

Journal für

Urologie und Urogynäkologie

Zeitschrift für Urologie und Urogynäkologie in Klinik und Praxis

**Kommunikation zwischen glatten
Muskelzellen von normalem und
überkativem Detrusor**

John H, Maake C

*Journal für Urologie und
Urogynäkologie 2007; 14 (1)*

(Ausgabe für Österreich), 11-13

Journal für Urologie und

Urogynäkologie 2007; 14 (1)

(Ausgabe für Schweiz), 10-12

Journal für Urologie und

Urogynäkologie 2007; 14 (1)

(Ausgabe für Deutschland), 11-13

Homepage:

www.kup.at/urologie

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

Indexed in Scopus

Member of the



www.kup.at/urologie

Krause & Pachernegg GmbH · VERLAG für MEDIZIN und WIRTSCHAFT · A-3003 Gablitz

P.b.b. 022031116M, Verlagspostamt: 3002 Purkersdorf, Erscheinungsort: 3003 Gablitz

Erschaffen Sie sich Ihre ertragreiche grüne Oase in Ihrem Zuhause oder in Ihrer Praxis

Mehr als nur eine Dekoration:

- Sie wollen das Besondere?
- Sie möchten Ihre eigenen Salate, Kräuter und auch Ihr Gemüse ernten?
- Frisch, reif, ungespritzt und voller Geschmack?
- Ohne Vorkenntnisse und ganz ohne grünen Daumen?

Dann sind Sie hier richtig



Kommunikation zwischen glatten Muskelzellen von normalem und überaktivem Detrusor

H. John¹, C. Maake²

Die exakte Pathophysiologie der überaktiven Blase ist unklar. Myogene, neurogene und idiopathische Ursachen werden diskutiert. Gap junctions könnten in der interzellulären Kommunikation eine wichtige Rolle spielen. Wir untersuchten deshalb das Auftreten von Gap junctions und deren Strukturprotein Connexin (Cx) 45 im normalen Detrusor und in Patienten mit überaktiven Harnblasen (ÜAB) ohne Harninkontinenz. Elektronenmikroskopisch und im Gefrierbruchverfahren konnten Gap junctions nachgewiesen werden. Die Cx45-Expression wurde durch RT-PCR, mittels In-situ-Hybridisation und immunhistochemisch dargestellt. Patienten mit ÜAB ohne Inkontinenz zeigten keine signifikante Differenz der Expression von Cx45. Wir können jedoch nicht ausschließen, daß die Gap-junction-Kommunikation in hyperaktiven Blasen mit Detrusorinstabilität trotzdem eine wichtige Rolle spielen könnten.

Little is known about the exact pathophysiology of the overactive bladder (OAB). Myogenic, neurogenic and idiopathic origins are discussed. It has been proposed, that gap junction intercellular communication between detrusor cells may play an etiological role. In this paper, we examined the occurrence gap junctions and their structural proteins in the normal bladder smooth muscle and in patients with overactive bladder without incontinence (OAB dry). Transmission electron microscopy and freeze fracture showed the presence of gap junctions at plasma membranes of detrusor muscle cells. By reverse transcriptase (RT) polymerase chain reaction (PCR) and in situ hybridisation we found an expression of Connexin (Cx) 45 in the detrusor, confirmed by immunohistochemistry. In patients with overactive bladder without incontinence, comparative real time PCR analysis showed that there is no significant difference in the level of Cx45 transcription between sensory urge and normal detrusor muscle. This observation was confirmed by immunofluorescence revealing no difference in Cx45 protein expression. However, we cannot exclude possible changes of gap junction connexins in patients with OAB and detrusor instability. *J Urol Urogynäkol* 2007; 14 (1): 11–13.

