

Technische Universität München

ABTEILUNG FÜR NEPHROLOGIE DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK UND
POLIKLINIK DER
TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN
KLINIKUM RECHTS DER ISAR

Einfluss von Magnesium auf glatte Gefäßmuskelzellen und deren Expression von Markern der vaskulären Kalzifizierung

Sina Patricia Schiele

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Marcus Baumann
2. Prof. Dr. Hans-Henning Eckstein

Die Dissertation wurde am 02.11.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.05.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Verzeichnis der Abkürzungen	III
1. Einleitung	4
2. Zielsetzung.....	11
3. Material.....	12
3.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	12
3.2 Maschinen und Instrumente	13
3.3 Zubehör.....	14
3.4 Software	14
4. Methoden	15
4.1 Zellkultur.....	15
4.2 Real-Time-quantitative PCR.....	16
4.3 Behandlung mit niedrigen und hohen Magnesiumkonzentrationen	17
4.4 Blockade von TRPM7 mittels 2-APB	18
4.5 Korrelation von Osteopontin im Serum mit Laborparametern	19
4.6 Photometrische Messung der ALP-Aktivität	21
4.7 Statistische Auswertung	24
4.8 Software	24
5. Ergebnisse	25
5.1 Behandlung mit niedrigen und hohen Magnesiumkonzentrationen	25
5.1.1 Osteopontin-Expression.....	26
5.1.2 Alkalische Phosphatase-Expression	28
5.1.3 Osteocalcin-Expression	30
5.2 Blockade von TRPM7 mittels 2-APB.....	32
5.3 Osteopontin im Serum und Laborparameter von Dialysepatienten	34
5.4 Photometrische Messung der ALP-Aktivität	36
6. Diskussion	38
7. Zusammenfassung.....	57
8. Literaturverzeichnis	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Beeinflussung der Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen.....	10
Abbildung 2: Osteopontin Tag 1	26
Abbildung 3: Osteopontin Tag 3/4	27
Abbildung 4: Osteopontin Tag 7	27
Abbildung 5: Alkalische Phosphatase Tag 1	28
Abbildung 6: Alkalische Phosphatase Tag 3/4	29
Abbildung 7: Alkalische Phosphatase Tag 7	29
Abbildung 8: Osteocalcin Tag 1	30
Abbildung 9: Osteocalcin Tag 3/4.....	31
Abbildung 10: Osteocalcin Tag 7.....	31
Abbildung 11: Zellen an Tag 7, Nährmedium ohne 2-APB.....	33
Abbildung 12: Zellen an Tag 7, Nährmedium mit 2-APB	33
Abbildung 13: Korrelation von ionisiertem Magnesium und Osteopontin im Serum von Dialysepatienten	35
Abbildung 14: Alkalische Phosphatase Tag 1	36
Abbildung 15: Alkalische Phosphatase Tag 3/4	37
Abbildung 16: Alkalische Phosphatase Tag 7	37
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Osteopontin auf die Kalzifizierung von Gefäßmuskelzellen.....	42
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Alkalischen Phosphatase auf die Kalzifizierung von Gefäßmuskelzellen.	43
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Osteocalcin auf die Kalzifizierung von Gefäßmuskelzellen.....	44
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von BMP7 auf die Kalzifizierung von Gefäßmuskelzellen.....	45
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Blockade von TRPM7 durch 2-APB und die dadurch verminderte intrazelluläre Magnesiumkonzentration.....	47
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Beeinflussung der Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen mit Einbezug dieser Arbeit	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Behandlung mit 2-APB nach sieben Tagen 32

Tabelle 2: Laborwerte und Osteopontin-ELISA Ergebnisse 34

Verzeichnis der Abkürzungen

2-APB	2-Aminoethyl diphenylborinate
ALP	Alkalische Phosphatase
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
cDNA	complementary DNA = komplementäre Desoxynukleinsäure
DNS	Desoxynukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
nCa ²⁺	Normalisiertes ionisiertes Kalzium
nMg ²⁺	Normalisiertes ionisiertes Magnesium
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
RT-qPCR	Real-Time-quantitative PCR = quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	Standard Error of the Mean = Standardfehler des Mittelwerts
TRPM7	Transient receptor potential cation channel

1. Einleitung

Die chronische Niereninsuffizienz ist ein weltweit größer werdendes gesundheitliches und wirtschaftliches Problem (Xu et al. 2009, Ishimura et al. 2007). Ungefähr 10 % der erwachsenen Bevölkerung in Europa und den USA leiden an dieser Erkrankung, wobei das Risiko mit zunehmendem Alter ansteigt (Hallan et al. 2006). In Deutschland ist ein Anstieg der Inzidenz der Patienten mit Nierenersatztherapie von 1997 bis 2007 um 5,1 % zu verzeichnen. Dabei sind die Hauptursachen für ein dialysepflichtiges Nierenversagen in Deutschland Diabetes Mellitus Typ I/II sowie die Glomerulonephritis mit jeweils 23 % (Frei and Schober-Halstenberg 2008).

Die chronische Niereninsuffizienz wird durch die KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) als eine über mindestens drei Monate anhaltende Abweichung der Nierenstruktur oder Funktion definiert, die die Gesundheit unabhängig von der Ursache der Erkrankung beeinträchtigt (KDIGO 2013, Levey et al. 2011). Zur Klassifizierung und Beobachtung der Krankheitsintensität und des Verlaufs wird für gewöhnlich die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) sowie die Albuminurie herangezogen (Astor et al. 2008). Die eGFR wird momentan noch meist mithilfe der MDRD-Formel (Modification of Diet in Renal Disease) abgeschätzt, in die Alter, Geschlecht, Serumkreatinin und Hautfarbe eingehen. Die MDRD-Formel wird jedoch mehr und mehr von der CKD-EPI-Formel (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) abgelöst. Sie soll vor allem bei höheren GFR-Werten genauer sein. Darin wird Cystatin C anstelle des Serumkreatinins gemessen (KDIGO 2013). Durch die berechnete glomeruläre Filtrationsrate wird die chronische Niereninsuffizienz in fünf Stadien eingeteilt. Dabei bedeuten Stadium 1 mit einer GFR von $>90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ eine Nierenschädigung mit normaler oder erhöhter GFR und Stadium 5 mit einer GFR von $<15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ oder Nierenersatztherapie ein terminales Nierenversagen (Keller and Geberth 2010).

Chronisch niereninsuffiziente Patienten haben ein gesteigertes Risiko für multiple Erkrankungen bei einer im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung deutlich erhöhten Mortalität und Morbidität. So treten bei ihnen vermehrte Infektionen, kognitive Einschränkungen, Anämien, Schwäche, Urämie, endokrine und metabolische

Komplikationen wie Knochen- oder Mineralstoffwechselstörungen auf (James et al. 2009). Zudem sind viele Erkrankungen wie beispielsweise Bluthochdruck und Arteriosklerose sowohl Ursache als auch Folge von chronischen Nierenerkrankungen (Lee et al. 2010, Wilhelm-Leen et al. 2009, Astor et al. 2008). Die Erkrankung gilt zusätzlich als eigenständiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Krankheitsbilder. Dazu zählen Herzinfarkte, Schlaganfälle, Herzinsuffizienz, periphere arterielle Erkrankungen und aneurysmatische Veränderungen (Tonelli et al. 2006, Henry et al. 2002, Giachelli 2004). Tatsächlich ist die Wahrscheinlichkeit für einen Patienten mit erhöhten Kreatininwerten an einem renalen Versagen zu versterben um ein Vielfaches geringer als durch ein kardiovaskuläres Ereignis (Shulman et al. 1989). Interessant ist dabei auch die Feststellung von Meier-Kriesche und Kollegen, die ein Absinken des kardiovaskulären Risikos bei Patienten nach Nierentransplantation feststellen konnten (Meier-Kriesche et al. 2004). Als Hauptursache für die erhöhte Anzahl an kardiovaskulären Erkrankungen im Rahmen der Niereninsuffizienz ist das gehäufte Vorkommen von arteriellen Gefäßverkalkungen zu sehen (Kalra and Shanahan 2012). Schon 1974 konnten Lindner et al. eine erhöhte Atherogenese bei nierenkranken Patienten feststellen (Lindner et al. 1974). Die Kalzifizierungen treten dabei nicht erst im Terminalstadium, sondern bereits in Anfangsstadien der Niereninsuffizienz auf (Henry et al. 2002, Dulau-Florea et al. 2003). Schon beim Auftreten von Mikroalbuminurie oder nur minimal erniedrigten GFR-Werten sind periphere endotheliale Gefäßwandschädigungen vorhanden, die Anfänge der Arteriosklerose sein können (Schiffrin et al. 2007).

Die Gefäßveränderungen sind durch Wandverdickungen und -verhärtungen sowie durch Ablagerungen zum Teil kalzifizierter, arteriosklerotischer Plaques gekennzeichnet. Dabei ist sowohl die Intima mit arteriosklerotischen Prozessen als auch die Media der Gefäße betroffen. Bei niereninsuffizienten Patienten ist im Vergleich zu Nierengesunden besonders die Media der Gefäße auffällig, was auch als Mönckeberg-Sklerose oder Mediasklerose bezeichnet wird (Disthabanchong 2012). Die sklerotischen Veränderungen führen zu einer Abnahme der Elastizität und Dehnbarkeit und somit zu einer Zunahme der Steifheit der Gefäße (Hausberg et al. 2000). Diese Umbauprozesse, die mit einer Vermehrung der extrazellulären Matrix einhergehen, werden durch verschiedene Faktoren ausgelöst und entstehen durch ein Zusammenspiel unterschiedlicher Mechanismen, die äußerst komplex und immer

noch nicht vollständig verstanden sind. Es handelt sich dabei um dynamische, zum Teil zellvermittelte, sowohl aktive als auch passive Prozesse, die der Knochenbildung sehr ähnlich sind (Said and Hernandez 2014, Floege 2015). Vor allem in fortgeschrittenen Stadien der Arteriosklerose und der arteriellen Verkalkung spielen die vaskulären glatten Muskelzellen eine zentrale Rolle bezüglich der Gefäßwandveränderungen. Durch unterschiedliche Auslöser kann eine Transformation der glatten Gefäßmuskelzellen zu osteoblasten-, osteoklasten- und chondroblastenähnlichen Zellen beobachtet werden (Covic et al. 2010). Die so veränderten Zellen können Proteine des Knochenstoffwechsels und regulierende Marker bzw. Mediatoren der Knochenbildung freisetzen. Diese sind Zeichen der veränderten Differenzierung bzw. der Transformation der Zellen und haben einen bedeutenden Einfluss auf das Fortschreiten der vaskulären Kalzifizierung (Mizobuchi et al. 2009). In den betroffenen Gefäßen kann es zusätzlich zur Mineralisierung von apoptotischen und nekrotischen Gefäßmuskelzellen und zur Freisetzung von Kalzium-beladenen Vesikeln kommen. Im Kalzifizierungsprozess kommt es zur Anhäufung von Kalzium-Phosphat-Ablagerungen und zur Mineralisierung der extrazellulären Matrix in arteriosklerotischen Plaques und kalzifizierten Gefäßwänden (Shanahan et al. 2011).

Die Risikofaktoren der vaskulären Kalzifizierung niereninsuffizienter Patienten werden in traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren und nicht-traditionelle Risikofaktoren eingeteilt. Zu den traditionellen, klassischen Risikofaktoren werden Ursachen wie die arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, Rauchen und erhöhtes Alter gezählt. Nichttraditionelle Risikofaktoren sind spezifischer für die Niereninsuffizienz. Dazu gehören beispielsweise Hyperphosphatämie, oxidativer Stress, urämische Toxine, Anämie, erhöhte Inflammation, Elektrolytstörungen und Homocysteinämie (Levey et al. 2007, Sarnak et al. 2003). Zusätzlich begünstigen die Therapien der renal-bedingten Beschwerden die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Dies gilt insbesondere in fortgeschrittenen Stadien der Niereninsuffizienz. Dazu sind beispielsweise die Volumenbelastung im Rahmen der Dialyse, Elektrolytverschiebungen, als auch die Nebenwirkungen von Medikamenten zu zählen (Liu et al. 2014, Chiu et al. 2014).

Zu den wichtigsten kalzifizierungsfördernden Faktoren, die bei niereninsuffizienten Patienten häufig erhöhte Konzentrationen aufweisen, zählen Kalzium und Phosphat.

Sie sind zudem die Hauptbestandteile der Gefäßkalzifizierungen (Shanahan et al. 2011). Erhöhte Konzentrationen der beiden Stoffe führen nicht nur zu Kalzium-/Phosphat-Ablagerungen, sondern tragen auch zur aktiven osteochondrogenen Differenzierung der Gefäßmuskelzellen bei und führen zu lokal verstärkter Inflammation und Apoptose von Gefäßmuskelzellen (Mizobuchi et al. 2009, Giachelli 2004, Cozzolino et al. 2005, Chen et al. 2002, Yamanouchi et al. 2012). Hyperphosphatämie kann zudem zu sekundärem Hyperparathyreoidismus führen, was den Abbau von Knochensubstanz als Folge haben kann. Dadurch werden wiederum verstärkt Kalzium und Phosphat freigesetzt (Cozzolino et al. 2005). Therapiemaßnahmen des Hyperparathyreoidismus sind neben phosphatarmer Diät unter anderem die Gabe von Phosphatbindern, die teilweise ebenfalls kalziumhaltig sind, sowie die Gabe von Vitamin D (London 2003). Vitamin D-Substitution soll sich bei Niereninsuffizienz gefäßprotektiv auswirken und mit einer verminderten Sterblichkeit einhergehen (Vo and Disthabanchong 2014). Eine gute, gefäßprotektive Einstellung des Elektrolythaushaltes stellt also eine große therapeutische Herausforderung dar.

Demgegenüber gilt Magnesium als ein wichtiges kalzifizierungshemmendes Elektrolyt (Louvet et al. 2013, Kircelli et al. 2012). Hypomagnesiämie ist insbesondere bei schwer erkrankten Patienten häufig und kann schwerwiegende Folgen auf die Gesamtmortalität und die Entstehung von vielen Erkrankungen haben (De Francisco and Rodriguez 2013, Tong and Rude 2005). Höhere Serum-Magnesiumkonzentrationen können das Fortschreiten von Gefäßkalzifizierungen aufhalten, vorbeugen und sogar bereits vorhandene Verkalkungen vermindern (Kircelli et al. 2012). Durch welche Vorgänge Magnesium antikalzifizierend wirkt, ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich beeinflusst es die vaskuläre Kalzifizierung durch Verhinderung der Umwandlung von Kalzium-Phosphat-Ablagerungen zu stabileren Hydroxyapatit-Kristallen und fungiert als natürlicher Antagonist von Kalzium (De Francisco and Rodriguez 2013). Zudem beeinflusst Magnesium die vaskuläre Kalzifizierung über die arteriellen Gefäßmuskelzellen und somit die Expressierung von Markern der vaskulären Kalzifizierung. So sollen bei erhöhten Magnesiumkonzentrationen Inhibitoren der Gefäßverkalkung wie Osteopontin, BMP7 und Matrix-Gla-Protein vermehrt exprimiert und freigesetzt werden und gleichzeitig kalzifizierungsfördernde Stoffe wie Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase

vermindert exprimiert werden (Montezano et al. 2010, Kircelli et al. 2012). Wichtig für die Konzentration der Magnesiumionen in den vaskulären Muskelzellen sind verschiedene Kanäle bzw. Transporter. Im Mittelpunkt des Magnesiumtransports steht dabei der TRPM7-Kanal (Baldoli and Maier 2012). Der Kanal nimmt eine zentrale Rolle in der Magnesiumhomöostase der vaskulären glatten Muskelzellen ein und gehört der Melastatin-Unterfamilie der Gruppe der Transient-Rezeptor-Potenzial-Kanäle an. Er ist zudem für die Zellproliferation und das Zellüberleben wichtig und ist ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert (Nadler et al. 2001).

Wie bereits beschrieben, kann das Auftreten und Fortschreiten von vaskulären Kalzifizierungen mit einigen Markern des Knochenstoffwechsels in Zusammenhang gebracht werden. Deren Expression wird unter anderem durch die Elektrolyte Magnesium, Kalzium und Phosphat beeinflusst. In dieser Arbeit wurden vier dieser Proteine als Vertreter der im Rahmen der osteochondrogenen Differenzierung freigesetzten Marker untersucht. Dabei handelt es sich um die eher kalzifizierungshemmenden Proteine Osteopontin und BMP7 sowie um die eher kalzifizierungsfördernden Proteine Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase. Die genaue Wirkung und Beeinflussung dieser Marker sind in der bisherigen Literatur zum Teil widersprüchlich und vielfältig dargestellt. Diese Arbeit soll daher zu mehr Klarheit beitragen.

Das zu den Inhibitoren der vaskulären Kalzifizierung gezählte Protein Osteopontin ist ein im Knochenstoffwechsel bedeutendes Protein. Es gehört zu den Regulatoren der vaskulären Kalzifizierung und der Knochenmineralisierung (Wada et al. 1999, Giachelli et al. 2005). Im phosphoryliertem Zustand wirkt Osteopontin als Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung (Jono et al. 2000). Es ist neben Osteocalcin ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Knochensubstanz und wird größtenteils von Osteoblasten bzw. Osteoklasten, aber auch in großem Maße von Makrophagen produziert. Das Protein wird jedoch im menschlichen Körper ubiquitär exprimiert und kommt in unterschiedlichsten Geweben vor. Auch in kalzifizierten Gefäßwänden ist Osteopontin reichlich vorhanden und kann ebenso von den veränderten, knochenzellähnlichen Gefäßmuskelzellen sezerniert werden (Sodek et al. 2000). In Versuchen mit Osteopontin-Knock-out-Mäusen konnte eine extrem erhöhte vaskuläre Kalzifizierung im Vergleich zu Osteopontin-exprimierenden Mäusen festgestellt

werden (Speer et al. 2005). Osteopontin ist zudem auch bei Entzündungen vermehrt im Blutplasma vorhanden und nimmt eine bedeutende Rolle bei der Angiogenese, der Tumorgenese, in der Wundheilung und in der Apoptose ein (Scatena et al. 2007, Standal et al. 2004).

Auch bei dem in dieser Arbeit am Rande untersuchten BMP7 handelt es sich um einen Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung. So konnten beispielsweise Mathew et al. eine Verbesserung der vaskulären Kalzifizierung an Mäusen durch BMP7 feststellen (Mathew et al. 2006).

Das Protein Osteocalcin ist bei niereninsuffizienten Patienten ebenfalls erhöht nachweisbar (Gluba-Brzozka et al. 2014). Es wird klassischerweise von Osteoblasten sezerniert und ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Knochensubstanz. Osteocalcin hat eine regulierende Wirkung auf die Knochenmineralisierung und ist das häufigste nicht-kollagene Protein im Knochen (Idelevich et al. 2011). Auch in mineralisierter extrazellulärer Matrix wie in kalzifizierten Gefäßwänden ist Osteocalcin vorhanden. Es wird dort von Gefäßmuskelzellen sezerniert und wirkt fördernd auf die osteochondrogene Differenzierung der vaskulären Muskelzellen (De Francisco and Rodriguez 2013, Massy and Druke 2012, Cozzolino et al. 2005, Idelevich et al. 2011). Zudem hat Osteocalcin vielfältige metabolische Effekte wie beispielsweise auf den Glucosestoffwechsel (Ducy 2011).

Auch für erhöhte Serum-Konzentrationen der Alkalischen Phosphatase (ALP) konnte eine positive Korrelation mit Gefäßverkalkungen festgestellt werden (Ishimura et al. 2014). Neben der Freisetzung durch die veränderten Gefäßmuskelzellen wird die Alkalische Phosphatase besonders in der Leber und im Knochen sezerniert. Es wurde jedoch eine erhöhte kardiovaskuläre Sterblichkeit unabhängig von Leber- und Knochenparametern bei erhöhten ALP-Konzentrationen im Blut festgestellt (Yamashita 2011). Es gibt Überlegungen, dass die medikamentöse Gabe von Inhibitoren der Alkalischen Phosphatase eine mögliche therapeutische Option gegen unerwünschte Verkalkungen darstellen könnte (Narisawa et al. 2007).

