)	90 %	PAN Biotech GmbH
FBS (dialysiert)	10 %	PAN Biotech GmbH
10000 Units/ml Penicillin 10000 µg/ml Streptomycin	1%	PAN Biotech GmbH

Zusammensetzung des RT-Reaktionsansatzes (Tab. 19)

Tab.19 Reaktionsansatz cDNA Synthesis

Komponenten	Volumen pro Reaktion
5 x iScript Reaktionsmix	4 µl
iScript Reverse Transkriptase	1 µl
Nuklease-freies Wasser	x µl
RNA-Template (100 ng)	x µl
Volumen total	20 µl

Thermocyclerprotokoll der reversen Transkription (**Tab. 20**)

Tab.20 Reaktionsprotokoll cDNA-Synthese

Temperatur	Zeit
25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 min

9.3 REAKTIONSBEDINGUNGEN DER KONVENTIONELLEN PCR

Reaktionsansatz der konventionellen PCR (**Tab. 21**)

Tab.21 Reaktionsansatz konventionelle PCR

Komponente	Konzentration	Volumen pro Reaktion
Taq PCR Master Mix	0,5 Units Taq-Polymerase, 40 µM von jedem dNTP, Puffer	10 µl
Primer sense	20 pmol /µl	1,5 µl
Primer antisense	20 pmol /µl	1,5 µl
Template cDNA	1 ng/µl (bei 100 % Transkriptionseffizienz)	1,5 µl
Destilliertes Wasser		5,5 µl
Volumen total		20 µl

Protokoll der konventionellen PCR (**Tab. 22**)

Tab.22 Protocol RT-PCR

Schritt	Bedingungen
Initiale Denaturierung	3 min 94.0°C
“3-Step Cycling”	
Denaturierung	30 sec 94°C
Annealing	30 sec 58°C
Elongation	1 min 72°C
Anzahl der Zyklen 35	
Finale Elongation	10 min 72°C

9.4 REAKTIONSBEDINGUNGEN DER QUANTITATIVEN PCR (qPCR)

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine qPCR (Tab. 23)

Tab.23 Reaktionsansatz für die quantitative PCR

Komponenten	Konzentration	Volumen pro Reaktion/Well
SYBRGreen Super Mix	–	7,8 µl
Primer sense	20 pmol /µl	0,3 µl
Primer antisense	20 pmol /µl	0,3 µl
Nuklease-freies Wasser	–	2,5 µl
cDNA Template	1 ng/µl (bei 100 % Transkriptionseffizienz)	5 µl
Volumen total		15,9 µl

Reaktionsprotokoll der qPCR (Tab. 24)

Tab.24 Reaktionsprotokoll der qPCR. Im Rahmen der Optimierung wurde Annealing/Elongationszeit auf 1 min verkürzt. Damit wurde die HKG-Optimierung durchgeführt.

Schritt	Bedingungen	
Initiale Denaturierung und Polymeraseaktivierung	30 sec	95,0°C
	3 min	95,0°C
“2-Step Cycling”		
Denaturierung	30 sec	95,0°C
Annealing/Elongation	2 min	58,0°C
Anzahl der Zyklen 35		
	30 sec	95,0°C
	30 sec	55,0°C
Schmelzkurve		
Schmelzkurve	10 min	55,0°C - 94,5 °C

Mittlere Effizienzen der qPCR-Reaktionen der Jurkat- und JVM-13-Zellen und der humanen Leukozyten der *Diabetes-mellitus*-Studie (**Tab. 25**)

Tab.25 Effizienzen und slope der untersuchten Gene in der qPCR

JVM-13-Zellen				
Gen	Steigung (slope)	E in %	r ²	Schnittpunkt y-Achse (y-int)
<i>SLC41A1</i>	-3,72	85,66	0,99	17,44
<i>SLC41A2</i>	-3,80	83,24	0,99	16,38
<i>SLC41A3</i>	-3,84	82,28	0,99	16,68
<i>CNNM2</i>	-3,80	83,30	0,99	16,89
<i>NIPA1</i>	-3,75	84,87	0,99	16,41
<i>MagT1</i>	-3,83	82,55	0,99	14,57
<i>TRMP6</i>	-4,11	75,21	0,99	18,07
<i>TRMP7</i>	-3,79	83,63	0,99	16,00
<i>N33</i>	-3,83	82,42	0,99	16,42
<i>TUBA1b</i>	-3,74	85,19	0,99	12,78

Jurkat-Zellen				
Gen	Steigung (slope)	E in %	r ²	Schnittpunkt y-Achse (y-int)
<i>SLC41A1</i>	-3,92	79,86	0,99	15,03
<i>SLC41A2</i>	-3,89	80,70	0,99	16,59
<i>SLC41A3</i>	-3,97	78,56	0,99	15,35
<i>CNNM2</i>	-3,95	79,24	0,99	14,78
<i>NIPA1</i>	-3,88	80,99	0,99	15,65
<i>MagT1</i>	-3,94	79,29	0,99	14,16
<i>TRMP6</i>	-3,89	80,71	0,99	17,25
<i>TRMP7</i>	-3,82	82,82	0,99	14,92
<i>N33</i>	-4,04	76,90	0,99	14,90
<i>TUBA1b</i>	-3,71	86,10	0,99	12,04

humane Leukozyten (<i>Diabetes-mellitus</i>-Studie)				
Gen	Steigung (slope)	E in %	r ²	Schnittpunkt y-Achse (y-int)
<i>CNNM2</i>	-3,64	88,09	0,98	16,86
<i>TUBA1b</i>	-3,53	92,04	0,98	14,67

9.5 METHODENWEITERENTWICKLUNG

Optimierung Plattensetup nach der Proben-Maximierungs-Methode (**Abb. 37**)

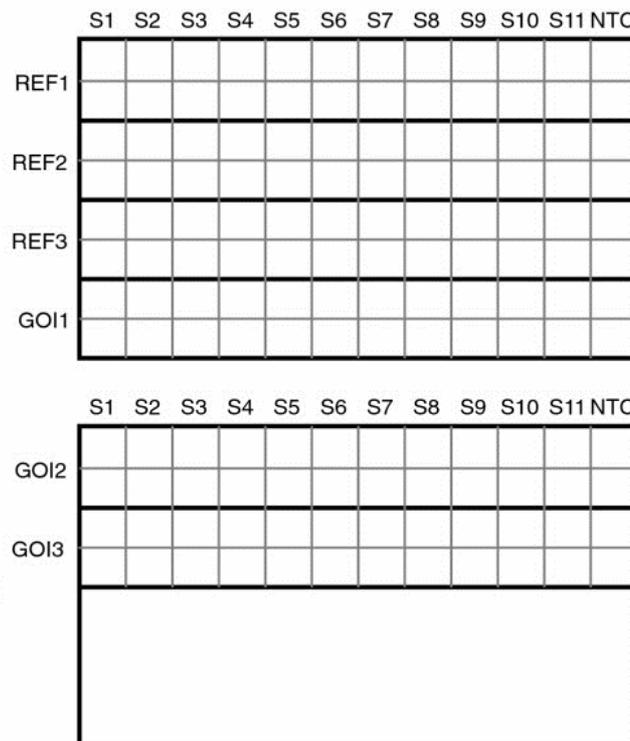


Abb.37 Plattensetup: Prinzip der Proben-Maximierungs-Methode nach Hellemans, Mortier et al. (2007): Auf der ersten Platte erfolgt die Analyse von drei Referenzgenen (REF1-3) und einem GOI (GOI1). Die maximale Anzahl von elf Proben pro Platte (S1-S11) wird, als Duplett, pro Gen untersucht. Auf den nächsten Platten werden diese elf Proben mit weiteren GOIs getestet. Ein erneutes Mitführen der Referenzgene ist nicht nötig. Eine IRC ist dann nicht nötig, wenn nicht mehr als elf Proben pro Gen zu testen sind. Eine NTC wird auf jeder Platte mitgeführt.

9.6 VERWENDETE INTERNETSEITEN

<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

<http://frodo.wi.mit.edu/> (Primer 3)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.biogazelle.com/>