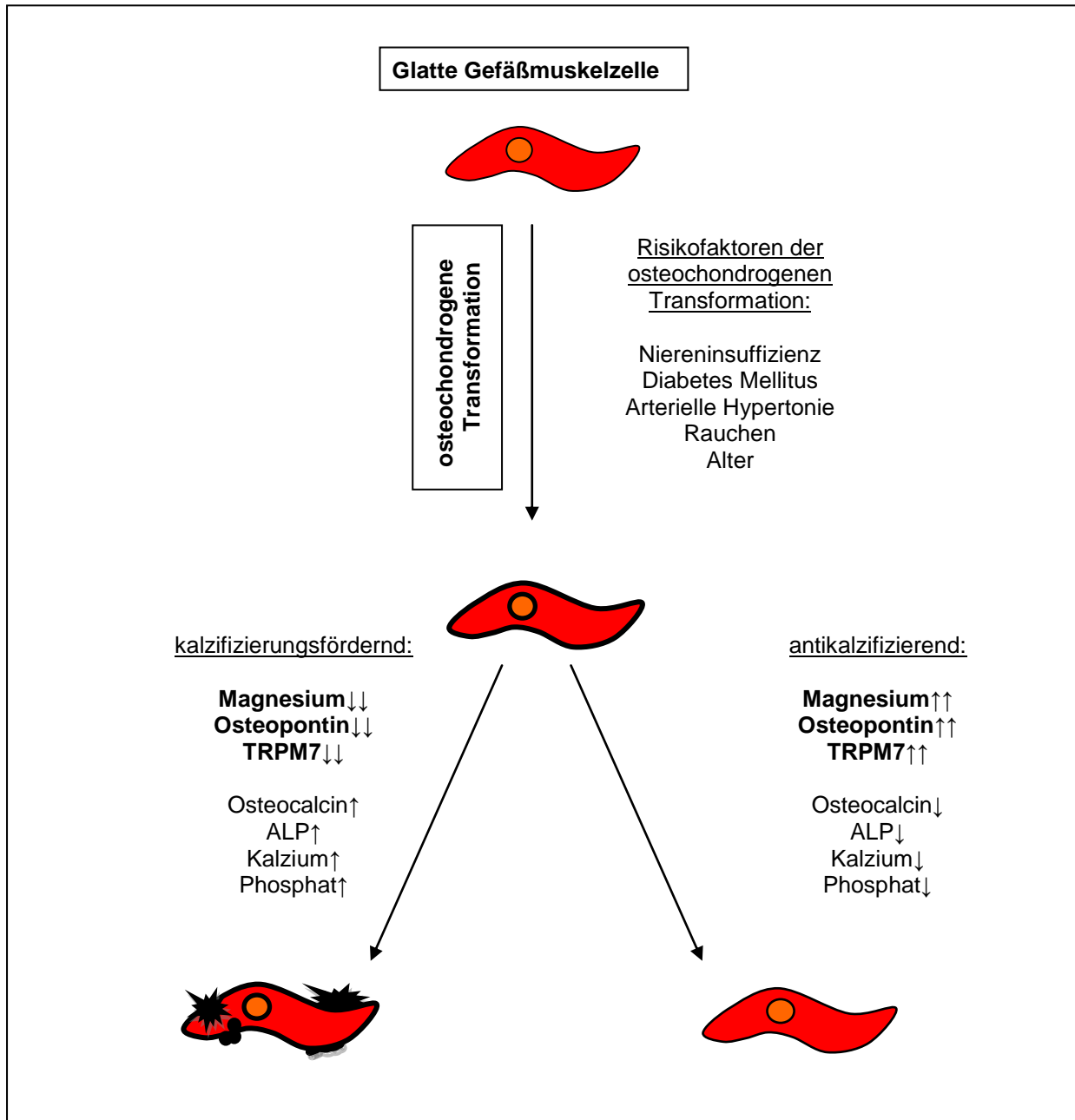


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Beeinflussung der Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen

Die vaskuläre Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen wird durch unterschiedliche Faktoren begünstigt. Verschiedene Risikofaktoren führen zur verstärkten Transformation der Zellen hin zu osteoklasten-/osteoblasten-/chondroblasten-ähnlichen Zellen. Protektive Faktoren wie beispielsweise Magnesium und Osteopontin können diese Veränderungen aufhalten bzw. zum Teil wieder rückgängig machen. Kalzifizierungsfördernde Faktoren wie beispielsweise Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase jedoch führen zu verstärkten Kalzifizierungsvorgängen (Abbildung in Anlehnung an Kalra and Shanahan 2012).

2. Zielsetzung

Es gibt einige Studien hinsichtlich der Wirkung von Magnesium auf humane glatte Gefäßmuskelzellen. Bisher wurden jedoch noch keine humanen glatten Gefäßmuskelzellen auf genetischer Ebene hinsichtlich der Beeinflussung von Magnesium auf die Expression der Marker des Knochenstoffwechsels Osteopontin, Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase überprüft. Daher war zunächst ein Ziel dieser Arbeit den Einfluss von unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen auf humane Gefäßmuskelzellen in vitro hinsichtlich der Vorgänge der Gefäßverkalkung näher zu beleuchten. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Marker der vaskulären Kalzifizierung bzw. des Knochenstoffwechsels Osteocalcin, Alkalische Phosphatase, BMP7 und insbesondere Osteopontin gelegt. Zusätzlich wurde bei Dialysepatienten überprüft, ob eine Korrelation zwischen einigen Laborparametern und der Osteopontin-Konzentration im Serum vorliegt.

Bisher sind die Mechanismen, die zu vaskulären Verkalkungen führen, nach wie vor nicht vollständig geklärt und erforscht. Durch ein besseres Verständnis der Ursachen könnte die Prognose von niereninsuffizienten Patienten in der Zukunft verbessert werden. Die bisherigen Therapieansätze haben noch nicht zu einer signifikant verringerten kardiovaskulären Mortalität und Morbidität geführt. Die aktuelle Behandlung zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos bei niereninsuffizienten Patienten zielt auf die Einstellung der traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren und der Normalisierung der bei Niereninsuffizienz auftretenden Risikofaktoren ab (Vo and Disthabanchong 2014). Magnesium zu substituieren wäre ein vermutlich sehr nebenwirkungsarmer und preisgünstiger Weg das Outcome der Patienten zu verbessern. Die genauen Wirkmechanismen und mögliche Nebenwirkungen müssen jedoch noch in weiteren Studien untersucht werden.

3. Material

3.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

- 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB); *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*
- 4-Nitrophenol solution; *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*
- 4-Nitrophenyl phosphate di-Sodium salt hexahydrate; *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*
- BCA Protein Assay Kit; *Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*
- Buffer RLT Lysis buffer; *Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland*
- Kalziumgluconat 10 %; *B. Braun, Melsungen, Deutschland*
- Dulbecco`s PBS (1x) without Ca & Mg; *PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich*
- Ethanol (70%, 96%, 100%); *Apotheke Klinikum r. d. Isar, München, Deutschland*
- Glycin (MW 75,05 g/mol); *Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*
- Human Osteopontin (OPN) Quantikine ELISA Kit; *R&D Systems, Minneapolis, USA*
- iQ™ SYBR® Green Supermix; *BioRad, Hercules, USA*
- iScript™ cDNA Synthesis Kit; *BioRad, Hercules, USA*
- Magnesium Verla i.v./i.m.; *Verla Pharm, Tutzing, Deutschland*
- Methanol; *Apotheke Klinikum r. d. Isar, München, Deutschland*
- MgCl₂ (MW 95,21 g/mol); *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*
- Natronlauge (c (NaOH) = 1 mol/L); *Merck, Darmstadt, Deutschland*
- Penicillin Streptomycin Amphotericin B Solution; *American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA*
- Phenol Red; *American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA*
- Primary Aortic Smooth Muscle Cells; Normal, Human; *American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA*
- Primer; *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*
- RNase Zap; *Ambion, Life Technologies, Carlsbad, USA*
- RNase-Free DNase Set; *Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland*
- RNeasy Mini Kit; *Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland*
- Sodium Citrate 4 %; *Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland*
- β-Mercaptoethanol; *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*
- Tris-Base (MW 121,14 g/mol); *Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*
- Trypan Blue Solution; *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*

- Trypsin Neutralizing Solution; *American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA*
- Trypsin/EDTA for Primary Cells, 0,05 % Trypsin und 0,02% EDTA beinhaltend; *American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA*
- Vascular Cell Basal Medium; *American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA*
- Vascular Smooth Muscle Cell Growth Kit, beinhaltend: recombinant human (rh), FGFb, rh insulin, ascorbic acid, L-glutamine, rh EGF und FBS; *American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA*
- β -Glycerophosphate disodium salt hydrate, MW 216,04; *Sigma-Aldrich, Missouri, USA*

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) hergestellt.

3.2 Maschinen und Instrumente

- Autoclave, H+P/Varioklav; *Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*
- Centrifuge, Biofuge/Multifuge 3 L-R; *Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*
- FLUOstar Omega Multidetektion Microplate Reader; *BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland*
- Gefrierschrank; *Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*
- Incubator, Heracell; *Heraeus, Osterode, Deutschland*
- Kompaktes Fluoreszenz-Mikroskop HS BZ-9000 Biorevo; *Keyence, Osaka, Japan*
- Electrolyte 8 Analyzer; *Nova Biomedical, Ceshire, United Kingdom*
- Durchlicht-Mikroskop OPTECH; *Optical Technology Germany, München, Deutschland*
- pH-Meter; *Sartorius, Göttingen, Deutschland*
- BioPhotometer; *Eppendorf, Hamburg, Deutschland*
- Precise Weighing Machine; *Sartorius, Göttingen, Deutschland*
- Real Time PCR System, MyiQ; *BioRad, Hercules, USA*
- Sicherheitswerkbank Herasafe; *Heraeus, Osterode, Deutschland*
- Thriller Thermoshaker Incubator; *Peqlab, Erlangen, Deutschland*
- Water purification system; *Millipore, Billerica, USA*
- Waterbath with thermostat, SW 21; *Julabo, Seelbach, Deutschland*

3.3 Zubehör

- Centrifuge tubes; *Eppendorf, Hamburg, Deutschland*
- Falcons; *BD, Heidelberg, Deutschland*
- Pipetten; *Eppendorf, Hamburg, Deutschland*
- Serum separator tubes; *Microvette, USA*
- Spritze; *B. Braun, Melsungen, Deutschland*
- Tissue culture flasks and plates; *TPP Techno Plastic Products, Schweiz*
- Zählkammer C-Chip; *Digital Bio, Seoul, Korea*

3.4 Software

- CLC Sequence Viewer 6, *Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland*
- Graph Pad Software, *Graph Pad Software, Inc, La Jolla, USA*
- Oligo Analyzer 1. 0. 2, *Teemu Kuulasmaa, University of Kuopio, Finland*
- End Note X6, *Thomson Reuters, New York City, USA*
- Microsoft Excel, *Microsoft Corporation, Remond, USA*
- Microsoft Word, *Microsoft Corporation, Remond, USA*
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), *United States National Library of Medicine, Bethesda, USA*

4. Methoden

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen auf humane glatte Gefäßmuskelzellen untersucht. Dabei wurde zunächst die Konzentration der Alkalischen Phosphatase mittels photometrischer Messung nach Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen ermittelt sowie die Expression von verschiedenen Markern des Knochenstoffwechsels bzw. der vaskulären Kalzifizierung mittels PCR verglichen. Daraufhin wurde die Auswirkung der Hemmung des, für die Magnesiumhomöostase wichtigen, TRPM7-Kanals auf die gleichen Marker der vaskulären Kalzifizierung und bezüglich des Zellverhaltens untersucht. Zudem wurde die Korrelation des antikalzifizierenden Proteins Osteopontin im Serum mittels ELISA mit verschiedenen Laborparametern von Dialysepatienten untersucht.

4.1 Zellkultur

Die beschriebenen Zellversuche wurden mit primären humanen Zellen der Firma ATCC (American Type Culture Collection) durchgeführt. Es handelt sich um humane glatte Muskelzellen aus der Aorta. Die Zellen stammen von einem 23-jährigen, männlichen Kaukasier und wurden nach den Empfehlungen des Herstellers kultiviert. Für die Versuche wurden Zellen vom 4. bis zum 11. Splitten verwendet.

Das Arbeiten mit den Zellen fand unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank statt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen in einem Inkubationsschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das während der Zellkultivierung verwendete Medium wurde, wie vom Hersteller empfohlen, mit dem Vascular Smooth Muscle Cell Growth Kit und Antibiotika (Penicillin-Streptomycin-Amphotericin-B-Lösung) versehen. Während der Versuche wurde Medium ohne Antibiotika, jedoch mit dem Vascular Smooth Muscle Cell Growth Kit verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bzw. drei Tage.

4.2 Real-Time-quantitative PCR

Zur Durchführung einer quantitativen PCR erfolgte zunächst die Isolation von RNA sowie die Herstellung von cDNA.

Zur Gewinnung von RNA wurden die Zellen auf Kulturplatten behandelt, das Medium entfernt, zweimalig mit DPBS gewaschen und mithilfe von RLT-Buffer mit 1 %-igem β -Mercaptoethanol und einem Spatel von den Kulturplatten gelöst und in Tubes transferiert. Diese Suspension wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur späteren RNA-Gewinnung aufbewahrt. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit unter Verwendung des RNase-Free DNase Set entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die Qualität der RNA wurde durch das Photometer, Multiscan FC überprüft. Komplementäre DNS (cDNA) wurde mittels iScriptTM cDNA Synthesis Kit ebenso entsprechend den Herstellerangaben angefertigt. Die Real-Time-quantitative PCR wurde mit Hilfe von iQTM SYBR[®] Green Supermix durchgeführt. Als Referenz-Gen bzw. zur Normalisierung diente dabei GAPDH. Zur Quantifizierung wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode angewendet. Die Ergebnisse sind als Vielfaches der Kontrolle angegeben (Livak and Schmittgen 2001).

Die verwendeten cDNA Primer waren hierbei:

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	CAACTGCTTAGCACCCCTGG	CAGGTCAGGTCCACCACTGA
ALP	ACCATTCCCACGTCTTCACAT	AGACATTCTCTCGTTCACCGCC
Osteopontin	ACTCCAGTTGTCCCCACAGT	GGCTGTCCCAATCAGAAGGC
Osteocalcin	CTCCTGAAAGCCGATGTGGT	GTAGTGAAGAGACCCAGGCG
BMP7	GAGCACTTGGGCAGGGAATC	CTTCCTGGTTCTTGGGCGTC

4.3 Behandlung mit niedrigen und hohen Magnesiumkonzentrationen

In diesen Versuchen wurde die Expression von Markern der vaskulären Kalzifizierung in Kalzifizierungsmedium in Abhängigkeit von verschiedenen Magnesiumkonzentrationen mittels quantitativer PCR ermittelt.

Dazu wurden die humanen glatten Gefäßmuskelzellen aus der Aorta auf 60-well Platten verteilt und in zwei verschiedenen Konditionen behandelt. Das Medium wurde zusätzlich mit 10 mmol/L β -Glycerophosphat, das kalzifizierungsfördernd ist, versetzt (Wada et al. 1999). Dem Medium wurde Citrat hinzugefügt (zu 1 ml Medium 100 μ l Citrat) und durch Zugabe von Magnesium und Kalzium die gewünschten Ionenkonzentrationen geschaffen. Bei jedem Medium-Wechsel wurde das Medium mit den gleichen Elektrolytkonzentrationen versetzt.

Magnesium- und Kalziumkonzentrationen:

	Mg ²⁺ (Mittelwert)	Ca ²⁺ (Mittelwert)
Hohe Magnesiumkonzentration	2,50 mmol/L	1,38 mmol/L
Niedrige Magnesiumkonzentration	0,61 mmol/L	1,35 mmol/L

Die Zellen wurden jeweils einen, drei bzw. vier und sieben Tage behandelt. Dann erfolgte wie bereits beschrieben die Gewinnung von RNA, die Herstellung der cDNA und daraus die Durchführung der quantitativen PCR. Dabei wurden als Marker der vaskulären Kalzifizierung Osteopontin, Osteocalcin, BMP7 und die Alkalische Phosphatase in der qPCR untersucht. Die Daten zu BMP7 werden in den Ergebnissen nicht weiter aufgeführt, da der Marker in den Versuchen nicht nachweisbar war. Die Versuche wurden vier- bzw. fünfmal unabhängig voneinander wiederholt.

4.4 Blockade von TRPM7 mittels 2-APB

Der TRPM7-Kanal nimmt eine zentrale Rolle für die Magnesiumhomöostase der glatten Gefäßmuskelzellen ein. Bei 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) handelt es sich um einen unspezifischen Blocker des TRPM7-Kanals (Chokshi et al. 2012). Die Zugabe von 2-APB bewirkt einen verminderten Einstrom von Magnesium in die Gefäßmuskelzelle (Hamaguchi et al. 2003).

Die humanen, glatten Gefäßmuskelzellen aus der Aorta wurden erneut auf 60-well Platten verteilt und in zwei verschiedenen Konditionen behandelt. Bei der Hälfte der Zellen wurde dem Medium zusätzlich 0,1 mM 2-APB zugegeben (Louvet et al. 2013). 2-APB wurde dem Medium zu Beginn und bei jedem Medium-Wechsel, der alle zwei bis drei Tage stattfand, in gleicher Konzentration zugesetzt. Die Konzentrationen für Magnesium und Kalzium waren in beiden Bedingungen gleich.

Magnesium- und Kalziumkonzentrationen:

	Mg ²⁺ (Mittelwert)	Ca ²⁺ (Mittelwert)
Versuche mit und ohne 2-APB	2,25 mmol/L	1,35 mmol/L

Die Zellen wurden jeweils sieben Tage behandelt. Dann erfolgte die Gewinnung von RNA, die Herstellung der cDNA und die qPCR. Dabei wurden als Marker der vaskulären Kalzifizierung Osteopontin, Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase in der qPCR nachgewiesen. Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Das veränderte Wachstums-/Adhäsionsverhalten konnte mittels Mikroskopie festgehalten werden.

4.5 Korrelation von Osteopontin im Serum mit Laborparametern

In diesen Versuchen sollten Zusammenhänge bzw. Korrelationen zwischen Serum-Osteopontin-Konzentrationen mit Laborparametern wie den Blutelektrolyten der Dialysepatienten untersucht werden.

Serumproben

Die verwendeten Serumproben stammen von dialysepflichtigen Patienten der Dialysestation des Klinikums rechts der Isar, München. Die Probengewinnung geschah bereits ein Jahr vor Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen.

Den Patienten wurde dabei Blut in einem Serumröhrchen entnommen, das daraufhin zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein anderes Gefäß überführt und bei -80 °C eingefroren. Im Rahmen der Routinebehandlung erfolgte zudem eine Blutentnahme, u. a. mit Bestimmung von Magnesium, Kalzium, Phosphat, pH und des Gesamteiweißes. Insgesamt waren 23 Serum-Proben von 23 Patienten vorhanden. Dabei wurden 17 für die Osteopontin-Bestimmung mittels ELISA verwendet. 2 Proben wurden wegen zu starker Abweichungen der Osteopontin-Konzentrationen ausgeschlossen. Die Ergebnisse des Osteopontin-ELISAs wurden mit den Laborergebnissen der Patienten korreliert.

Osteopontin ELISA

Der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) wurde unter Verwendung des *Human Osteopontin (OPN) Quantikine ELISA Kits* von R&D Systems nach Herstellerangaben durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein quantitatives antikörperbasiertes Nachweisverfahren. Sowohl die verwendeten Serumproben als auch die Standardreihe wurden in zweifacher Ausfertigung bestimmt.

Die Serumproben wurden auf Eis aufgetaut und mit der im Kit mitgelieferten Lösung 25-fach verdünnt. Stichprobenartig wurden mittels Electrolyte 8 Analyzer von Nova Biomedical erneut die Elektrolytkonzentrationen von Magnesium und Kalzium bestimmt. Diese waren mit den im Labor erhobenen Werten vor Einfrieren der Proben

übereinstimmend. Zur Quantifizierung wurde jeweils die mitgelieferte Standardreihe mit bekannten Osteopontin-Konzentrationen verwendet. Die Serumproben und die Proben der Standardreihe wurden nun auf eine Mikrotiterplatte gegeben, die mit einem monoklonalen für Osteopontin-spezifischen Antikörper benetzt ist. Das in den Proben vorhandene Osteopontin bindet mit einem Antigen den Antikörper. Mittels einer Waschlösung sollen die ungebundenen Substanzen entfernt werden. Daraufhin wird ein Zweiter für Osteopontin spezifischer polyklonaler und enzymbeladener Antikörper hinzugegeben, der Osteopontin an einem anderen Epitop bindet. Nach Inkubation mit diesem Antikörper werden die ungebundenen Stoffe erneut durch wiederholtes Waschen abgelöst. Nun wird ein zum Enzym passendes Substrat zugegeben, das zu einem Farbumschlag führt. Mittels Absorptionsmessung kann nun die Konzentration von Osteopontin quantitativ bestimmt werden. Eine höhere Absorption entspricht einer höheren Markerkonzentration.

Die Ergebnisse sind in ng/mL angegeben und wurden mit dem Verdünnungsfaktor 25 multipliziert.

4.6 Photometrische Messung der ALP-Aktivität

In diesem Versuch wurde untersucht, ob die humanen Gefäßmuskelzellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen unterschiedliche Konzentrationen der Alkalischen Phosphatase sezernieren. Dies wurde mithilfe der photometrischen Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase durchgeführt.

Bei der Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wird deren Enzymeigenschaft ausgenutzt. Dabei kommt es durch Zugabe eines Substrats, das durch die Alkalische Phosphatase gespalten wird, zu einem photometrisch messbaren Farbumschlag, der Rückschlüsse auf die Konzentration der Alkalischen Phosphatase zulässt.

Die Messungen wurden nach Ehnert et al. in leicht abgewandelter Form durchgeführt (Ehnert et al. 2011). Die humanen, glatten Gefäßmuskelzellen aus der Aorta wurden dazu auf 24-well Platten verteilt. Bei einer Konfluenz von etwa 90 % wurden die Zellen in zwei verschiedenen Konditionen für einen, drei bzw. vier oder sieben Tage behandelt. Dem Medium wurde 10 mmol/L des kalzifizierungsfördernden β -Glycerophosphat hinzugefügt (Wada et al. 1999). Zur besseren Steuerung der Elektrolytkonzentrationen wurde das Medium mit Citrat versetzt, das zweifach positive Ionen wie Magnesium und Kalzium bindet. Bei beiden Konditionen wurde zu 1 ml Medium je 100 μ l Citrat hinzugegeben. Durch Zugabe von Magnesium und Kalzium wurden die folgenden Elektrolytkonzentrationen erzielt. Bei jedem Medium-Wechsel wurde das Medium mit den gleichen Elektrolytkonzentrationen versetzt.

Magnesium- und Kalziumkonzentrationen:

	Mg ²⁺ (Mittelwert)	Ca ²⁺ (Mittelwert)
Hohe Magnesiumkonzentration	2,05 mmol/L	1,21 mmol/L
Niedrige Magnesiumkonzentration	0,57 mmol/L	1,21 mmol/L

Die ALP-Konzentrationen wurden jeweils nach einem, drei bzw. vier und sieben Tagen gemessen. Dazu wurden die Zellen mit einer ALP-Substrat-Lösung inkubiert (1 mM p-Nitrophenylphosphat, 50 mM Glycin, 100 mM TRIS, 2 mM MgCl₂, ddH₂O, pH 10,5). P-Nitrophenylphosphat diente dabei als chromogenes Substrat für die Alkalische Phosphatase. Das durch die enzymatische Aktivität der ALP entstandene P-Nitrophenol kann photometrisch nachgewiesen werden.

Die Messung wurde wie folgt durchgeführt: Pro well einer 24-well Platte wurde nach zweimaligem Waschen mit Dulbecco's PBS je 500 µL der ALP-Substrat-Lösung hinzugegeben. Als Negativ-Kontrolle diente dabei die Inkubation der ALP-Substrat-Lösung ohne Zellen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen mit der ALP-Substrat-Lösung bei 37 °C. Da die Substrat-Lösung die Zellen langsam von der Oberfläche ablöste, konnten die Zellen nach der Inkubation durch einen Schaber leicht abgelöst werden. Die Substrat-Lösung mit den Zellen wurde nun in ein Tube transferiert und 5 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Von dem dabei entstandenen Überstand wurden je 100 µL in dreifacher Ausfertigung in 96-well Platten-Vertiefungen gegeben. Daraufhin wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe mit P-Nitrophenol-Lösung hergestellt. Umso mehr Alkalische Phosphatase durch die Gefäßmuskelzellen sezerniert wird, desto größer fällt der Farbumschlag aus, der mittels photometrischer Messung messbar ist.

Die durch die photometrische Messung ermittelte Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde in Bezug zur relativen Proteinmenge gesetzt. Diese wurde ebenfalls mithilfe des Überstands mittels BCA-Protein-Messung erhoben. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von drei bis sieben unabhängigen Versuchen und sind als ALP-Aktivität in pg/ml pro µg/µl Protein angegeben.

BCA-Protein-Messung

Die BCA-Protein-Messung ist eine Methode zur Detektion von Proteinen und wurde hier verwendet um die gemessene ALP-Aktivität in Relation zur vorhandenen Proteinmenge zu setzen (Smith et al. 1985). Die Messung wurde von uns nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei diente als Verdünnungsmittel für die Standardreihe die oben beschriebene ALP-Substrat-Lösung.

4.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, des Vergleichs der Marker der vaskulären Kalzifizierung bei hohen und niedrigen Magnesiumkonzentrationen und der Behandlung der Zellen mit bzw. ohne 2-APB sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM; standard error of mean) angegeben.

Zur Quantifizierung der relativen Gen-Expression der quantitativen PCR wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode angewendet (Livak and Schmittgen 2001). Die Ergebnisse sind dabei als Vielfaches der Kontrolle angegeben.

Für die Analyse von möglichen Unterschieden der Daten wurden in dieser Arbeit zweiseitige t-Tests für verbundene Stichproben durchgeführt. P-Werte von $p < 0,05$ wurden dabei als signifikant angesehen.

Zur Überprüfung der Korrelation der erhobenen Laborparameter und der Osteopontin-Konzentration wurde unter Annahme einer Normalverteilung mit linearem Zusammenhang der Korrelationskoeffizient r nach Pearson verwendet (in dieser Arbeit werden nur die Ergebnisse der Korrelation zwischen Osteopontin und ionisiertem Magnesium dargestellt).

4.8 Software

Die verwendeten Primer wurden mittels Oligo Analyzer Software, dem CLC Sequence Viewer 6 und des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) entwickelt.

Die statistische Auswertung wurde mithilfe von Excel und Graph Pad Prism 5 durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 Behandlung mit niedrigen und hohen Magnesiumkonzentrationen

Die Abbildungen 2 bis 10 zeigen die mittels PCR ermittelte Expression von jeweils Osteopontin, Osteocalcin und Alkalischer Phosphatase in glatten vaskulären Gefäßmuskelzellen nach einem, drei bzw. vier oder sieben Tagen der Behandlung. Dabei wurde die Expression von diesen Markern der vaskulären Kalzifizierung nach der Inkubation mit geringen Magnesiumkonzentrationen und mit höheren Magnesiumkonzentrationen verglichen. Die Diagramme zeigen, um wie viel Fach der jeweilige Marker bei der Behandlung mit hohen Magnesiumkonzentrationen im Vergleich zu der niedrigen Magnesium-Behandlung exprimiert wurde. Die Expression der Marker bei der Behandlung mit niedriger Magnesiumkonzentration wurde auf 1 festgelegt und stellt die Kontrolle dar. Die Resultate sind Mittelwerte \pm SEM von vier bzw. fünf Versuchen.

5.1.1 Osteopontin-Expression

Die folgenden Abbildungen zeigen die Expression von Osteopontin nach einem, drei bzw. vier und sieben Tagen der Inkubation in Nährmedium mit geringen Magnesiumkonzentrationen im Vergleich zu höheren Magnesiumkonzentrationen. Nach einem Tag sowie nach drei bzw. vier Tagen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Osteopontin-Expression gezeigt werden. Nach sieben Tagen konnte jedoch eine mehr als zweifach erhöhte Expression von Osteopontin in der Gruppe der höheren Magnesiumkonzentration gesehen werden. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant verschieden ($p = 0,075$). Dabei zeigten 4 der 5 Versuche eine stärkere Expression bei höherer Magnesiumkonzentration. Im 5. Versuch zeigte sich kein Unterschied in der Expression der zwei Vergleichsgruppen (Einzelergebnisse nicht dargestellt).

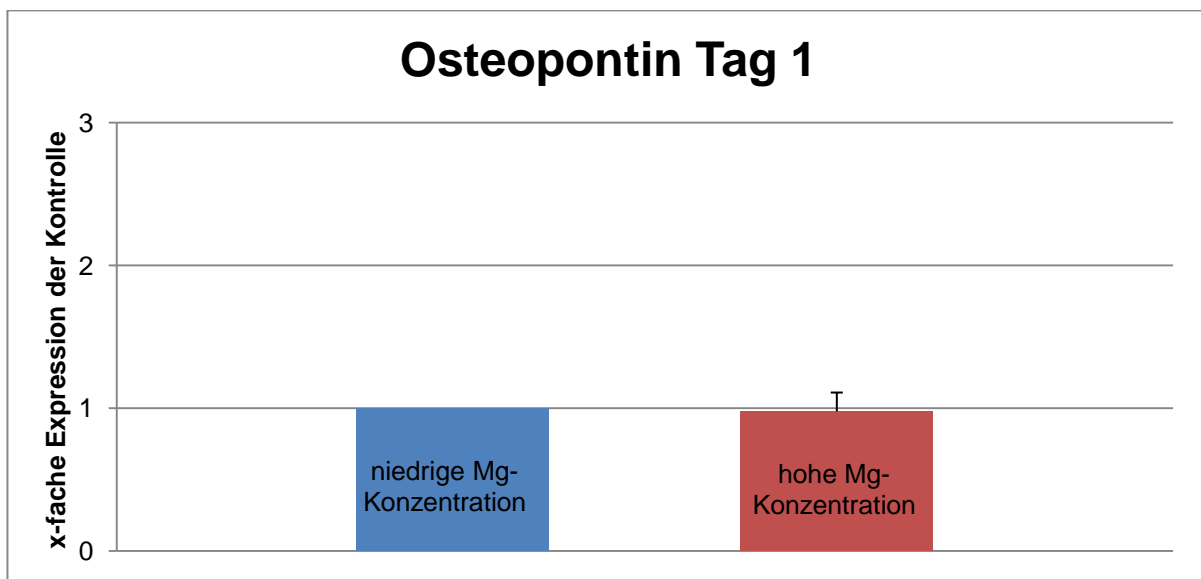


Abbildung 2: Osteopontin Tag 1

Der Mittelwert der Osteopontin-Expression für die Messungen mit den hohen Magnesiumkonzentrationen betrug an Tag 1 ein 0,98-faches der Kontrolle ($n = 5$). Der SEM betrug 0,13. Beim zweiseitigen gepaarten t-Test war $p > 0,05$.

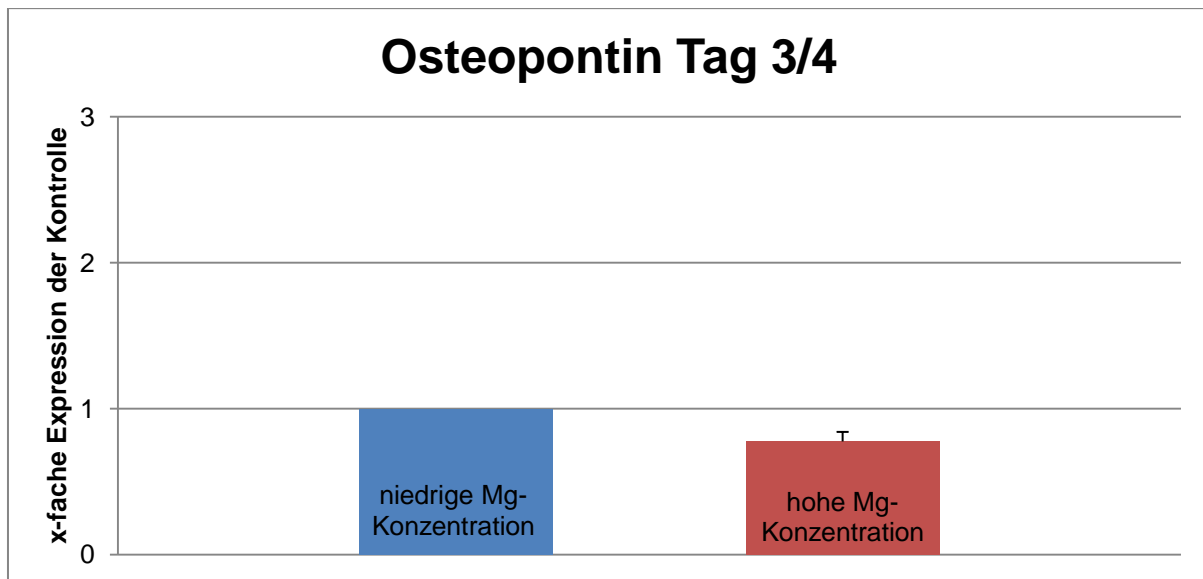


Abbildung 3: Osteopontin Tag 3/4

Der Mittelwert der Osteopontin-Expression für die Messungen mit den hohen Magnesiumkonzentrationen betrug an Tag 3/4 ein 0,78-faches der Kontrolle (n = 5). Der SEM betrug 0,07. Beim zweiseitigen gepaarten t-Test war $p = 0,093$.

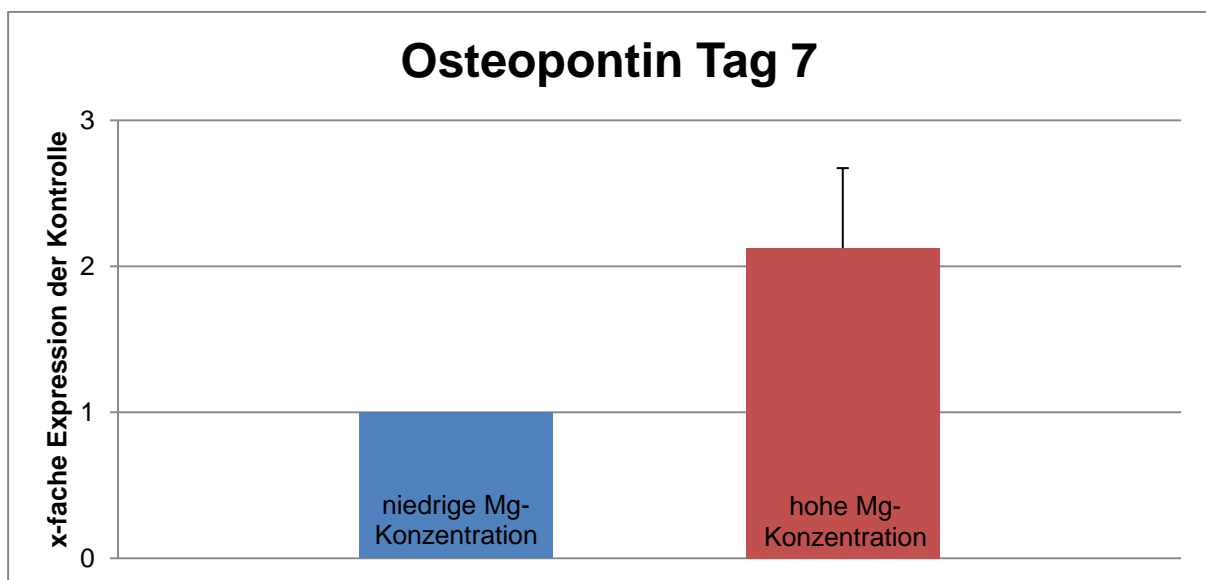


Abbildung 4: Osteopontin Tag 7

Der Mittelwert der Osteopontin-Expression für die Messungen mit den hohen Magnesiumkonzentrationen betrug an Tag 7 ein 2,12-faches der Kontrolle (n = 5). Der SEM betrug 0,55. Beim zweiseitigen gepaarten t-Test war $p = 0,075$.

5.1.2 Alkalische Phosphatase-Expression

Die folgenden Abbildungen zeigen die Expression der Alkalischen Phosphatase nach einem, drei bzw. vier und sieben Tagen der Inkubation in Nährmedium mit geringen Magnesiumkonzentrationen im Vergleich zu höheren Magnesiumkonzentrationen.

Nach einem Tag sowie nach drei bzw. vier Tagen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Alkalischen Phosphatase gezeigt werden. Nach sieben Tagen konnte jedoch eine mehr als 1,5-fach erhöhte Expression der Alkalischen Phosphatase in der Gruppe der höheren Magnesiumkonzentration gesehen werden. Diese leicht vermehrte Expression war jedoch nicht signifikant verschieden ($p = 0,061$).

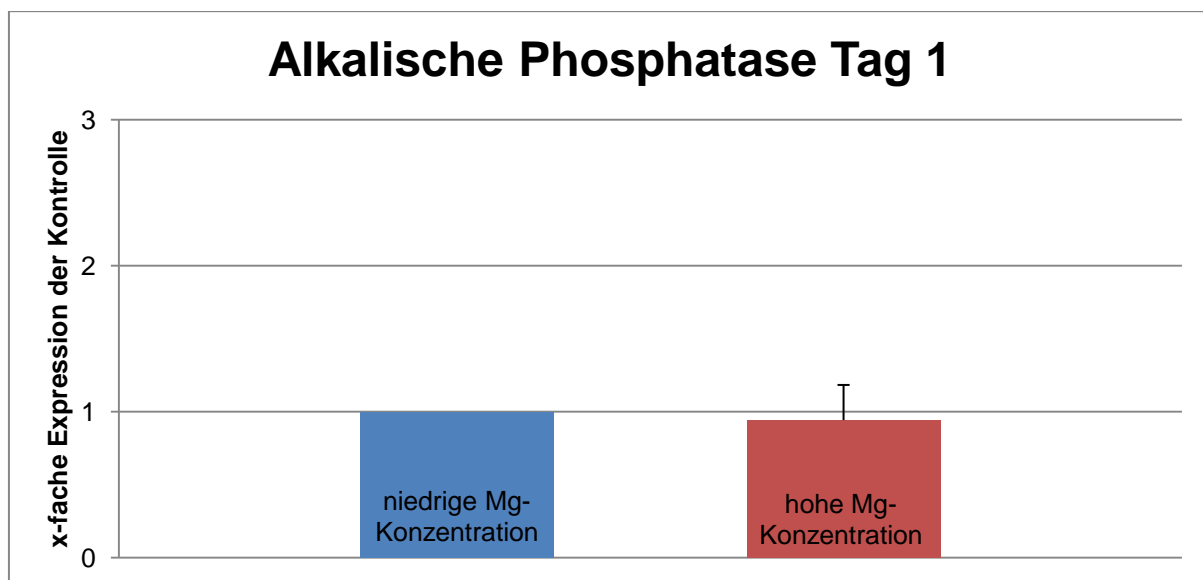


Abbildung 5: Alkalische Phosphatase Tag 1

Der Mittelwert der Alkalischen Phosphatase-Expression für die Messungen mit den hohen Magnesiumkonzentrationen betrug an Tag 1 ein 0,94-faches der Kontrolle ($n = 4$). Der SEM betrug 0,24. Beim zweiseitigen gepaarten t-Test war $p > 0,05$.

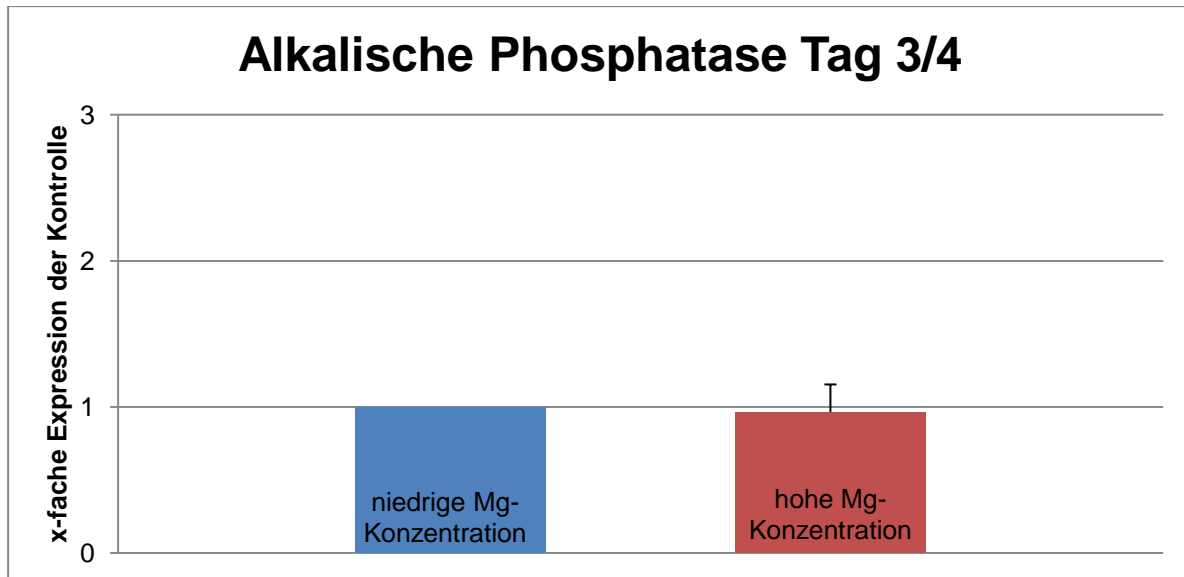


Abbildung 6: Alkalische Phosphatase Tag 3/4

Der Mittelwert der Alkalischen Phosphatase-Expression für die Messungen mit den hohen Magnesiumkonzentrationen betrug an Tag 3/4 ein 0,97-faches der Kontrolle (n = 5). Der SEM betrug 0,19. Beim zweiseitigen gepaarten t-Test war $p > 0,05$.

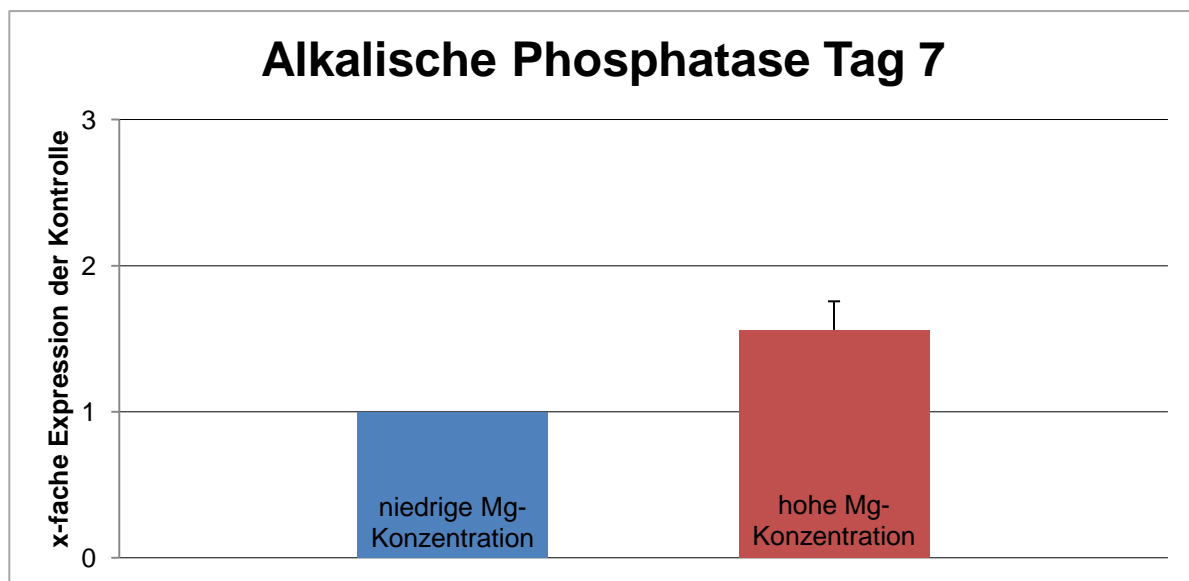


Abbildung 7: Alkalische Phosphatase Tag 7

Der Mittelwert der Alkalischen Phosphatase-Expression für die Messungen mit den hohen Magnesiumkonzentrationen betrug an Tag 7 ein 1,56-faches der Kontrolle (n = 5). Der SEM betrug 0,20. Beim zweiseitigen gepaarten t-Test war $p = 0,061$.