<http://www.rdml.org/miqe.php>

<http://miqe.gene-quantification.info/>

<http://www.bio-rad.com/LifeScience/>

<http://www.bio-rad.com/genomics/pcrsupport>

<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>

<http://www.omim.org/>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1	Elektronenkonfiguration und Charakteristiken des Magnesiummoleküls	3
Abb.2	Hexakoordination des Magnesiumions.....	4
Abb.3	Reabsorption des gefilterten Mg ²⁺ (100 %) in verschiedenen Abschnitten des Nephrons (in Prozent).....	25
Abb.4	Übersicht über mögliche Ursachen eines Mg-Mangels.....	34
Abb.5	Übersicht über den Zusammenhang zwischen Mg-Mangel und Metabolischem Syndrom.....	35
Abb.6	Beispiel eines typischen 96-Well-Plattensetups	49
Abb.7	Kinetik der qPCR.	52
Abb.8	Bestimmung der Effizienz der PCR.	53
Abb.9	Ethidiumbromid-Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte aller ausgewählten Gene der Jurkat-Zellen.....	66
Abb.10	Ethidiumbromid-Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte aller ausgewählten Gene der JVM-13-Zellen	66
Abb.11	Expression des Gens SLC41A1 in Jurkat- und JVM-13-Zellen.....	68
Abb.12	Expression des Gens SLC41A2 in Jurkat- und JVM-13-Zellen.....	69
Abb.13	Expression des Gens SLC41A3 in Jurkat- und JVM-13-Zellen.....	70
Abb.14	Expression des Gens CNNM2 in Jurkat- und JVM-13-Zellen	71
Abb.15	Expression des Gens TRPM7 in Jurkat- und JVM-13-Zellen.....	72
Abb.16	Expression des Gens MagT1 in Jurkat und JVM-13-Zellen.....	73
Abb.17	Expression des Gens NIPA1 in Jurkat- und JVM-13-Zellen.....	74
Abb.18	Expression des Gens N33 in Jurkat- und JVM-13-Zellen	75
Abb.19	Ethidiumbromid-Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte aller ausgewählten Gene in humanen Leukozyten.....	77
Abb.20	Plasma-Mg-Konzentration gemessen in Blutproben von 115 Probanden in Phase 1 der Studie.	78
Abb.21	Intrazelluläre Mg ²⁺ -Konzentration gemessen in Blutproben von 115 Probanden in Phase 1 der Studie.....	78
Abb.22	Expressionswerte des Gens CNNM2 für 115 Patienten in Phase 1 der Studie.	79
Abb.23	Plasma-Mg-Konzentration mit korrespondierenden Expressionswerten des Gens CNNM2 aller Probanden in Phase 1 der Studie.	80
Abb.24	Intrazelluläre Mg ²⁺ -Konzentration mit korrespondierenden Expressionswerten des Gens CNNM2 aller Probanden in Phase 1 der Studie	81
Abb.25	Intrazelluläre Mg ²⁺ -Konzentration gemessen in Blutproben von 115 Probanden in Phase 1 der Studie.....	81

Abb.26	[Mg] _{Plasma} -Konzentration und korrespondierende [Mg ²⁺] _{intra} -Konzentration von 28 ausgewählten Probanden in Phase 1 der Studie	84
Abb.27	[Mg] _{Plasma} -Konzentration der 19 in den Supplementierungsversuch eingeschlossenen Probanden an den Tagen 0 und 30.....	86
Abb.28	[Mg ²⁺] _{intra} -Konzentration der 19 in den Supplementierungsversuch eingeschlossenen Probanden an den Tagen 0 und 30.....	87
Abb.29	Expression des Gens CNNM2 der 19 in den Supplementierungsversuch eingeschlossenen Probanden an den Tagen 0 und 30.....	88
Abb.30	Ethidiumbromid-Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte der ausgewählten Housekeeping Gene in humanen Leukozyten isoliert aus Diabetes-mellitus-Patienten	89
Abb.31	Nach Genstabilität M geordnete HKGs in JVM-13-Zellen.....	90
Abb.32	Nach Genstabilität M geordnete HKGs in Jurkat-Zellen	91
Abb.33	Nach Genstabilität M geordnete HKGs in humanen Leukozyten	91
Abb.34	Paarweise Variation V des Normalisierungsfaktors NF	92
Abb.35	Vergleich der GED-Werte des Gens CNNM2 aus 20 Proben (humane Leukozyten) in Abhängigkeit von der Wahl des HKGs.	93
Abb.36	Gegenüberstellung der Analysemethoden Plasma-Mg-Messung und Bestimmung der relativen Genexpression des Gens CNNM2	104
Abb.37	Plattensetup: Prinzip der Proben-Maximierungs-Methode.....	152

TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1	Mg-Verteilung im Körper	6
Tab.2	Übersicht ausgewählter Mg-sensitiver Gene	11
Tab.3	Übersicht über die verwendeten Zelllinien und ihrer Charakteristiken	42
Tab.4	Tabellarische Darstellung der Probennahme über 72 h im Zellkulturversuch	44
Tab.5	Primersequenzen und Amplikongröße der untersuchten Gene	48
Tab.6	Übersicht über die getesteten HKGs zur Optimierung des qPCR-Assays	63
Tab.7	Übersicht über die in der Abbildung 11 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen <i>SLC41A1</i> über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium.....	68
Tab.8	Übersicht über die in der Abbildung 12 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen <i>SLC41A2</i> über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium.....	69
Tab.9	Übersicht über die in der Abbildung 13 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen <i>SLC41A3</i> über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium	70
Tab.10	Übersicht über die in der Abbildung 14 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen <i>CNNM2</i> über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium.....	71
Tab.11	Übersicht über die in der Abbildung 15 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen <i>TRPM7</i> über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium.....	72
Tab.12	Übersicht über die in der Abbildung 16 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen <i>MagT1</i> über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium.....	73
Tab.13	Übersicht über die in der Abbildung 17 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen <i>NIPA1</i> über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium	74
Tab.14	Übersicht über die in der Abbildung 18 dargestellten Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen der Expression des Gen <i>N33</i> über einen Zeitraum von 48 h in Mg-freiem Medium	75
Tab.15	Gruppierung der 115 Patienten anhand der Kriterien GED-Wert, $[Mg]_{\text{Plasma}}$ -Wert und $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Wert in richtig oder falsch positiv bzw. negativ getestet, mit Angabe der Analysegenauigkeit basierend auf dem $[Mg^{2+}]_{\text{intra}}$ -Wert	83

Tab.16	Übersicht der Einzelwerte der Bestimmung der relativen Expression des Gens <i>CNNM2</i> in humanen Leukozyten in Abhängigkeit von der Wahl des HKGs.....	94
Tab.17	Zusammensetzung des Wachstumsmediums	148
Tab.18	Zusammensetzung des Versuchsmediums.....	148
Tab.19	Reaktionsansatz cDNA Synthesis.....	148
Tab.20	Reaktionsprotokoll cDNA-Synthese	149
Tab.21	Reaktionsansatz konventionelle PCR	149
Tab.22	Protocol RT-PCR	149
Tab.23	Reaktionsansatz für die quantitative PCR	150
Tab.24	Reaktionsprotokoll der qPCR.....	150
Tab.25	Effizienzen und slope der untersuchten Gene in der qPCR.....	151

EIN HERZLICHES DANKESCHÖN...

... an **Herrn Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach** für die Unterstützung und das Interesse an der Fertigstellung dieser Arbeit. Ohne Ihren energischen Anstoss wäre meine Doktorarbeit jetzt noch nicht fertig. Danke für Ihre Hilfe!

... an **Herrn Dr. Dr. Martin Kolisek** für die Überlassung des interessanten Themas, die Organisation der Blutentnahmen in der Slowakei und die Magnesiummessungen. Ein besonderer Dank geht an dich für das Wiederentdecken slowakischer Waffeln.

... an **Frau Katharina Wolf** für ... Alles! Sei es die technische, mathematische und seelisch-moralische Unterstützung. Vielen Dank!

... an die anderen **Mitarbeiter des Physiologischen Instituts** dafür, dass Ihr mir durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit geholfen habt. Danke Caro, ich bin nicht ohne Beute vom Hof geritten. An meine Mitdoktoranden: Danke für die lustige Zeit und die moralische Unterstützung. Es geht immer ... somehow.

... an **meinen Freund**, „Meister Yoda“, für die unendliche Geduld, stetige Motivation und die Bereitschaft, sich spontan mit meinen kleinen und großen Problemen, ach nein: Herausforderungen, rund um das Verfassen dieser Arbeit auseinanderzusetzen. Dankeschön, die Kraft mit mir war.

... an **Frau Dr. Anna Kosmol** für die unermüdliche seelisch-moralische Unterstützung, das Verständnis, das „Rauszerren“ an die frische Luft in der Schreibtischphase und ganz besonders für die Kuchenlieferungen.

... an **meine Eltern** dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben, mir in jeder Lebenslage Hilfe zukommen liessen, mich immer liebevoll unterstützt haben und für mich da waren.

... an **meinen Orthopäden Herrn Dr. Marienfeld** für seinen nicht unwesentlichen Beitrag zur schmerzfreien Fortsetzung der Schreibtischarbeit und damit zur Fertigstellung dieser Arbeit.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, 15.10.2012

Katharina Kurth