5.1.3 Osteocalcin-Expression

Die folgenden Abbildungen zeigen die Expression von Osteocalcin nach einem, drei bzw. vier und sieben Tagen der Inkubation in Nährmedium mit geringen Magnesiumkonzentrationen im Vergleich zu höheren Magnesiumkonzentrationen.

Für Osteocalcin konnte weder nach einem Tag, nach drei bzw. vier Tagen oder nach sieben Tagen ein signifikanter Unterschied in der Expression bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen gesehen werden.

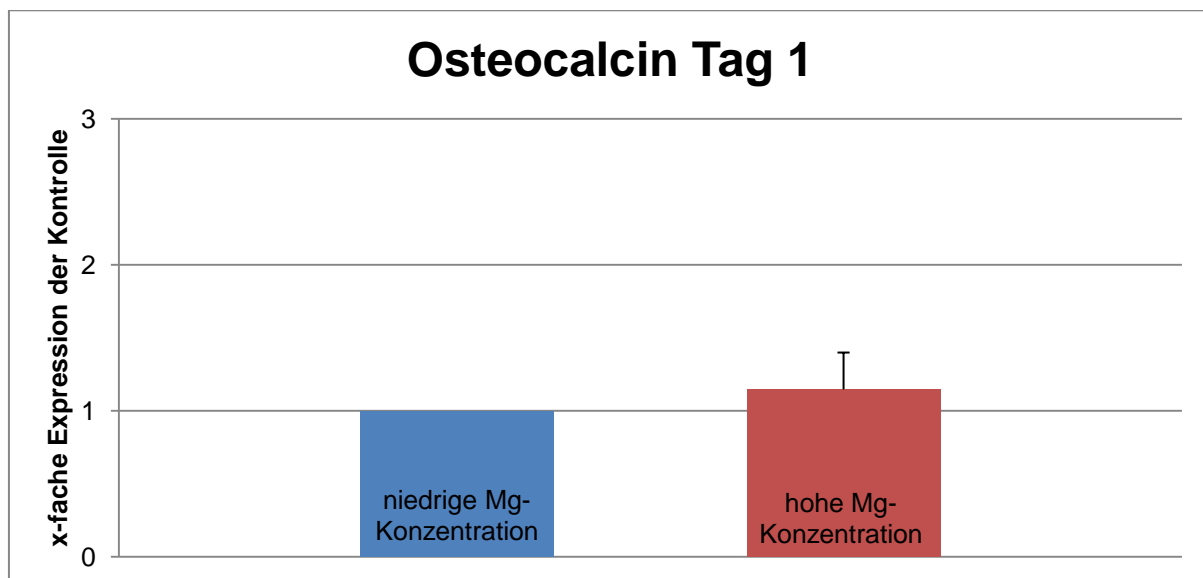


Abbildung 8: Osteocalcin Tag 1

Der Mittelwert der Osteocalcin-Expression für die Messungen mit den hohen Magnesiumkonzentrationen betrug an Tag 1 ein 1,15-faches der Kontrolle ($n = 5$). Der SEM betrug 0,25. Beim zweiseitigen gepaarten t-Test war $p > 0,05$.

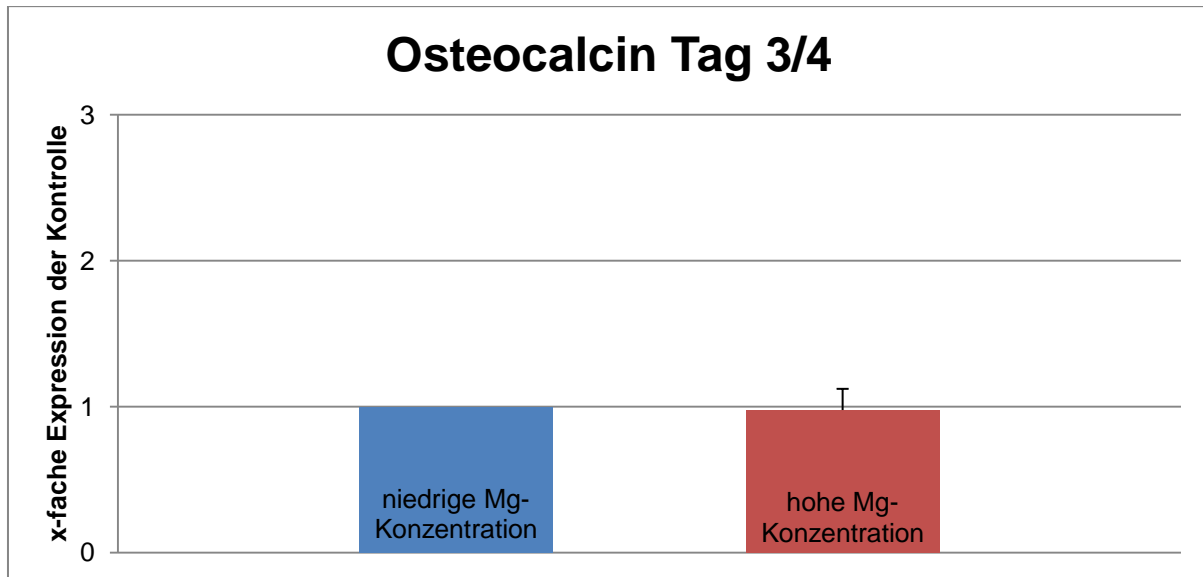


Abbildung 9: Osteocalcin Tag 3/4

Der Mittelwert der Osteocalcin-Expression für die Messungen mit den hohen Magnesiumkonzentrationen betrug an Tag 3/4 ein 0,98-faches der Kontrolle (n = 5). Der SEM betrug 0,15. Beim zweiseitigen gepaarten t-Test war $p > 0,05$.

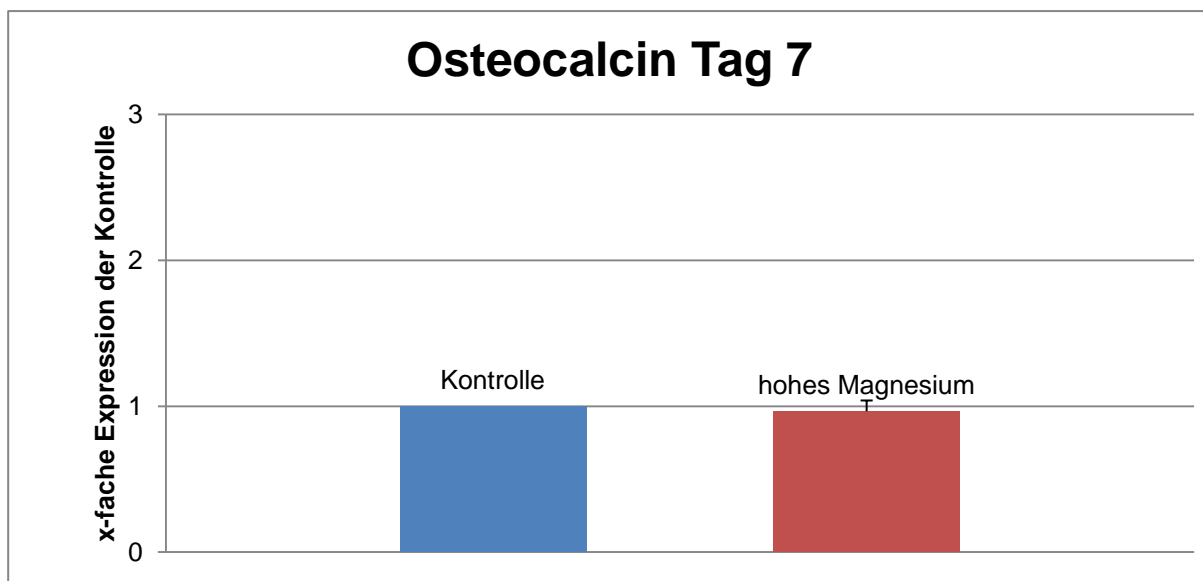


Abbildung 10: Osteocalcin Tag 7

Der Mittelwert der Osteocalcin-Expression für die Messungen mit den hohen Magnesiumkonzentrationen betrug an Tag 7 ein 0,97-faches der Kontrolle (n = 5). Der SEM betrug 0,07. Beim zweiseitigen gepaarten t-Test war $p > 0,05$.

5.2 Blockade von TRPM7 mittels 2-APB

In dieser Versuchsreihe wurde die Auswirkung der Blockade des TRPM7-Kanals mittels 2-APB bei hohen Magnesiumkonzentrationen in humanen, glatten Gefäßmuskelzellen nach sieben Tagen untersucht. Die Resultate sind als Mittelwerte sowie Standardfehler des Mittelwertes von je drei Versuchen dargestellt. Auffallend war dabei die vermehrte Expression aller drei untersuchten Marker der vaskulären Kalzifizierung nach der siebentägigen Inkubation der Zellen mit 2-APB gegenüber der Kontrolle ohne 2-APB. Bei den erhobenen Markern handelt es sich erneut um Osteopontin, Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase. Signifikant verschieden ($p < 0,05$) waren die Ergebnisse für Osteopontin und für die Alkalische Phosphatase. Auch Osteocalcin wurde in allen drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen nach Zugabe von 2-APB vermehrt exprimiert, war jedoch nicht signifikant verschieden ($p = 0,241$).

Marker	x-fache Expression der Kontrolle	SEM	p
Osteopontin	269,0	122,37	0,028
Osteocalcin	1,68	0,48	0,241
ALP	4,82	0,24	0,0009

Tabelle 1: Behandlung mit 2-APB nach sieben Tagen

Die Tabelle zeigt an, um wie viel Fach die Marker Osteopontin, Osteocalcin und ALP gegenüber der Kontrolle ohne 2-APB in den Zellen, die mit 2-APB behandelt wurden, exprimiert wurden ($n = 3$).

In den folgenden Abbildungen 11 und 12 sind die Zellen nach siebentägigem Wachstum in Medium mit 2-APB und Medium ohne 2-APB zu sehen. Durch die Zugabe von 2-APB kam es zu einem deutlich veränderten Adhäsionsverhalten der Zellen. Die mit 2-APB behandelten Zellen bildeten wabenartige, aufgelockerte Gruppierungen. Die Kontrollzellen, ohne 2-APB, formierten sich hingegen zu sehr engen Zellverbänden. Die Zellen, die mit 2-APB behandelt wurden, wiesen zudem eine signifikant verminderte Proliferation auf, als die nicht behandelten Zellen.

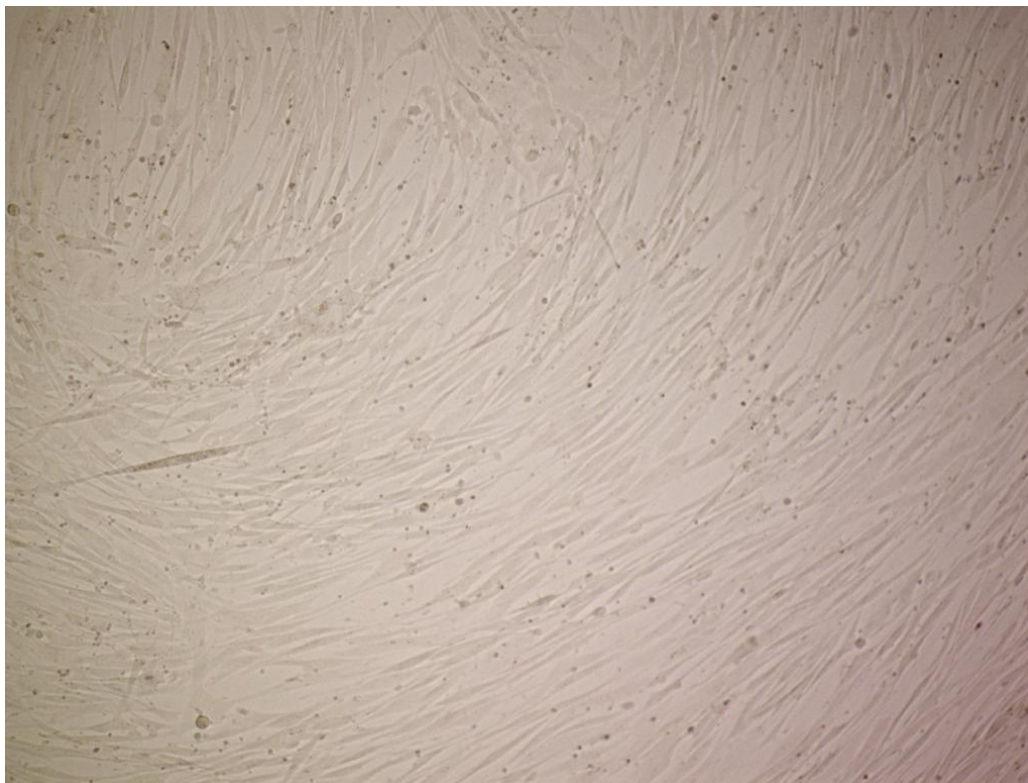


Abbildung 11: Zellen an Tag 7, Nährmedium ohne 2-APB

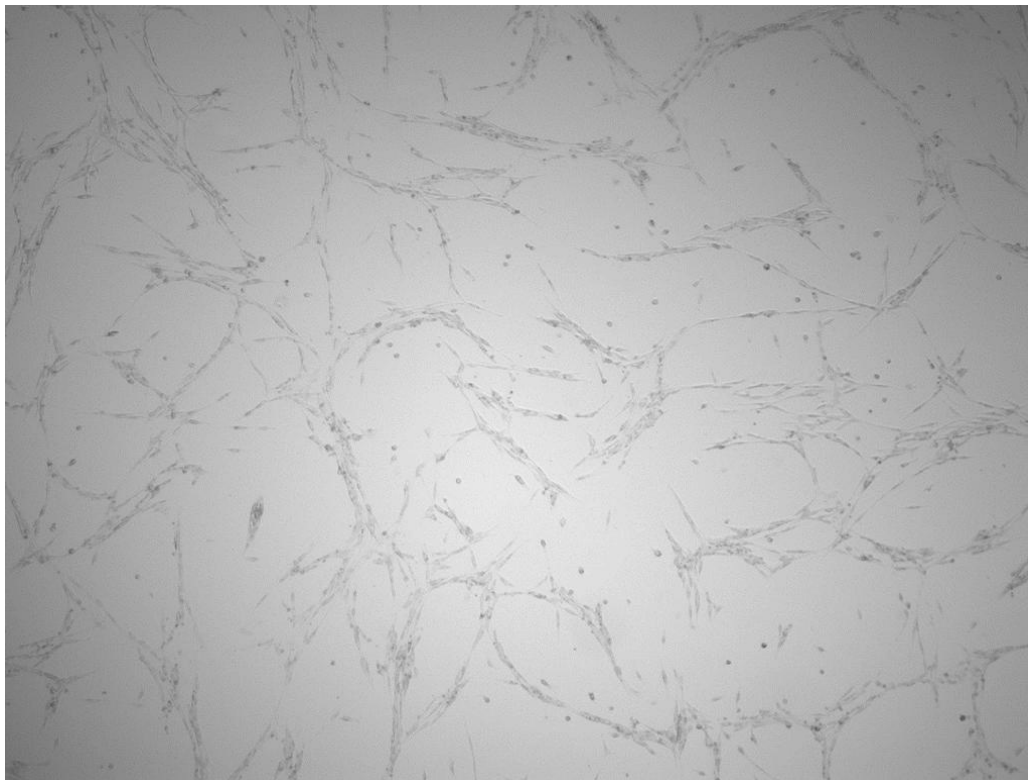


Abbildung 12: Zellen an Tag 7, Nährmedium mit 2-APB

5.3 Osteopontin im Serum und Laborparameter von Dialysepatienten

Pat. ID	Alter in Jahren	Blutabnahmedatum	nCa ²⁺	Ca	nMg ²⁺	Mg	Gesamteiweiß	Phosphat, anionisch	pH	Osteopontin im Serum
			mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L				
3	46	08. 10. 2012	1,13	2,07	0,63	0,96	6,4	6,4	7,426	69,64
5	23	01. 10. 2012	1,30	2,29	0,74	1,05	5,2	4,8	7,387	409,23
6	64	08. 10. 2012	1,30	2,22	0,64	0,86	7,1	4,9	7,421	141,69
11	84	02. 10. 2012	1,29	2,45	0,55	0,79	6,5	6,2	7,442	105,91
12	88	02. 10. 2012	0,85	1,62	0,56	0,75	6,3	5,2	7,391	135,94
14	66	02. 10. 2012	1,26	2,36	0,61	0,78	6,8	3,4	7,240	132,84
15	57	02. 10. 2012	1,24	2,32	0,64	0,91	5,7	8,9	7,470	360,41
16	58	02. 10. 2012	1,20	2,33	0,71	0,98	6,6	3,4	7,349	153,99
17	45	02. 10. 2012	1,28	2,48	0,60	0,88	7,0	4,8	7,357	172,76
18	59	02. 10. 2012	1,17	2,26	0,55	0,82	6,1	4,4	7,400	43,74
19	58	02. 10. 2012	1,18	2,27	0,58	0,84	5,8	5,7	7,427	29,74
20	78	02. 10. 2012	1,18	2,21	0,68	0,99	7,2	6,8	7,396	145,01
21	81	02. 10. 2012	1,20	2,24	0,52	0,73	6,2	5,2	7,368	142,64
22	80	02. 10. 2012	1,08	2,02	0,52	0,73	5,6	4,2	7,382	183,86
23	63	08. 10. 2012	1,26	2,24	0,63	0,89	6,2	4,4	7,445	57,20
Mittelwerte	63,3		1,19	2,23	0,61	0,86	6,3	5,25	7,393	153,06

Tabelle 2: Laborwerte und Osteopontin-ELISA Ergebnisse

Die Tabelle zeigt Laborwerte von Dialysepatienten sowie die Konzentration von Osteopontin im Serum (n = 15). Die Ergebnisse stammen aus den Ergebnissen der selben Blutentnahme.

Bei der Überprüfung der Korrelation der Laborparameter und der Osteopontin-Konzentration konnte eine positive lineare Korrelation von ionisiertem Magnesium und Osteopontin im Serum festgestellt werden, wie im folgenden Diagramm dargestellt wird. Mit anderen Laborparametern, wie Kalzium, Phosphat, dem Kalzium-/ Phosphat-Produkt, nicht-ionisiertem Magnesium, pH oder dem Patientenalter konnten keine relevanten Korrelationen festgestellt werden (in dieser Arbeit wurden nur die Ergebnisse der Korrelation zwischen Osteopontin und ionisiertem Magnesium dargestellt).

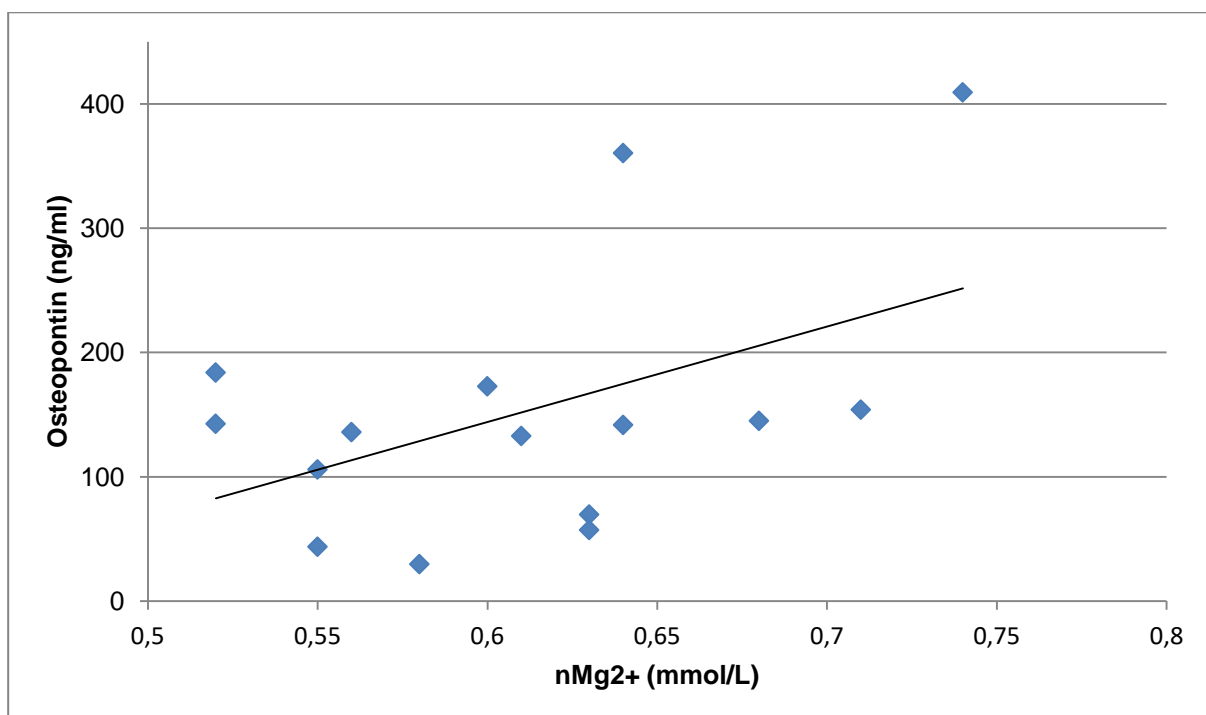


Abbildung 13: Korrelation von ionisiertem Magnesium und Osteopontin im Serum von Dialysepatienten

Das Diagramm zeigt ionisiertes, freies Magnesium in Korrelation mit dem im Serum gemessenen Osteopontin ($n = 15$). Der Mittelwert von nMg^{2+} beträgt $0,61$ mmol/L, der Mittelwert von Osteopontin $152,3$ ng/ml. Dabei war eine Korrelation mit dem Korrelations-Koeffizient r nach Pearson von $0,48$ mit einem $p = 0,0699$ messbar.

5.4 Photometrische Messung der ALP-Aktivität

Die folgenden Abbildungen stellen die Konzentrationen der, durch die Gefäßmuskelzellen sezernierten, Alkalischen Phosphatase nach Inkubation in Nährmedium mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen dar. Dabei wurden die Zellen einen Tag, drei bzw. vier oder sieben Tage in den verschiedenen Nährmedien inkubiert. In den Abbildungen 14, 15 und 16 ist die ALP-Aktivität in pg/ml pro $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein dargestellt. Die Resultate sind Mittelwerte \pm SEM von drei bis sieben unabhängigen Versuchen. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede messbar bei insgesamt großer Abweichungen des Standardfehlers des Mittelwertes.

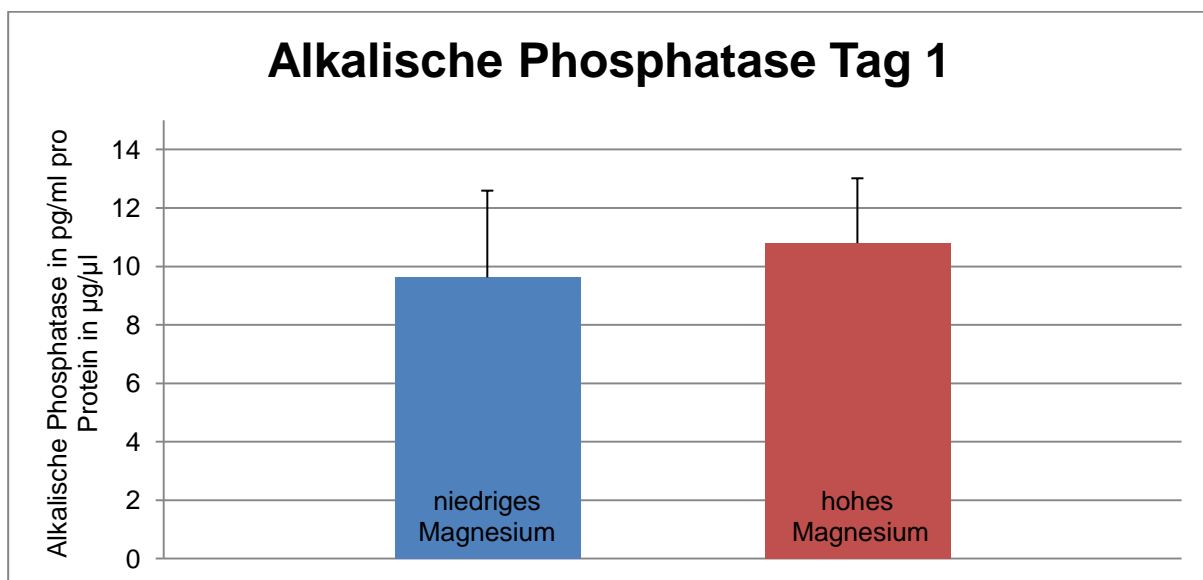


Abbildung 14: Alkalische Phosphatase Tag 1

Der Mittelwert der Alkalischen Phosphatase für die Messungen mit hohen Magnesiumkonzentrationen ($n = 3$) ist 10,80 pg/ml / $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, der SEM beträgt 2,22. Der Mittelwert für die Messungen mit niedrigen Magnesiumkonzentrationen ($n = 3$) an Tag 1 beträgt 9,62 pg/ml / $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Der SEM beläuft sich auf 2,99.

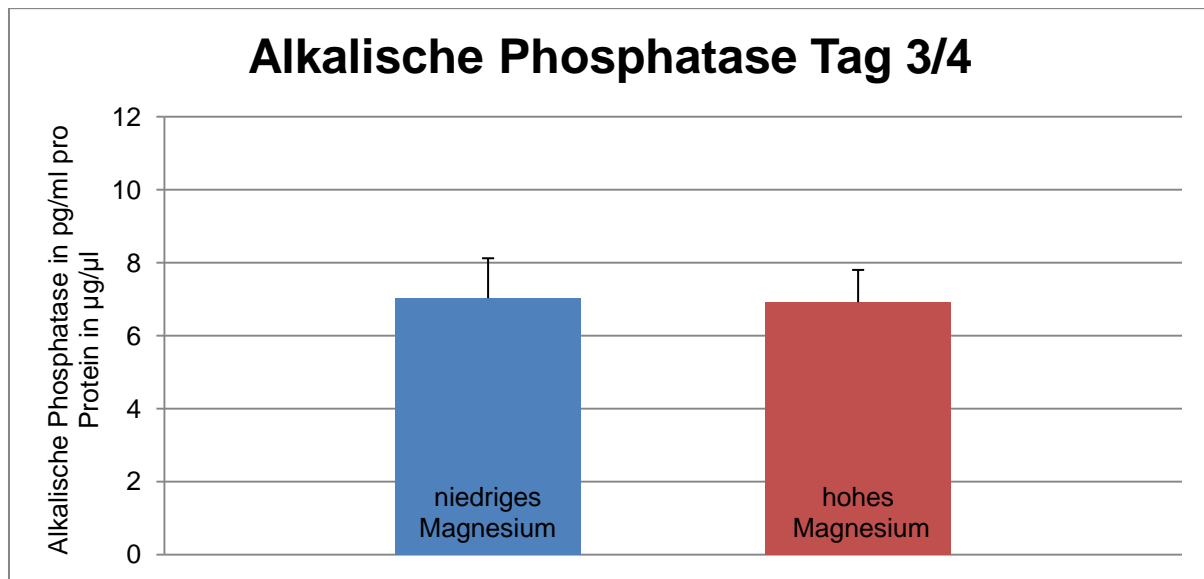


Abbildung 15: Alkalische Phosphatase Tag 3/4

Der Mittelwert der Alkalischen Phosphatase für die Messungen mit hohen Magnesiumkonzentrationen ($n = 7$) ist 6,91 pg/ml / µg/µl, der SEM beträgt 0,89. Der Mittelwert für die Messungen mit niedrigen Magnesiumkonzentrationen ($n = 6$) an Tag 3/4 beträgt 7,03 pg/ml / µg/µl. Der SEM beläuft sich auf 1,09.

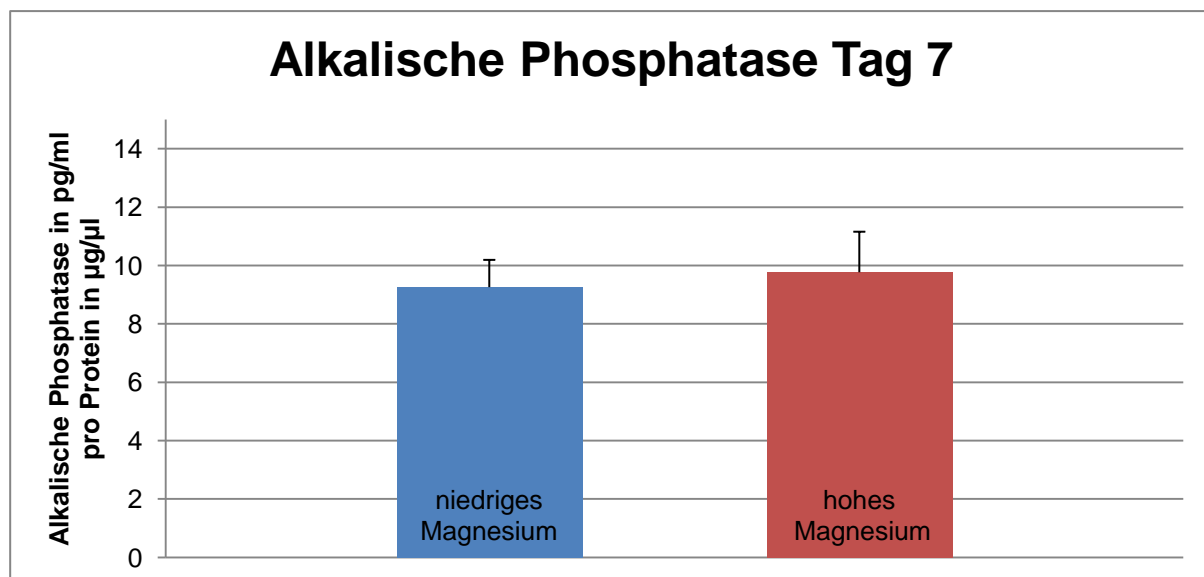


Abbildung 16: Alkalische Phosphatase Tag 7

Der Mittelwert der Alkalischen Phosphatase für die Messungen mit hohen Magnesiumkonzentrationen ($n = 3$) ist 9,77pg/ml / µg/µl, der SEM beträgt 0,71. Der Mittelwert für die Messungen mit niedrigen Magnesiumkonzentrationen ($n = 3$) an Tag 7 beträgt 9,26 pg/ml / µg/µl. Der SEM beläuft sich auf 0,40.

6. Diskussion

Die stark erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei niereninsuffizienten Patienten geht, unter anderem ursächlich, mit vermehrter vaskulärer Kalzifizierung einher (Briet and Burns 2012). Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren und Jahrzehnten ist noch nicht vollständig verstanden, wie es zu diesen Gefäßveränderungen kommt und wie therapeutisch eingegriffen werden kann. Ein denkbarer Ansatzpunkt könnte dabei das Anstreben eines hoch normalen Serum-Magnesiumspiegels bei niereninsuffizienten Patienten darstellen. Das wäre vor allem im Rahmen einer Dialyse eine elegante und kostengünstige Methode. Magnesium soll einen protektiven Effekt bezüglich der vaskulären Kalzifizierung besitzen (De Francisco and Rodriguez 2013). Durch welche Mechanismen Magnesium Kalzifizierungsvorgänge aufzuhalten bzw. zu verhindern vermag, ist größtenteils noch unklar. In Arbeiten mit Gefäßmuskelzellen von Ratten und Rindern konnte jedoch eine protektive Wirkung von Magnesium gezeigt werden (Montezano et al. 2010, Salem et al. 2012, Kircelli et al. 2012, Xu et al. 2015). Einige Versuche an humanen vaskulären Muskelzellen konnten diese Beobachtungen ebenfalls bestätigen (Louvet et al. 2013, Montes de Oca et al. 2014). Sogar in vivo konnten Ishimura et al. schon 2007 eine verringerte Mortalität bei Hämodialysepatienten bei höheren Magnesiumkonzentrationen im Serum feststellen (Ishimura et al. 2007). Dieses Erkenntnis wurde auch in anderen Publikationen mehrfach bestätigt (Sakaguchi et al. 2014, Silva et al. 2014, Adamopoulos et al. 2009).

Im Mittelpunkt der vaskulären Kalzifizierung bei niereninsuffizienten Patienten stehen die glatten Gefäßmuskelzellen. In diesem Prozess verändern sie sich zu osteoblastenähnlichen Zellen. Dabei setzen sie Mediatoren des Knochenstoffwechsels frei, die die Gefäßumbauprozesse maßgeblich beeinflussen (Steitz et al. 2001). So kann beispielsweise, anders als in gesunden Gefäßen, in veränderten, kalzifizierten Gefäßen Osteopontin - als ein Vertreter der Marker des Knochenstoffwechsels - nachgewiesen werden (Mizobuchi et al. 2009). Dabei liefern die in der bisherigen Literatur veröffentlichten Studien zum Teil widersprüchliche bzw. unklare Ergebnisse bezüglich der Vermittler der osteochondrogenen Differenzierung. Diese Arbeit soll daher zum besseren Verständnis der gefäßprotektiven

Wirkungsweise von Magnesium hinsichtlich der vaskulären Kalzifizierung und deren Vermittlern beitragen.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die durch unterschiedliche Magnesiumkonzentrationen hervorgerufenen Veränderungen in humanen, glatten Gefäßmuskelzellen in den Fokus gestellt. Dabei wurden insbesondere einige Marker der vaskulären Kalzifizierung bzw. des Knochenstoffwechsels in vitro und zum Teil in vivo berücksichtigt. Unserem Stand nach wurden humane glatte Gefäßmuskelzellen bisher nicht bezüglich der Expression der Marker Osteopontin, Osteocalcin und der Alkalischen Phosphatase auf genetischer Ebene in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration untersucht.

Im Einklang mit bisherigen Forschungsergebnissen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Magnesium für das Zellüberleben äußerst bedeutend ist (Kircelli et al. 2012). So war nach siebentägiger Inkubation bei höheren Magnesiumkonzentrationen im Kalzifizierungsmedium eine tendenziell erhöhte Expression des antikalzifizierend wirkenden Osteopontins zu sehen. Besonders anschaulich zu beobachten, war dabei zudem die veränderte Adhäsionsfähigkeit und Zellteilungsrate durch die Blockade des für den Magnesiumtransport essenziellen Kanals TRPM7 und die dabei gesteigerte Expression aller drei untersuchten Marker der osteochondrogenen Zelllinien. Zudem wurde das Serum von Dialysepatienten hinsichtlich der Osteopontinkonzentration untersucht. Dabei konnte eine positive lineare Korrelation zwischen Osteopontin und der ionisierten Magnesiumkonzentration gesehen werden.

Vergleich der Expression von Markern der vaskulären Kalzifizierung bei niedrigen oder hohen Magnesiumkonzentrationen

Wie bereits erläutert ist die antikalzifizierende Wirkungsweise von Magnesium multifaktoriell bedingt und es bedarf zum besseren Verständnis noch weitere Forschungsarbeiten. In der bisherigen Literatur konnte eine positive Korrelation von leicht erhöhten Magnesiumkonzentrationen und der Expression von Inhibitoren der vaskulären Kalzifizierung gezeigt werden. In diesem Rahmen soll es zudem zur verminderten Expression der fördernden Mediatoren kommen (Montezano et al. 2010).

Untersucht wurden in der vorliegenden Arbeit die eher kalzifizierungshemmenden Marker Osteopontin und BMP7 sowie die eher kalzifizierungsfördernden Marker Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase. Die Expression dieser Marker wurde zum Vergleich sowohl bei hohen als auch niedrigen Magnesiumkonzentrationen in Kalzifizierungsmedium mit β -Glycerophosphat nach einem, drei bzw. vier und sieben Tagen mittels quantitativer PCR untersucht.

Auch Montes de Oca et al. führten ähnliche Experimente durch. Sie untersuchten ebenfalls humane Gefäßmuskelzellen hinsichtlich des Einflusses von leicht erhöhten Magnesiumkonzentrationen auf die Expression von Markern der Gefäßverkalkung bzw. des Knochenstoffwechsels, jedoch mit dem Schwerpunkt auf andere Marker. Dabei zeigte sich bei leicht erhöhten Magnesiumkonzentrationen sowohl eine erhöhte Expression der Inhibitoren der vaskulären Kalzifizierung Matrix Gla Protein und Osteoprotegerin als auch eine verminderte Expression von Cbfa-1 und Osterix, beide Begünstiger der Kalzifizierung (Montes de Oca et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit waren besonders die Ergebnisse für Osteopontin auffällig. Es benötigte in dieser Versuchsreihe für alle hier untersuchten Marker der vaskulären Kalzifizierung einige Tage bis Unterschiede des Einflusses der verschiedenen Magnesiumkonzentrationen deutlich wurden. Auch in anderen Arbeiten konnten erst nach 7 bis 14 Tagen größere Veränderungen gesehen werden (Montezano et al. 2010, Louvet et al. 2013). Nach einem Tag sowie nach drei bzw. vier Tagen waren keine signifikanten Unterschiede in der Osteopontin-Expression vorhanden. Osteopontin war aber nach siebentägiger Inkubation bei der Gruppe der höheren

Magnesiumkonzentration mehr als zweifach im Vergleich zur Gruppe mit niedrigeren Magnesiumkonzentrationen exprimiert. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant verschieden, was an der geringen Fallzahl ($n = 5$) liegen könnte ($p = 0,075$). Dabei zeigten 4 der 5 Versuche eine stärkere Expression bei höherer Magnesiumkonzentration. Im 5. Versuch zeigte sich kein Unterschied in der Expression der zwei Vergleichsgruppen.

Das Resultat deckt sich insgesamt mit den Immunoblot-Ergebnissen von Montezano et al. in vaskulären glatten Muskelzellen von Ratten hinsichtlich des höheren Osteopontin-Nachweises bei höheren Magnesiumkonzentrationen (Montezano et al. 2010). Auch Xu et al. konnten diese Ergebnisse in Versuchen mit vaskulären glatten Muskelzellen von Ratten für Osteopontin mittels RT-qPCR zeigen (Xu et al. 2015). An humanen Gefäßmuskelzellen konnten Louvet et al. diese Ergebnisse für Osteopontin mittels ELISA bestätigen (Louvet et al. 2013). Die hier gemachten Ergebnisse und die bisherige Literatur festigen die Annahme, dass höhere Magnesiumkonzentrationen zu einer stärkeren Expressierung von Inhibitoren der vaskulären Kalzifizierung, wie Osteopontin, führen und sich unter anderem dadurch die gefäßschützende Wirkungsweise von Magnesium erklären lässt. Diese Tendenz zur vermehrten Osteopontin-Expression bei höheren Magnesiumkonzentrationen konnte hier nun erstmalig auf genetischer Ebene an humanen Gefäßmuskelzellen gesehen werden.

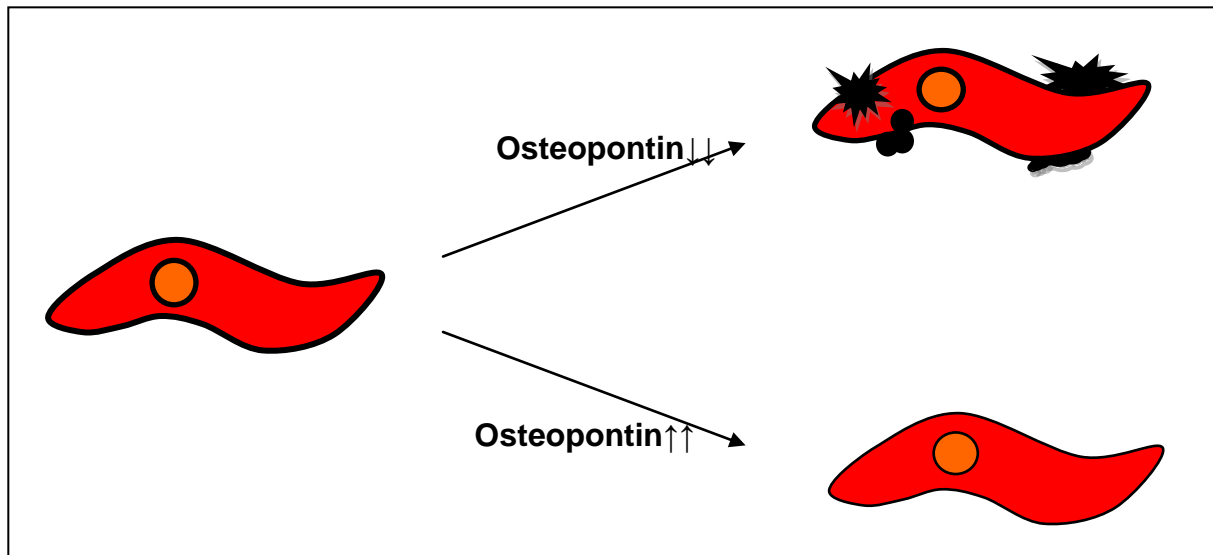


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Osteopontin auf die Kalzifizierung von Gefäßmuskelzellen.

Eine geringere Expression von Osteopontin führt zu einer Verstärkung der osteochondrogenen Transformation. Bei höheren Konzentrationen von Osteopontin kommt es hingegen zu einer verminderten osteochondrogenen Transformation der Gefäßmuskelzellen.

Die Alkalische Phosphatase war nach 7-tägiger Inkubation bei höheren Magnesiumkonzentrationen ebenfalls um 1,5-fach stärker exprimiert als bei niedrigen. Diese leicht vermehrte Expression war jedoch nicht signifikant verschieden ($p = 0.061$). Auch bei der Alkalischen Phosphatase waren nach einem Tag sowie nach drei bzw. vier Tagen wie bereits bei Osteopontin keine signifikanten Unterschiede bei beiden Messbedingungen in der Expression der Alkalischen Phosphatase nachweisbar.

Die Alkalische Phosphatase gilt im Gegensatz zu Osteopontin als ein Förderer der vaskulären Kalzifizierung. Ishimura et al. konnten beispielsweise zeigen, dass erhöhte Serumkonzentrationen der Alkalischen Phosphatase und vermehrte Gefäßverkalkungen bei Dialysepatienten eine hohe Korrelation aufweisen (Ishimura et al. 2014). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wiesen Kircelli et al. nach 14 Tagen Inkubation bei höheren Magnesiumkonzentrationen eine deutlich verminderte Aktivität der Alkalischen Phosphatase nach. Im Gegensatz zu dieser Arbeit verwendeten Kircelli et al. Rinder-Gefäßmuskelzellen (Kircelli et al. 2012). Ähnliche Ergebnisse

lieferten auch die Messungen der Alkalischen Phosphatase mittels ALP-Aktivitätsmessung an Muskelzellen von Ratten durch Xu et al. (Xu et al. 2015). Interessant sind dabei die Ergebnisse von Rajamannan et al., die in kalzifizierten humanen Aortenklappen auf mRNA-Ebene keine erhöhte Expression der Alkalischen Phosphatase nachweisen konnten, jedoch gleichzeitig einen starken Anstieg der Alkalischen Phosphatase im direkten Proteinnachweisverfahren mittels Immunogold-Verfahren fanden (Rajamannan et al. 2003). Es wäre also spannend die hier beschriebenen Versuche in Kombination mit einem direkten Proteinnachweis der Alkalischen Phosphatase durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde, wie nachfolgend beschrieben, eine indirekte Messung der Alkalischen Phosphatase durch die Messung der ALP-Aktivität durchgeführt. Diese konnte jedoch keine deutlichen Unterschiede in den beiden Behandlungsgruppen zeigen.

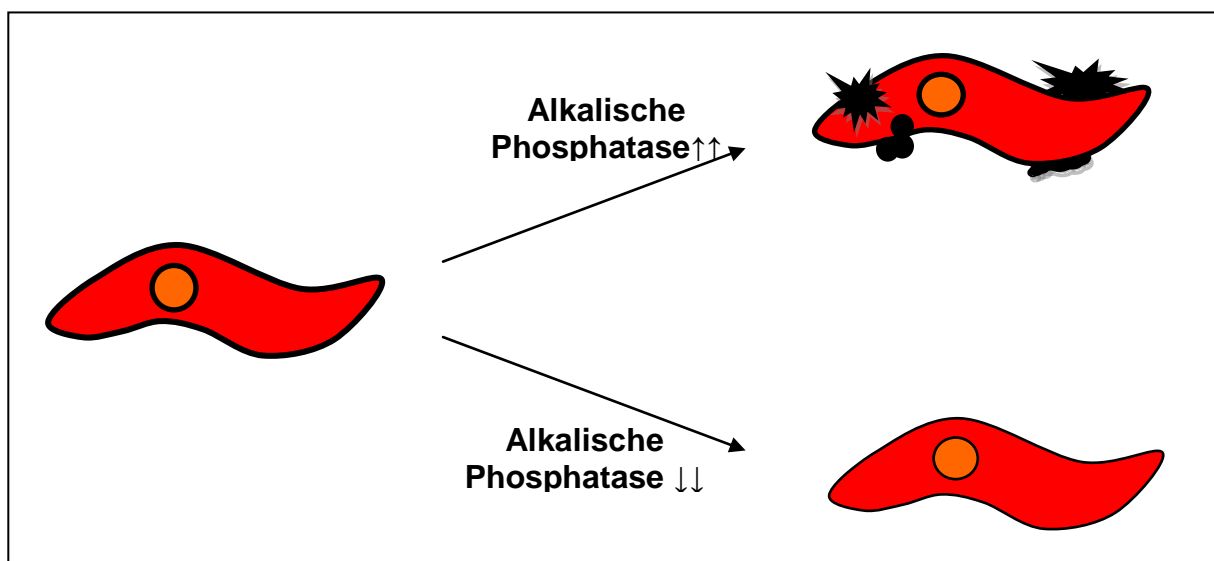


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Alkalischen Phosphatase auf die Kalzifizierung von Gefäßmuskelzellen.

Bei höheren Konzentrationen der Alkalischen Phosphatase kommt es zu einer stärkeren osteochondrogenen Transformation der Gefäßmuskelzellen. Demgegenüber führt eine geringere Expression der Alkalischen Phosphatase zu einer Verringerung der osteochondrogenen Transformation.

Für Osteocalcin konnte weder nach einem Tag, nach drei bzw. vier oder nach sieben Tagen ein signifikanter Unterschied in der Expression bei den unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen gesehen werden. Zu erwarten wäre möglicherweise eine verminderte Expression nach Inkubation mit höheren Magnesiumkonzentrationen gewesen, wie beispielsweise Louvet et al. an humanen Gefäßmuskelzellen mittels ELISA feststellen konnte (Louvet et al. 2013). Die Ergebnisse von Montezano et al. zeigen dabei die sensible Beeinflussung von Osteocalcin. So kam es bei Kalzifizierungsmedium mit hohem Kalzium und Phosphat zu einer signifikant erniedrigten Expression durch Magnesium, bei normalem Medium durch Magnesium jedoch sogar zu einer vermehrten Expression (Montezano et al. 2010).

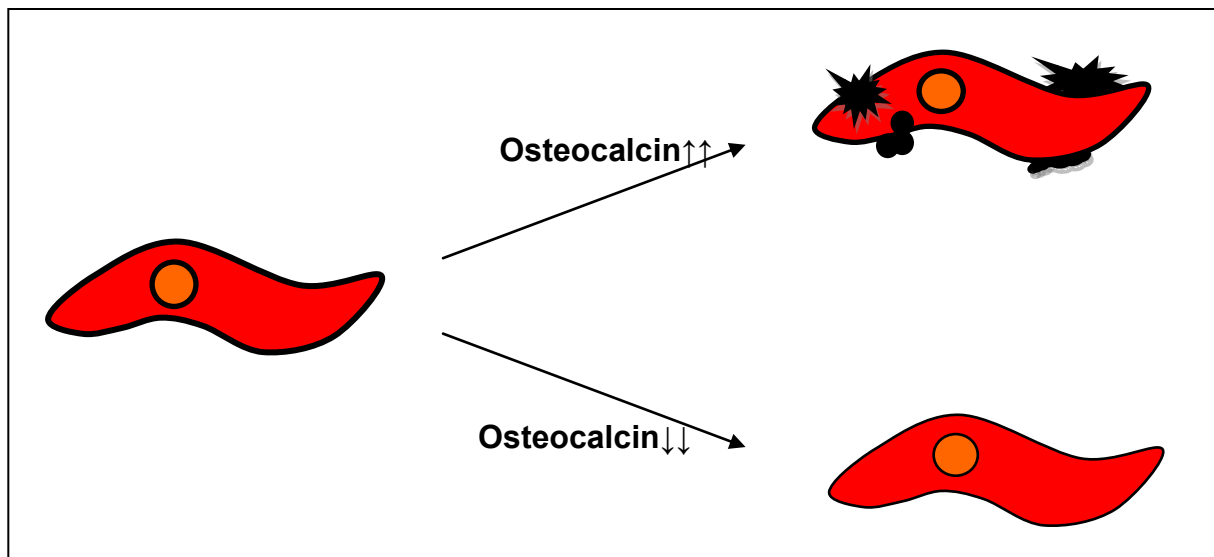


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Osteocalcin auf die Kalzifizierung von Gefäßmuskelzellen.

Bei höheren Konzentrationen von Osteocalcin kommt es zu einer stärkeren osteochondrogenen Transformation der Gefäßmuskelzellen. Demgegenüber führt eine geringere Expression von Osteocalcin zu einer Verringerung der osteochondrogenen Transformation.

BMP7, ebenso ein Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung, war in diesen Versuchen nicht nachweisbar. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass dieser Marker hauptsächlich in den Nieren exprimiert wird (Schiffrin et al. 2007). Louvet et al. konnten jedoch sogar mittels ELISA eine stärkere Expression von BMP7 nach 14-tägiger Inkubation mit höheren Magnesiumkonzentrationen bei humanen Gefäßmuskelzellen feststellen (Louvet et al. 2013). Auch Montezano et al. konnten in Kalzifizierungsmedium mit hohem Kalzium- und Phosphat-Spiegel eine erhöhte, Expression von BMP7 durch höhere Magnesiumkonzentrationen nach 10 Tagen in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten feststellen (Montezano et al. 2010). Möglicherweise wäre in dieser Versuchsreihe ebenfalls bei einer längeren Behandlungsdauer eine messbare BMP7-Expression nachweisbar gewesen.

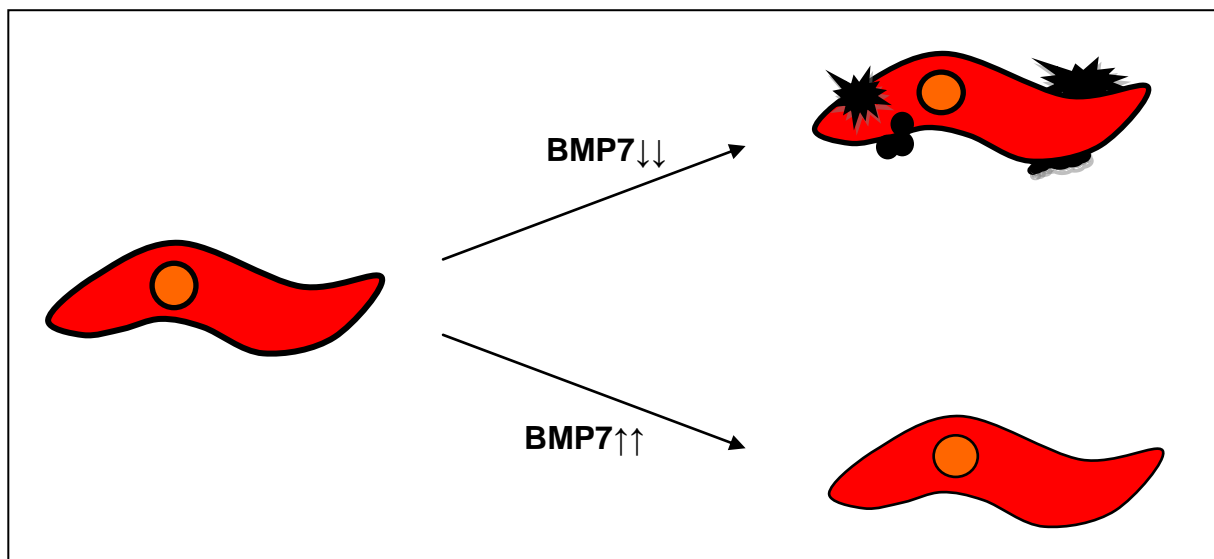


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von BMP7 auf die Kalzifizierung von Gefäßmuskelzellen.

Bei höheren Konzentrationen von BMP7 kommt es zu einer verminderten osteochondrogenen Transformation der Gefäßmuskelzellen. Demgegenüber führt eine geringere Expression von BMP7 zu einer Verstärkung der osteochondrogenen Transformation.

Behandlung mit 2-APB

Im Folgenden wurde die Auswirkung der Blockade des Kanals TRPM7 mittels 2-APB bei hohen Magnesiumkonzentrationen in humanen, glatten Gefäßmuskelzellen nach 7 Tagen untersucht. 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) ist dabei ein geläufiger, potenter Blocker des TRPM7-Kanals (Li et al. 2006).

Der Kanal ist bekannt als ein bedeutender Magnesiumtransporter der glatten Gefäßmuskelzelle (Hamaguchi et al. 2003). Dementsprechend verringert sich durch ein geringeres Vorhandensein von TRPM7-Kanälen das intrazelluläre Magnesium in Gefäßmuskelzellen (He et al. 2005). Dies wird in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt. Baldoli und Maier konnten zeigen, dass niedrige Magnesiumkonzentrationen und TRPM7-Silencing ähnliche Effekte auf die Gefäßmuskelzellen haben (Baldoli and Maier 2012). Bisher ist die Bedeutung von TRPM7, neben seiner Transportfunktion, in vaskulären Gefäßmuskelzellen noch nicht vollständig geklärt. Diese Arbeit soll das Verständnis verbessern, inwiefern die Blockade des TRPM7-Kanals - und dadurch eine intrazellulär verminderte Magnesiumkonzentration - die Expression der Marker der osteochondrogenen Differenzierung in humanen vaskulären Gefäßmuskelzellen verändert und wie es das Wachstumsverhalten der Zellen beeinflusst. Uns ist nicht bekannt, dass die drei Marker Osteopontin, Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase bisher mittels PCR nach TRPM7-Blockade mit 2-APB an humanen Gefäßmuskelzellen untersucht wurden.

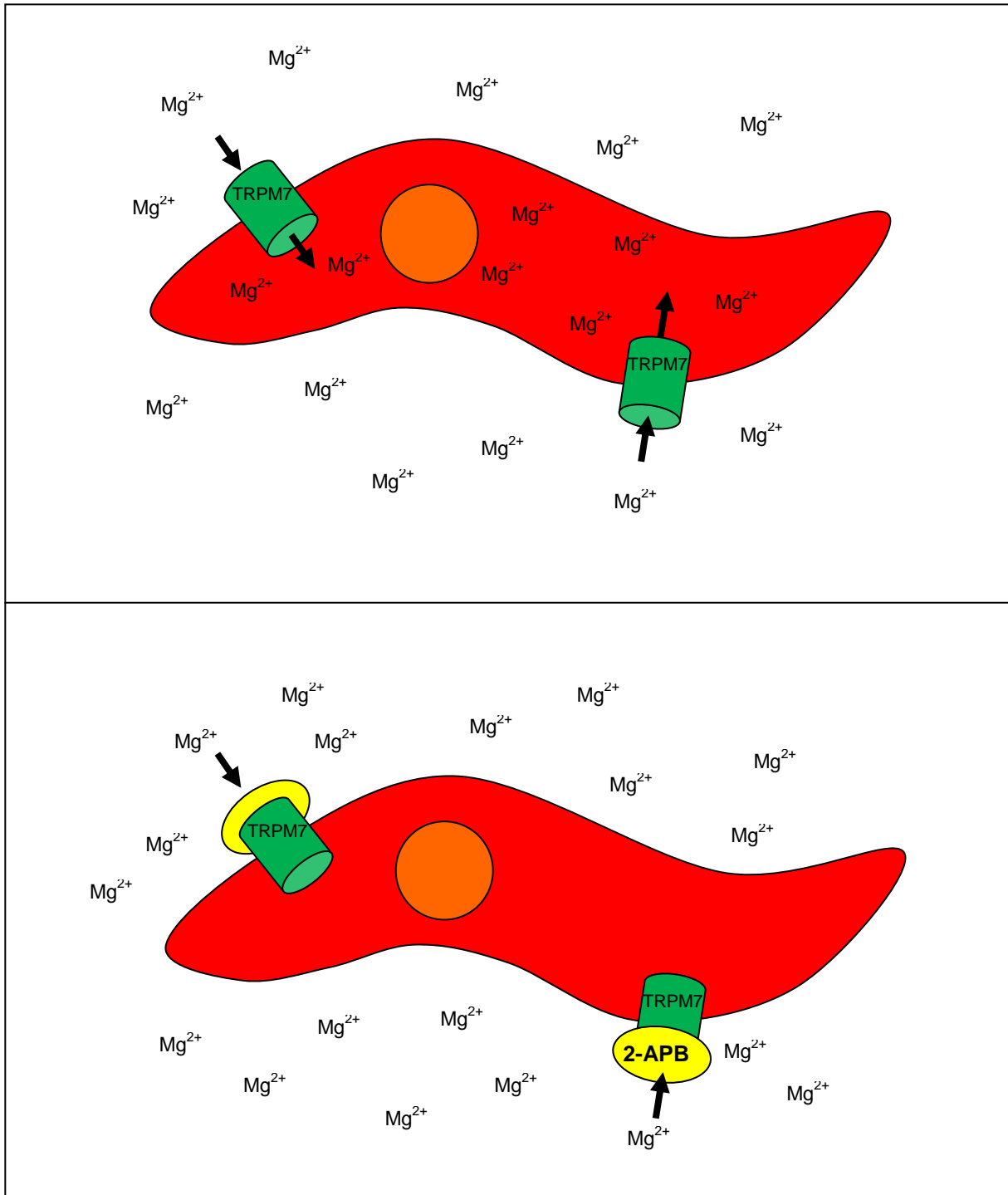


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Blockade von TRPM7 durch 2-APB und die dadurch verminderte intrazelluläre Magnesiumkonzentration.

Sowohl die Zelladhäsion als auch die Zellproliferation waren nach 7-tägiger Inkubation mit 2-APB versetztem Medium auffällig stark verändert. Die Kontrollzellkulturen, ohne 2-APB, formierten sich zu sehr engen Zellverbänden. Dahingegen bildeten die mit 2-APB behandelten Zellen eher wabenartige, aufgelockerte Gruppierungen. Zusätzlich war die Proliferation der mit 2-APB behandelten Zellen deutlich vermindert. Diese Beobachtungen sind gut in den Abbildungen 11 und 12 zu erkennen und schematisch in Abbildung 21 dargestellt.

Dieses veränderte Wachstumsverhalten bei glatten Gefäßmuskelzellen durch Zugabe von 2-APB wurde in der bisherigen Literatur, soweit uns bekannt ist, bisher nicht derart beschrieben, ist allerdings mit dem derzeitigen Forschungsstand gut nachvollziehbar. Nur Louvet et al. konnten unter Kalzifizierungsmedium mit hohen Phosphatkonzentrationen eine signifikante Verbesserung des Zellüberlebens von ebenfalls humanen Gefäßmuskelzellen durch höhere Magnesiumkonzentrationen feststellen. Ohne Kalzifizierungsmedium, wie in unserem Versuchsaufbau, war jedoch nur eine leichte, nicht signifikante Verbesserung des Zellüberlebens durch höhere Magnesiumkonzentrationen zu registrieren. Nach 14-tägiger Behandlung mit 2-APB kam es ebenfalls zu einem Verlust der Zellüberlebensfähigkeit, der allerdings geringfügig und nicht signifikant verschieden war (Louvet et al. 2013).

TRPM7 spielt bekanntermaßen – neben der zentralen Bedeutung für die Magnesiumhomöostase – eine wesentliche Rolle in glatten Gefäßmuskelzellen hinsichtlich der Zellproliferation und des Wachstums (Inoue et al. 2006). TRPM7 soll sogar selbst eine Kinase mit Einfluss auf Apoptose, Wachstum und Antiinflammation besitzen (Clark et al. 2006). Ryazanova et al. haben die These aufgestellt, dass keine homozygote TRPM7-defiziente Maus geschaffen werden kann. In ihren Versuchen kam es dabei stets es zu einem frühen embryonalen Versterben (Ryazanova et al. 2010).

Auch Magnesium soll einen unabhängigen, bedeutenden Einfluss auf das Wachstums-, Differenzierungs- und Proliferationsverhalten von Zellen haben. Zudem wirke es antientzündlich und als Antioxidans (Romani 2011, Yogi et al. 2011). So sollen niedrige Magnesiumkonzentrationen einen erhöhten oxidativen Stress für Zellen hervorrufen und dadurch zu vermehrter Apoptose, Entzündungsneigung und

Zellzyklus-Stillstand führen (Wolf and Cittadini 1999, Mazur et al. 2007). Die durch 2-APB entstehenden verminderten intrazellulären Magnesiumkonzentrationen können also für die Zelle eine erhöhte Stresssituation darstellen. Touyz und Yao stellten ebenso fest, dass eine erhöhte Magnesiumkonzentration eine stärkere Proliferation von Gefäßmuskelzellen von Ratten bewirkt (Touyz and Yao 2003). In diesem Sinne konnten Kircelli et al. zeigen, dass die durch Kalzifizierungsmedium bedingte verstärkte Apoptose von bovinen Gefäßmuskelzellen durch höhere Magnesiumkonzentrationen normalisiert werden kann (Kircelli et al. 2012). Gleichzeitig hat Magnesium auch eine regulierende Funktion und kann die Intima-Media-Dicke bei Hämodialysepatienten sogar verringern (Turgut et al. 2008).

Die hier beobachtete stark verminderte Proliferation der Zellen und die veränderte Formation können also gut auf die Beeinflussung der Zellen durch Blockade von TRPM7 schließen lassen. Sowohl die hierdurch herbeigeführten niedrigeren intrazellulären Magnesiumkonzentrationen als auch die Inhibition des TRPM7-Kanals selbst können zu einer verminderten Proliferation führen. Die hier gezeigten funktionell-morphologischen Veränderungen könnten unter anderem eine Ursache einer veränderten Gefäßstruktur in kalzifizierten Gefäßen bei verminderter Magnesiumserumkonzentration darstellen.

Zusätzlich wurden die Zellen auf genetischer Ebene mittels PCR untersucht. Bei der Kontrolle als auch bei den mit 2-APB behandelten Zellen waren jeweils erhöhte Magnesiumkonzentrationen im Medium. Auffallend war dabei die vermehrte Expression aller drei untersuchten Marker der vaskulären Kalzifizierung nach der siebentägigen Inkubation der Zellen mit dem Blocker des TRPM7-Kanals gegenüber der Kontrolle. Bei den erhobenen Markern handelt es sich erneut um Osteopontin, Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase. Signifikant verschieden waren die Ergebnisse für Osteopontin und für die Alkalische Phosphatase. Auch Osteocalcin wurde in allen drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen nach Blockade von TRPM7 durch 2-APB vermehrt exprimiert. Ein signifikantes Ergebnis hätte sich eventuell durch eine höhere Fallzahl ergeben.

Diese Ergebnisse zeigen einen offensichtlichen Zusammenhang zwischen der intrazellulären Magnesiumkonzentration und der Transformation der vaskulären

Gefäßmuskelzellen und stehen im Einklang mit einigen bisherigen Forschungsergebnissen. In der Literatur wurden jedoch unterschiedliche Ergebnisse bezüglich dieser Marker, die die osteochondrogene Transformation der Gefäßmuskelzellen bestätigen und diese stark beeinflussen, beschrieben. Dies gilt insbesondere für Osteopontin. Die Ergebnisse für Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase im Zusammenspiel mit Magnesium und der Blockade des für die Magnesiumhomöostase wichtigen Kanals sind gut mit der Literatur vereinbar. Die Wirkungsweise von Osteopontin sowie die Umstände, die zur Freisetzung des Proteins führen, erscheinen jedoch unklarer und komplexer.

Die vermehrte Expression der drei hier analysierten Marker in Gefäßmuskelzellen kann insgesamt als Zeichen der osteochondrogenen Differenzierung gewertet werden (Moe et al. 2002, Idelevich et al. 2011). Steitz et al. konnten schon 2001 zeigen, dass im Rahmen der osteochondrogenen Differenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen von Rindern eine vermehrte Freisetzung von Osteopontin, Osteocalcin und der Alkalischen Phosphatase erfolgt (Steitz et al. 2001). Auch Sage et al. haben in Kalzifizierungsmedium mit hohem Phosphat-Anteil ein erhöhtes Osteopontin bei Gefäßmuskelzellen von Mäusen mittels Immunoblot feststellen können (Sage et al. 2011). So kann auch das hier beschriebene Ergebnis in Bezug gesetzt werden. Eine höhere intrazelluläre Konzentration von Magnesium vermag offenbar den Differenzierungsprozess der glatten Gefäßmuskelzellen hin zu osteoklasten-/osteoblastenähnlicheren Zellen aufzuhalten bzw. anzuhalten. Entsprechend verursacht eine verminderte intrazelluläre Magnesiumkonzentration - wie hier durch die Blockade des TRPM7-Magnesium-Kanals herbeigeführt - die verstärkte Bildung von osteoblastenähnlichen Zellen. Dies führt wiederum zur vermehrten Expression von Markern des Knochenstoffwechsels. Gleichzeitig wäre in diesem Differenzierungsprozess der Zellen hin zu osteoblastenähnlicheren Zellen eine verminderte Freisetzung der Marker der Gefäßmuskelzelllinie zu erwarten gewesen (in dieser Arbeit nicht untersucht) (Steitz et al. 2001). Im Einklang mit unseren Ergebnissen wurden bei Salem et al. in Rinderzellen sowohl Osteopontin, als Inhibitor der Gefäßverkalkung, als auch Osteocalcin, als Begünstiger der Gefäßverkalkung, in der Anwesenheit von Magnesium vermindert exprimiert (Salem et al. 2012). Magnesium soll jedoch, wie bereits beschrieben, das Gleichgewicht zwischen Inhibitoren und Förderern der vaskulären Kalzifizierung zugunsten der verminderten

Kalzifizierung bewegen (Kircelli et al. 2012). Folglich soll es also in höheren Konzentrationen die Inhibitoren der Kalzifizierung, zu denen das hier gezeigte Osteopontin gehört, eher vermehrt exprimieren und die Förderer der Kalzifizierung, wie Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase, vermindert exprimieren. Dementsprechend kam es in den zuvor beschriebenen Versuchen im Vergleich der Behandlungen mit hohen bzw. niedrigeren Magnesiumkonzentrationen in der Gruppe der höheren Magnesiumkonzentration zur vermehrten Osteopontin-Expression. Wie schon erwähnt, konnten ähnliche Ergebnisse durch Louvet, Montezano und Xu et al. gemacht werden (Louvet et al. 2013, Montezano et al. 2010, Xu et al. 2015). In der Arbeit von Montezano et al. mit Gefäßmuskelzellen von Ratten kam es jedoch im Gegensatz zu den hier aufgeführten Ergebnissen nach Blockade von TRPM7, ebenso mit 2-APB, zu einer geringeren Osteopontin-Expression. Jedoch konnte wie in unseren Versuchen eine höhere Expression des kalzifizierungsfördernden Osteocalcins ermittelt werden (Montezano et al. 2010). Auch Xu et al. konnten bei Ratten-Gefäßmuskelzellen eine geringere Expression von Osteopontin mittels RT-qPCR und eine höhere Aktivität der Alkalischen Phosphatase nach β -Glycerophosphat induzierter Kalzifizierung nach 14-tägiger Inkubation mit 2-APB feststellen. Die Ergebnisse der Alkalischen Phosphatase entsprechen dabei unseren Analysen (Xu et al. 2015).

Dabei war in unseren Untersuchungen tatsächlich insbesondere die um das 269-fach erhöhte Expression von Osteopontin nach TRPM7-Blockade eindrucksvoll. Dazu ist wichtig zu wissen, dass Osteopontin unterschiedliche Funktionen und Wirkungen hat. Neben der Funktion als Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung ist es bedeutend für die Regulation der Mineralisierung (Wada et al. 1999). So ist Osteopontin ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Knochenmatrix und kann, wie bereits erwähnt, als Zeichen der Differenzierung von Gefäßmuskelzellen zu knochenzellähnlichen Zellen gewertet werden (Scatena et al. 2007). Zudem ist Osteopontin ein wichtiger Stoff für das Zellüberleben und konnte beispielsweise an Endothelzellen zum Überleben von apoptotischen Zellen beitragen (Scatena et al. 1998). Zusätzlich erhöht Osteopontin die Adhäsions- und Migrationsfähigkeit von glatten Muskelzellen und ist beispielsweise in Gefäßen nach Ballon-Katheterisierung wichtig für die Neointima-Bildung (Weintraub et al. 1995, Liaw et al. 1996, Giachelli et al. 1993).

Da sowohl Magnesium, als auch TRPM7, wie oben bereits beschrieben, wichtig für die Zellproliferation, das Zellüberleben und das Zellwachstum sind, wäre es naheliegend, wenn die Blockade von TRPM7 eine vermehrte Apoptosebereitschaft und Zellzyklusstillstand auslösen würde. Dies wiederum könnte auch zu einer vermehrten Expression von Osteopontin führen.

Die Ursache für die starke Expression von Osteopontin könnte also, wie auch die Wirkung und die Freisetzung des Proteins selbst, multifaktoriell sein. So gibt es vermutlich in diesem Versuch mehrere Faktoren, weshalb Osteopontin vermehrt exprimiert wurde. Zum einen im Rahmen der Veränderung der Zellen hin zu knochenähnlicheren Zellen und zum anderen möglicherweise um der verminderten Zellproliferation und der veränderten Migration entgegenzusteuern. Diese Faktoren waren wohl in diesen Versuchen stärkere Faktoren, sodass es dabei nicht als Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung bei niedrigeren Magnesiumkonzentrationen vermindert exprimiert wurde. Denkbar wären jedoch auch weitere noch weniger bekannte Aktivierungskaskaden von Osteopontin durch TRPM7 oder auch durch anderweitige Wirkungsweisen von 2-APB ausgelöst. Für ein besseres Verständnis bedarf es jedoch noch weitere Forschungsarbeiten.

Osteopontinmessung mittels ELISA

Nach der signifikant erhöhten Osteopontin-Expression nach Blockade von TRPM7 sowie der vermehrten Expression bei erhöhten Magnesiumkonzentrationen folgte die Messung der Osteopontin-Konzentration im Serum von Dialysepatienten. Bislang ist noch nicht geklärt, inwiefern die lokale Wirkung von Osteopontin *in vitro*, als Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung, mit der systemischen Wirkung *in vivo* korreliert. Dabei wurde in der vorliegenden Arbeit Osteopontin mittels ELISA-Verfahren im Serum der Dialysepatienten nachgewiesen und in Korrelation zu verschiedenen Laborparametern der Patienten gesetzt. Dabei war eine positive Korrelation zwischen der Osteopontin-Konzentration im Serum und ionisiertem Magnesium von $r = 0,48$ vorhanden (Pearson Korrelationskoeffizient, $n = 15$, $p = 0,0699$). Mit anderen Laborparametern, wie Kalzium, Phosphat, dem Kalzium-/Phosphat-Produkt, nicht-ionisiertem Magnesium, pH oder dem Patientenalter, konnten keine relevanten Korrelationen festgestellt werden.

Ob die erhöhte Osteopontin-Konzentration tatsächlich durch die Wirkung von Magnesium erklärt werden kann, bleibt unklar, da einige Stör- und Einflussfaktoren nicht in die Untersuchung einbezogen wurden. So wird Osteopontin z. B. auch vermehrt bei Tumorerkrankungen, bei chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen freigesetzt (Kadkol, 2006; Scalena, 2007). Zudem soll Osteopontin nur im phosphorylierten Zustand eine antikalzifizierende Wirkung haben. Im nicht-phosphorylierten Zustand soll es möglicherweise sogar eine prokalzifizierende Wirkung zeigen. Diese Phosphorylierung erfolgt jedoch erst durch posttranslationelle Proteinmodifikation (Jono et al. 2000). Die Unterscheidung der Phosphorylierung wurde in dieser Arbeit nicht gemacht. Diese Problematik wurde beispielsweise auch von Chen et al. beschrieben (Chen et al. 2002). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass Osteopontin von Thrombin gespalten werden kann, was zu veränderten Messergebnissen führen kann (Sodek et al. 2000). Gleichwohl könnte dieses Ergebnis ein weiterer Hinweis auf die gefäßprotektive Wirkungsweise von Magnesium darstellen. Da sich in den Untersuchungsergebnissen einerseits statistisch eine Korrelation zwischen Osteopontin und ionisiertem Magnesium andeutet und die nötigen Fallzahlen für ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht wesentlich höher sind, wäre dies ein guter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

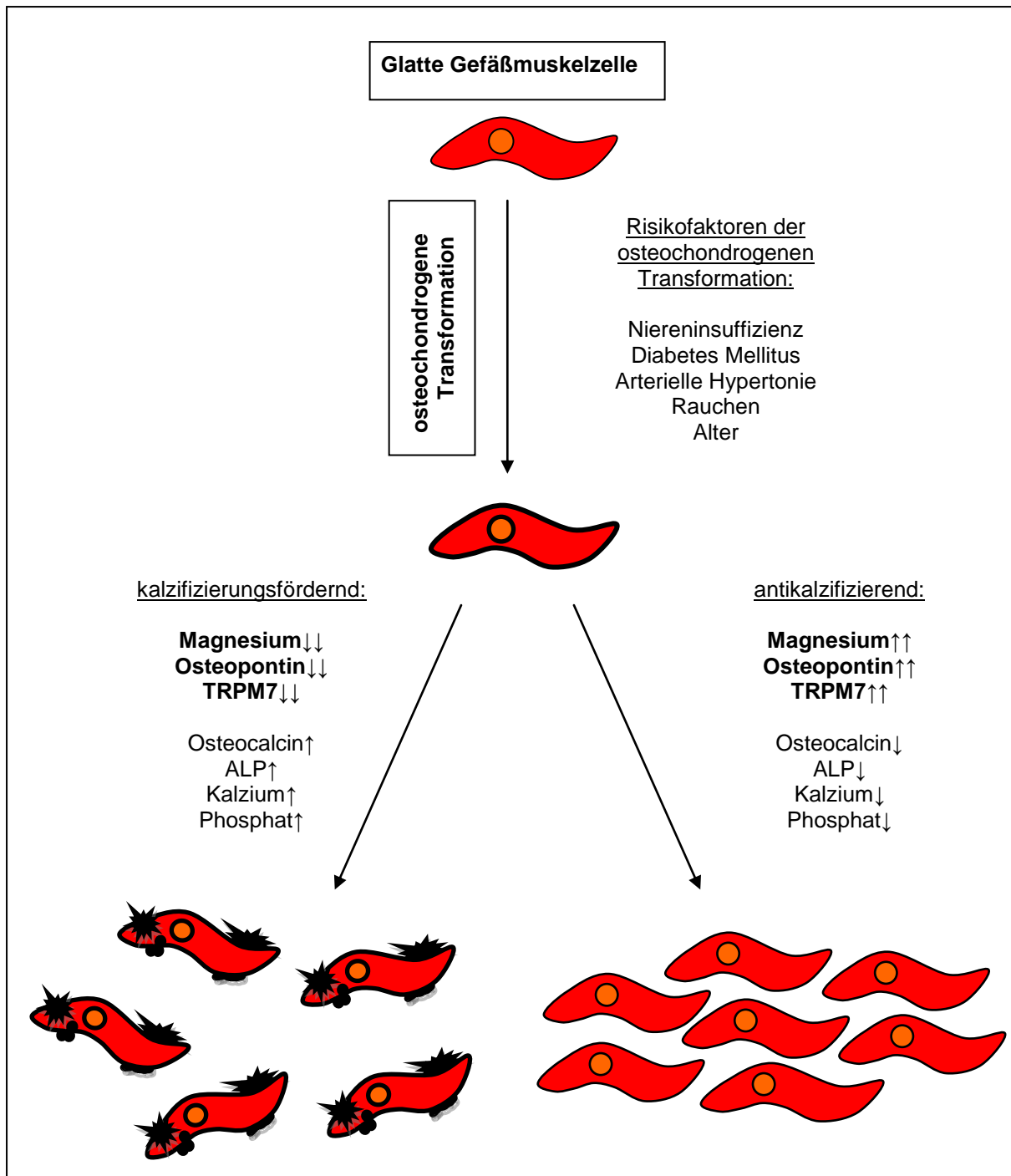


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Beeinflussung der Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen mit Einbezug dieser Arbeit

In diesem Schema dargestellt wurden verschiedenste Faktoren, die die vaskuläre Kalzifizierung mit osteochondrogener Transformation der glatten Gefäßmuskelzellen beeinflussen, sowie die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen auf den Zellverbund. Durch Blockade von TRPM7 durch 2-APB war eine deutlich verringerte Zellteilungsrate und ein stark verändertes Adhäsionsverhalten der Zellen zu beobachten, vermutlich erklärbar durch die Wirkungsweise von Magnesium, Osteopontin und TRPM7 (Weintraub et al. 1995, Romani 2011, Inoue et al. 2006).

Photometrische Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Bei der photometrischen Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen waren keine signifikanten Unterschiede messbar. In der Literatur konnte jedoch zum Teil gezeigt werden, dass in glatten Gefäßmuskelzellen von Rindern durch höhere Magnesiumkonzentrationen eine Hemmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase stattfindet (Kircelli et al. 2012). Diese Beobachtung konnte in diesem Versuchsaufbau mittels indirekter Aktivitätsmessung von ALP nicht bestätigt werden. Die hier nach Magnesiumkonzentrationen aufgeteilt durchgeführten ALP-Aktivitätsmessungen wurden in leicht abgewandelter Weise nach Ehnert et al. durchgeführt. Diese Arbeiten wurden jedoch an aus dem Fettgewebe gewonnenen mesenchymalen Stammzellen durchgeführt. Im Unterschied zu den mesenchymalen Stammzellen wiesen die humanen glatten Gefäßmuskelzellen eine geringere Adhäsionsfähigkeit auf, weshalb die Zellen nach Inkubation mit der Substratlösung abgelöst und zentrifugiert wurden. Daraufhin erfolgte aus dem Überstand der Nachweis des Farbumschlags. Im Gegensatz dazu verwendeten Ehnert et al., die Substratlösung nach Inkubation der Zellen zum Nachweis der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Ehnert et al. 2011). Daher erklärt sich möglicherweise die große Streuung, der hier durchgeführten Messungen.

Methodische Probleme

Eine Schwäche dieser Arbeit ist die insgesamt zu geringe Anzahl an Messversuchen. So waren beispielsweise in der Versuchsreihe der Behandlung der glatten Gefäßmuskelzellen mit und ohne Blockade von TRPM7 die Ergebnisse der drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche für Osteocalcin alle in die gleiche Richtung weisend, jedoch trotzdem noch nicht signifikant verschieden. Weitere Zellversuche und Wiederholungen könnten dabei zusätzliche Gewissheit und Aufschlüsse über die Wirkung von Magnesium auf die Zelle und insbesondere auf die Marker der vaskulären Kalzifizierung geben.

Eine Schwachstelle in der statistischen Auswertung besteht darin, dass die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten mittels zweiseitigem t-Test für verbundene Stichproben nur unter der Annahme möglich ist, dass die Ergebnisse normalverteilt sind. Dies lässt sich allerdings aufgrund der geringen Fallzahlen mit statistischen Tests nicht überprüfen, sondern muss als Voraussetzung für die Signifikanztests angenommen werden.

Zudem gibt es, soweit uns bekannt ist, keinen rein selektiven Blocker des TRPM7-Kanals. So werden bei der Verwendung von 2-APB zur TRPM7-Blockade auch andere Ionen an der Passage gehindert und die dadurch verursachten Veränderungen sind nicht nur rein auf die veränderten intrazellulären Magnesiumkonzentrationen zurückzuführen.

7. Zusammenfassung

Bei der chronischen Niereninsuffizienz handelt es sich um eine weltweit häufiger werdende Erkrankung. Neben anderen Folgeerkrankungen ist insbesondere die kardio- und zerebrovaskuläre Mortalität und Morbidität stark erhöht. Als zentrale Ursache gilt die vermehrte Kalzifizierung von Gefäßen. Im Zentrum dieser Umbauvorgänge sind dabei die glatten Gefäßmuskelzellen, die sich zu knochenzellähnlichen Zellen verändern und dabei Marker des Knochenstoffwechsels freisetzen, die die vaskuläre Kalzifizierung maßgeblich beeinflussen. In zahlreichen vorherigen Forschungsarbeiten wurde bereits eine protektive Wirkung auf die Gefäße durch Magnesium gezeigt. Dabei haben niedrigere Magnesiumspiegel eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität zur Folge. Auch auf zellulärer Ebene zeigte sich der protektive Effekt von Magnesium. Die genauen Prozesse sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Im Hinblick auf die noch ungeklärten Forschungsfragen wurden in dieser Arbeit verschiedene Versuche hinsichtlich des Magnesiumeinflusses auf humane glatte Gefäßmuskelzellen durchgeführt. Zudem wurde Serum von Dialysepatienten bezüglich der Korrelation der Konzentration des Knochenstoffwechselmarkers Osteopontin und einigen Laborparametern untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden humane glatte Gefäßmuskelzellen einen, drei bzw. vier oder sieben Tage in Kalzifizierungsmedium bei hohen bzw. niedrigen Magnesiumkonzentrationen inkubiert und zunächst mittels photometrischer Messung bezüglich der Aktivität der Alkalischen Phosphatase untersucht. Dabei zeigten sich jedoch keine signifikanten Ergebnisse. Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe mit den gleichen Behandlungsbedingungen die humanen glatten Gefäßmuskelzellen hinsichtlich der Expression der Knochenstoffwechsel-Marker Osteopontin, BMP7, Osteocalcin und der Alkalischen Phosphatase mittels PCR untersucht. Dabei gehörten zu den eher antikalzifizierend wirkenden Proteinen Osteopontin und BMP7. Es kam zu einer vermehrten Freisetzung von Osteopontin bei höheren Magnesiumkonzentrationen nach siebentägiger Inkubation ($p = 0,075$). Dies kann als Hinweis für die protektive Wirkung von Magnesium hinsichtlich der vaskulären Kalzifizierung dienen. BMP7 war jedoch in den Versuchen nicht nachweisbar. Für die kalzifizierungsfördernden Marker

Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase konnten in dieser Versuchsreihe keine signifikanten Ergebnisse gezeigt werden.

Daraufhin wurden die humanen glatten Gefäßmuskelzellen sieben Tage in Medium mit höherer Magnesiumkonzentration teils mit einem Blocker des für die Magnesiumhomöostase essenziellen TRPM7-Kanals und teils ohne diesen Blocker inkubiert. Dabei wurden alle drei Marker Osteopontin, Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase vermehrt nach Blockade des TRPM7-Kanals, also vermutlich einer erniedrigten intrazellulären Magnesiumkonzentration, exprimiert. Dies ist als Zeichen der vermehrten osteochondrogenen Transformation der Zellen bei erniedrigten intrazellulären Magnesiumkonzentrationen zu werten. Signifikante Ergebnisse lagen für Osteopontin und die Alkalische Phosphatase vor. Die Werte für Osteocalcin waren zwar nicht signifikant verschieden, jedoch nach TRPM7-Blockade in allen drei unabhängigen Untersuchungen vermehrt exprimiert. Besonders eindrucksvoll waren auch das verminderte Proliferationsverhalten und die veränderte Migration der Zellen nach Blockade des TRPM7-Kanals. Dies spricht für die vielfältige Bedeutung von Magnesium auf glatte Gefäßmuskelzellen.

Interessant sind in dieser Arbeit besonders die Ergebnisse für Osteopontin, das als Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung gilt. So kam es zu einer vermehrten Expression von Osteopontin bei hohen Magnesiumkonzentrationen. Nach Blockade des TRPM7-Kanals, d. h. nach intrazellulär erniedrigten Magnesiumkonzentrationen, wurde Osteopontin jedoch ebenfalls signifikant vermehrt exprimiert. Dies weist auf die vielfältige Wirkungsweise und multiplen Beeinflussungen des Proteins hin und zeigt einen deutlichen Einfluss von Magnesium auf die glatten Gefäßmuskelzellen.

Serum von Dialysepatienten wurde hinsichtlich der Osteopontin-Konzentration mittels ELISA-Testprinzip und der Korrelation von Serum-Laborparametern analysiert. Die Korrelationen waren zwar nicht signifikant, jedoch zeigte sich eine Tendenz einer vermehrten Osteopontin-Konzentration bei höheren Magnesium-Konzentrationen, was in weiteren Untersuchungen erforscht werden sollte.

Um noch genauere Aussagen und mögliche Therapieoptionen bezüglich Magnesium und der Expression von Markern des Knochenstoffwechsels machen zu können, ist in Zukunft weitere Forschung sowohl in vitro als auch in vivo notwendig.

8. Literaturverzeichnis

Adamopoulos, C., Pitt, B., Sui, X., Love, T. E., Zannad, F. and Ahmed, A. (2009) 'Low serum magnesium and cardiovascular mortality in chronic heart failure: a propensity-matched study', *Int J Cardiol*, 136(3), 270-7.

Astor, B. C., Hallan, S. I., Miller, E. R., 3rd, Yeung, E. and Coresh, J. (2008) 'Glomerular filtration rate, albuminuria, and risk of cardiovascular and all-cause mortality in the US population', *Am J Epidemiol*, 167(10), 1226-34.

Baldoli, E. and Maier, J. M. (2012) 'Silencing TRPM7 mimics the effects of magnesium deficiency in human microvascular endothelial cells', *Angiogenesis*, 15(1), 47-57.

Briet, M. and Burns, Kevin D. (2012) 'Chronic kidney disease and vascular remodelling: molecular mechanisms and clinical implications', *Clin Sci (Lond)*, 123(7), 399-416.

Chen, N., O'Neill, K., Duan, D. and Moe, S. (2002) 'Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells', *Kidney Int*, 62, 1724-1731.

Chiu, D. Y., Sinha, S., Kalra, P. A. and Green, D. (2014) 'Sudden cardiac death in haemodialysis patients: preventative options', *Nephrology (Carlton)*, 19(12), 740-9.

Chokshi, R., Fruasaha, P. and Kozak, J. A. (2012) '2-aminoethyl diphenyl borinate (2-APB) inhibits TRPM7 channels through an intracellular acidification mechanism', *Channels (Austin)*, 6(5), 362-9.

Clark, K., Langeslag, M., van Leeuwen, B., Ran, L., Ryazanov, A. G., Figdor, C. G., Moolenaar, W. H., Jalink, K. and van Leeuwen, F. N. (2006) 'TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion', *The EMBO Journal*, 25, 290-301.

Covic, A., Kanbay, M., Voroneanu, L., Turgut, F., Serban, D. N., Serban, I. L. and Goldsmith, D. J. (2010) 'Vascular calcification in chronic kidney disease', *Clin Sci (Lond)*, 119(3), 111-21.

Cozzolino, M., Brancaccio, D., Gallieni, M. and Slatopolsky, E. (2005) 'Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease', *Kidney Int Suppl*, 68, 429-436.

De Francisco, A. L. M. and Rodriguez, M. (2013) 'Magnesium - its role in CKD', *Nefrologia*, 33(3), 389-399.

Disthabanchong, S. (2012) 'Vascular calcification in chronic kidney disease: Pathogenesis and clinical implication', *World J Nephrol*, 1(2), 43-53.

Ducy, P. (2011) 'The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism', *Diabetologia*, 54(6), 1291-7.

Dulau-Florea, I., Franke, J. and Mann, J. (2003) 'Mäßige Niereninsuffizienz: ein erheblicher kardiovaskulärer Risikofaktor', *Dtsch Med Wochenschr*, 128, 1247–1251.

Ehnert, S., Häuser, J., Kerler, I., Schmitt, A., Olderøy, M., Thomas Freude, T., Neumaier, M., Egaña, T., Schenck, T., Stöckle, U. and Nüssler, A. K. (2011) 'Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe- Die bessere Alternative zu Knochenmarkszellen für das Tissue Engineering von Knochen?', *Regenerative Medizin*, 1, 3-8.

Floege, J. (2015) 'Magnesium in CKD: more than a calcification inhibitor?', *J Nephrol*, 28(3), 269-77.

Frei, U. and Schober-Halstenberg, H.-J. (2008) 'Nierenersatztherapie in Deutschland, Bericht 2006-2007, QuaSi-Niere', 1-64.

Giachelli, C. M. (2004) 'Vascular calcification mechanisms', *J Am Soc Nephrol*, 15(12), 2959-64.

Giachelli, C. M., Bae, N., Almeida, M., Denhardt, D. T., Alpers, C. E. and Schwartz, S. M. (1993) 'Osteopontin Is Elevated during Neointima Formation in Rat Arteries and Is a Novel Component of Human Atherosclerotic Plaques', *J. Clin. Invest.*, 92, 1686-1696.

Giachelli, C. M., Speer, M. Y., Li, X., Rajachar, R. M. and Yang, H. (2005) 'Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin', *Circ Res*, 96(7), 717-22.

Gluba-Brzozka, A., Michalska-Kasiczak, M., Franczyk-Skora, B., Nocun, M., Banach, M. and Rysz, J. (2014) 'Markers of increased cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease', *Lipids Health Dis*, 13, 135.

Hallan, S. I., Coresh, J., Astor, B. C., Asberg, A., Powe, N. R., Romundstad, S., Hallan, H. A., Lydersen, S. and Holmen, J. (2006) 'International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk', *J Am Soc Nephrol*, 17(8), 2275-84.

Hamaguchi, Y., Matsubara, T., Amano, T., Uetani, T., Asano, H., Iwamoto, T., Furukawa, K., Murohara, T. and Nakayama, S. (2003) 'Na⁺-independent Mg²⁺ transport sensitive to 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) in vascular smooth muscle cells: involvement of TRPM-like channels', *J. Cell. Mol. Med.*, 12(3), 962-974.

Hausberg, M., Kisters, K., Kosch, M. and Barenbrock, M. (2000) 'Gefäßwandveränderungen bei Niereninsuffizienz', *Medizinische Klinik*, 95(5), 279–85.

He, Y., Yao, G., Savoia, C. and 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), 207-15.

Henry, R., Kostense, P., Bos, G., Dekker, J., Nijpels, G., Heine, R., Bouter, L. and C., S. (2002) 'Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study', *Kidney Int Suppl*, 62, 1402–1407.

Idelevich, A., Rais, Y. and Monsonego-Ornan, E. (2011) 'Bone Gla protein increases HIF-1 α -dependent glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(9), e55-71.

Inoue, R., Jensen, L. J., Shi, J., Morita, H., Nishida, M., Honda, A. and Ito, Y. (2006) 'Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease', *Circ Res*, 99(2), 119-31.

Ishimura, E., Okuno, S., Okazaki, H., Norimine, K., Yamakawa, K., Yamakawa, T., Shoji, S., Nishizawa, Y. and Inaba, M. (2014) 'Significant association between bone-specific alkaline phosphatase and vascular calcification of the hand arteries in male hemodialysis patients', *Kidney Blood Press Res*, 39(4), 299-307.

Ishimura, E., Okuno, S., Yamakawa, T., Inaba, M. and Nishizawa, Y. (2007) 'Serum magnesium concentration is a significant predictor of mortality in maintenance hemodialysis patients', *Magnesium Research*, 20 (4), 237-44.

James, M. T., Quan, H., Tonelli, M., Manns, B. J., Faris, P., Laupland, K. B., Hemmelgarn, B. R. and Alberta Kidney Disease, N. (2009) 'CKD and risk of hospitalization and death with pneumonia', *Am J Kidney Dis*, 54(1), 24-32.

Jono, S., Peinado, C. and Giachelli, C. M. (2000) 'Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification', *J Biol Chem*, 275(26), 20197-203.

Kalra, S. S. and Shanahan, C. M. (2012) 'Vascular calcification and hypertension: cause and effect', *Ann Med*, 44 Suppl 1, S85-92.

KDIGO (2013) 'KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease', *Kidney Int Suppl*.

Keller, C. K. and Geberth, S. K. (2010) *Praxis der Nephrologie*, Springer.

Kircelli, F., Peter, M. E., Sevinc Ok, E., Celenk, F. G., Yilmaz, M., Steppan, S., Asci, G., Ok, E. and Passlick-Deetjen, J. (2012) 'Magnesium reduces calcification in bovine vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner', *Nephrol Dial Transplant*, 27(2), 514-21.

Lee, M., Saver, J. L., Chang, K. H., Liao, H. W., Chang, S. C. and Ovbiagele, B. (2010) 'Low glomerular filtration rate and risk of stroke: meta-analysis', *BMJ*, 341, c4249.

Levey, A. S., Atkins, R., Coresh, J., Cohen, E. P., Collins, A. J., Eckardt, K. U., Nahas, M. E., Jaber, B. L., Jadoul, M., Levin, A., Powe, N. R., Rossert, J., Wheeler, D. C., Lameire, N. and Eknoyan, G. (2007) 'Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes', *Kidney Int*, 72(3), 247-59.

Levey, A. S., de Jong, P. E., Coresh, J., El Nahas, M., Astor, B. C., Matsushita, K., Gansevoort, R. T., Kasiske, B. L. and Eckardt, K. U. (2011) 'The definition,

classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report', *Kidney Int*, 80(1), 17-28.

Li, M., Jiang, J. and Yue, L. (2006) 'Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7', *J Gen Physiol*, 127(5), 525-37.

Liaw, L., Almeida, M., Hart, C. E., Schwartz, S. M. and Giachelli, C. M. (1996) 'Osteopontin Promotes Vascular Cell Adhesion and Spreading and Is Chemotactic for Smooth Muscle Cells In Vitro', *Circ Res*, 74, 214-224.

Lindner, A., Charra, B., Sherrad, D. J. and Scribner, B. H. (1974) 'Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis', *N Engl J Med*, 290, 679-701.

Liu, M., Li, X.-C., Lu, L., CAO, Y., Sun, R.-R., Chen, S. and Zhang, P.-Y. (2014) 'Cardiovascular disease and its relationship with chronic kidney disease', *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18, 2918-2926.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods*, 25(4), 402-8.

London, G. M. (2003) 'Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(9), 1731-1740.

Louvet, L., Buchel, J., Steppan, S., Passlick-Deetjen, J. and Massy, Z. A. (2013) 'Magnesium prevents phosphate-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells', *Nephrol Dial Transplant*, 28(4), 869-78.

Massy, Z. A. and Drueke, T. B. (2012) 'Magnesium and outcomes in patients with chronic kidney disease: focus on vascular calcification, atherosclerosis and survival', *Clin Kidney J*, 5(Suppl 1), i52-i61.

Mathew, S., Davies, M., Lund, R., Saab, G. and Hruska, K. A. (2006) 'Function and effect of bone morphogenetic protein-7 in kidney bone and the bone-vascular links in chronic kidney disease', *European Journal of Clinical Investigation*, 36(2), 43-50.

Mazur, A., Maier, J. A., Rock, E., Gueux, E., Nowacki, W. and Rayssiguier, Y. (2007) 'Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications', *Arch Biochem Biophys*, 458(1), 48-56.

Meier-Kriesche, H. U., Schold, J. D., Srinivas, T. R., Reed, A. and Kaplan, B. (2004) 'Kidney transplantation halts cardiovascular disease progression in patients with end-stage renal disease', *Am J Transplant*, 4(10), 1662-8.

Mizobuchi, M., Towler, D. and Slatopolsky, E. (2009) 'Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease', *J Am Soc Nephrol*, 20(7), 1453-64.

Moe, S. M., O'NEILL, K., DUAN, D., AHMED, S., CHEN, N. X., LEAPMAN, S. B., FINEBERG, N. and KOPECKY, K. (2002) 'Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins', *Kidney Int Suppl*, 61, 638-647.

Montes de Oca, A., Guerrero, F., Martinez-Moreno, J., Maduen, J., Herencia, C., Peralta, A., Almaden, Y., Lopez, I., Aguilera-Tejero, E., Gundlach, K., Büchel, J., Peter, M., Passlick-Deetjen, J., Rodriguez, M. and Castañeda-Muñoz, J. (2014) 'Magnesium Inhibits Wnt/b-Catenin Activity and Reverses the Osteogenic Transformation of Vascular Smooth Muscle Cells', *PLoS One*, 9(2).

Montezano, A. C., Zimmerman, D., Yusuf, H., Burger, D., Chignalia, A. Z., Wadhwa, V., van Leeuwen, F. N. and Touyz, R. M. (2010) 'Vascular smooth muscle cell differentiation to an osteogenic phenotype involves TRPM7 modulation by magnesium', *Hypertension*, 56(3), 453-62.

Nadler, M. J. S., Hermosura, M. C., Inabe, K., Perraud, A.-L., Zhu, Q., Stokes, A. J., Kurosaki, T., Kinet, J.-P., R., R. P., Scharenberg, A. M. and Fleig, A. (2001) 'LTRPC7 is a Mg ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability', *NATURE*, 411.

Narisawa, S., Harmey, D., Yadav, M. C., O'Neill, W. C., Hoylaerts, M. F. and Millan, J. L. (2007) 'Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification', *J Bone Miner Res*, 22(11), 1700-10.

Rajamannan, N. M., Subramaniam, M., Rickard, D., Stock, S. R., Donovan, J., Springett, M., Orszulak, T., Fullerton, D. A., Tajik, A. J., Bonow, R. O. and Spelsberg, T. (2003) 'Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype', *Circulation*, 107(17), 2181-4.

Romani, A. M. (2011) 'Cellular magnesium homeostasis', *Arch Biochem Biophys*, 512(1), 1-23.

Ryazanova, L. V., Rondon, L. J., Zierler, S., Hu, Z., Galli, J., Yamaguchi, T. P., Mazur, A., Fleig, A. and Ryazanov, A. G. (2010) 'TRPM7 is essential for Mg(2+) homeostasis in mammals', *Nat Commun*, 1, 109.

Sage, A. P., Lu, J., Tintut, Y. and Demer, L. L. (2011) 'Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro', *Kidney Int*, 79(4), 414-22.

Said, S. and Hernandez, G. T. (2014) 'The link between chronic kidney disease and cardiovascular disease', *J Nephrol*, 3(3), 99-104.

Sakaguchi, Y., Fujii, N., Shoji, T., Hayashi, T., Rakugi, H., Iseki, K., Tsubakihara, Y., Isaka, Y. and Committee of Renal Data Registry of the Japanese Society for Dialysis, T. (2014) 'Magnesium modifies the cardiovascular mortality risk associated with hyperphosphatemia in patients undergoing hemodialysis: a cohort study', *PLoS One*, 9(12), e116273.

Salem, S., Bruck, H., Bahlmann, F. H., Peter, M., Passlick-Deetjen, J., Kretschmer, A., Steppan, S., Volsek, M., Kribben, A., Nierhaus, M., Jankowski, V., Zidek, W. and Jankowski, J. (2012) 'Relationship between magnesium and clinical biomarkers on inhibition of vascular calcification', *Am J Nephrol*, 35(1), 31-9.

- Sarnak, M. J., Levey, A. S., Schoolwerth, A. C., Coresh, J., Culeton, B., Hamm, L. L., McCullough, P. A., Kasiske, B. L., Kelepouris, E., Klag, M. J., Parfrey, P., Pfeffer, M., Raij, L., Spinosa, D. J. and Wilson, P. W. (2003) 'Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention', *Circulation*, 108(17), 2154-69.
- Scatena, M., Almeida, M., Chaisson, M. L., Fausto, N., Nicosia, R. F. and Giachelli, C. M. (1998) 'NF- κ B Mediates α β 3 Integrin-induced Endothelial Cell Survival', *The Journal of Cell Biology*, 141(4), 1083-1093.
- Scatena, M., Liaw, L. and Giachelli, C. M. (2007) 'Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(11), 2302-9.
- Schiffrin, E. L., Lipman, M. L. and Mann, J. F. (2007) 'Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system', *Circulation*, 116(1), 85-97.
- Shanahan, C. M., Crouthamel, M. H., Kapustin, A. and Giachelli, C. M. (2011) 'Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate', *Circ Res*, 109(6), 697-711.
- Shulman, N. B., Ford, C. E., Hall, W. D., Blafox, M. D., Simon, D., Langford, H. G. and Schneider, K. A. (1989) 'Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function. Results from the hypertension detection and follow-up program. The Hypertension Detection and Follow-up Program Cooperative Group', *Hypertension*, 13(5_Suppl), I80-I80.
- Silva, A. P., Fragoso, A., Silva, C., Tavares, N., Santos, N., Martins, H., Gundlach, K., Büchel, J., Camacho, A., Faísca, M., Varela, I. J. and Neves, P. (2014) 'Magnesium and mortality in patients with diabetes and early chronic kidney disease', *J Diabetes Metab*, 5(3).
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985) 'Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid', *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 150, 76-85.
- Sodek, J., Ganss, B. and McKee, M. D. (2000) 'Osteopontin', *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(3), 279-303.
- Speer, M. Y., Chien, Y. C., Quan, M., Yang, H. Y., Vali, H., McKee, M. D. and Giachelli, C. M. (2005) 'Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification in vitro', *Cardiovasc Res*, 66(2), 324-33.
- Standal, T., Borset, M. and Sundan, A. (2004) 'Role of Osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling', *Exp Oncol*, 26(3), 179-184.
- Steitz, S. A., Speer, M. Y., Curinga, G., Yang, H. Y., Haynes, P., Aebersold, R., Schinke, T., Karsenty, G. and Giachelli, C. M. (2001) 'Smooth Muscle Cell Phenotypic

Transition Associated With Calcification: Upregulation of Cbfa1 and Downregulation of Smooth Muscle Lineage Markers', *Circ Res*, 89(12), 1147-1154.

Tonelli, M., Wiebe, N., Culeton, B., House, A., Rabbat, C., Fok, M., McAlister, F. and Garg, A. X. (2006) 'Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review', *J Am Soc Nephrol*, 17(7), 2034-47.

Tong, G. M. and Rude, R. K. (2005) 'Magnesium deficiency in critical illness', *J Intensive Care Med*, 20(1), 3-17.

Touyz, R. M. and Yao, G. (2003) 'Modulation of vascular smooth muscle cell growth by magnesium - role of mitogen - activated protein kinases', *Journal of Cellular Physiology*, 197(3), 326-335.

Turgut, F., Kanbay, M., Metin, M. R., Uz, E., Akcay, A. and Covic, A. (2008) 'Magnesium supplementation helps to improve carotid intima media thickness in patients on hemodialysis', *Int Urol Nephrol*, 40(4), 1075-82.

Vo, T. M. and Disthabanchong, S. (2014) 'Are there ways to attenuate arterial calcification and improve cardiovascular outcomes in chronic kidney disease?', *World J Cardiol*, 6(5), 216-26.

Wada, T., McKee, M. D., Steitz, S. and Giachelli, C. M. (1999) 'Calcification of Vascular Smooth Muscle Cell Cultures : Inhibition by Osteopontin', *Circ Res*, 84(2), 166-178.

Weintraub, A. S., Giachelli, C. M., Krauss, R. S., Almeida, M. and Taubman, M. T. (1995) 'Autocrine Secretion of Osteopontin by Vascular Smooth Muscle Cells Regulates Their Adhesion to Collagen Gels', *American Journal of Pathology*, 149(1), 259-272.

Wilhelm-Leen, E. R., Hall, Y. N., M, K. T. and Chertow, G. M. (2009) 'Frailty and chronic kidney disease: the Third National Health and Nutrition Evaluation Survey', *Am J Med*, 122(7), 664-71 e2.

Wolf, F. I. and Cittadini, A. (1999) 'Magnesium in cell proliferation and differentiation', *Frontiers in Bioscience*, 4, 607-617.

Xu, J., Bai, Y., Jin, J., Zhang, J., Zhang, S., Cui, L. and Zhang, H. (2015) 'Magnesium modulates the expression levels of calcification-associated factors to inhibit calcification in a time-dependent manner', *Exp Ther Med*, 9(3), 1028-1034.

Xu, R., Zhang, L., Zhang, P., Wang, F., Zuo, L. and Wang, H. (2009) 'Comparison of the prevalence of chronic kidney disease among different ethnicities: Beijing CKD survey and American NHANES', *Nephrol Dial Transplant*, 24(4), 1220-6.

Yamanouchi, D., Takei, Y. and Komori, K. (2012) 'Balanced Mineralization in the Arterial System', *Circulation Journal*, 76(12), 2732-2737.

Yamashita, T. (2011) 'Serum Alkaline Phosphatase Levels and Mortality of Chronic Hemodialysis Patients', *International Journal of Clinical Medicine*, 02(04), 388-393.

Yogi, A., Callera, G. E., Antunes, T. T., Tostes, R. C. and Touyz, R. M. (2011) 'Transient Receptor Potential Melastatin 7 (TRPM7) Cation Channels, Magnesium and the Vascular System in Hypertension', *Circulation Journal*, 75(2), 237-245.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Apl. Prof. Dr. Marcus Baumann für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, die hilfreichen wissenschaftlichen Anregungen und die Korrektur meiner Doktorarbeit bedanken.

In besonderem Maße danke ich Stefan Chmielewski, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mir geholfen hat all zu schlimme Katastrophen im Labor zu vermeiden.

Ebenso möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern des nephrologischen Forschungslabors und der Dialysestation, insbesondere bei Alina und Sandra für die nette und kompetente Hilfe und Unterstützung bedanken.

Meinen Freunden danke ich, dass sie mir in den Höhen und Tiefen dieser Arbeit zur Seite standen und das Studium zu einer großartigen Zeit gemacht haben. Da sehnt man sich doch wieder einen Tag in der Bibliothek mit anschließendem Beisammensein herbei. Danke, Justus, dass du dich durch die Arbeit gequält hast. Ohne dich wäre sie noch lange nicht abgegeben. Timi, danke auch dir für die brüderliche Unterstützung sei es durch Computer-Lehre oder durch Mittagessen während dem Physikum oder einfach nur durch dein „da sein“.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, dass sie mir nicht nur mein Studium ermöglicht haben, sondern mir immer unterstützend und liebevoll zur Seite stehen so auch wieder beim Korrekturlesen.