Einleitung

Die überaktive Blase (ÜAB) bzw. „overactive bladder“ (OAB) ist ein chronisch bestehender Symptomenkomplex aus Harn-drang mit oder ohne Harnverlust, meistens verbunden mit Pollakisurie und Nykturie, wobei dieser Symptomenkomplex nicht durch andere, erkennbare pathologische Veränderungen erklärt werden kann [1]. Neben neurogenen werden myogene Faktoren zur pathophysiologischen Erklärung gesucht. „Gap junctions“ sind Interzellulärkontakte zwischen 2 glatten Muskelzellen, welche durch das Andocken zweier Halbkanäle (Connexone), die sich auf jeweils benachbarten Zellen befinden, geschlossen werden [2]. Die Connexone bestehen ihrerseits wieder aus hexameren Arrangements von Strukturproteinen, den Connexinen [3]. Nachdem bei Ratten und Mäusen der Connexinnachweis gelang [4, 5], wurde das Strukturprotein der Gap junctions 2003 auch beim Mensch gefunden [6, 7]. Bis heute sind im Menschen 21 verschiedene Connexin-Isoformen identifiziert. Diese Studie analysiert die Gap junctions und ihr Strukturprotein Cx45 im normalen Detrusor sowie in Patienten mit überaktiver Blase ohne Inkontinenz.

Methoden

Patienten

Kalte Detrusorbiopsien wurden bei 8 Patienten mit ÜAB ohne Inkontinenz vor Injektion von Botulinumtoxin A mit einer Knipszange entnommen und sofort schockgefroren. Als Vergleichskollektiv dienten 8 Patienten mit normaler Blasenfunktion, bei denen anlässlich einer Zystektomie aus dem gesunden Blasenareal eine Biopsie entnommen wurde. Alle Patienten hatten eine konklusive urodynamische Evaluation zum Ausschluß einer Blaseninstabilität oder infravesikalen Obstruktion.

Aus dem ¹Zentrum für Urologie, Klinik Hirslanden, Zürich und dem ²Anatomischen Institut der Universität Zürich

Korrespondenzadresse: PD Dr. med. Hubert John, Zentrum für Urologie, Klinik Hirslanden, CH-8032 Zürich, Witellikerstraße 40, E-Mail: hubert.john@hirslanden.ch

Elektronenmikroskopie

Die Ultradünnschnitte wurde mit einem Transmissions-elektronenmikroskop (TEM) untersucht. Die Biopsien wurden standardisiert druckgefroren, kryosubstituiert und in LR-Gold eingebettet.

Gefrierbruchtechnik

Unfixierte Proben wurden in flüssigem Propan gefroren und bei einem Vakuum von 10^{-7} mbar und bei -120° C gebrochen. Nach Bedampfung mit Platin/Carbon wurden die Replika verdaut, gewaschen und eine Cx45-Immuno-goldimmunzytochemie durchgeführt. Die Replika wurden unter dem TEM untersucht.

Laserdissektion und Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Aus allen Biopsien wurden $300.000 \pm 500 \mu\text{m}^2$ große Areale glatter Detrusormuskulatur laserdisseziert, separat die RNA extrahiert und revers transkribiert. Für die Real-Time PCR wurde eine kommerzielle humane Cx45-spezifische Primer/Probe-Kombination unter Standardbedingungen in einem ABI-7500-System eingesetzt. Die quantitative Analyse erfolgte mit der REST-Software.

Immunhistochemie

Die Biopsien wurden in Paraffin eingebettet. Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte mit einem Kaninchen-Anti-Mensch-Antikörper gegen Cx45 inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Inkubation mit einem biotinylierten Schaf-Anti-Kaninchen-IgG und mit Streptavidin-Fluorescein-isothiocyanat. Zur Gegenfärbung wurde DAPI verwendet. Die Kontrollinkubation schloß den Ersatz des Cx45-Antikörpers durch ein Nicht-Immuneserum ein.

In-situ-Hybridisierung

In-situ-Hybridisierung wurden an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Biopsien durchgeführt, wie vorgängig beschrieben [7]. Die Schnitte wurden für 16 h mit einer Sonde für Cx45 hybridisiert. Die Detektion erfolgte mit einem alkalischen Phosphatase-markierten Anti-Digoxigenin-Antikörper sowie BCIP und NBT.

Resultate

Mit dem Transmissionselektronenmikroskop sowie der Gefrierbruchtechnik konnte das Auftreten von Gap junctions an den Zellwänden der glatten Muskelzellen beobachtet werden. Erstaunlicherweise waren diese Gap junctions meist klein und nur in geringer Zahl darstellbar. Strukturell waren die Gap junctions im Ultradünnschnitt durch die klassische pentalaminäre Anordnung charakterisiert mit feiner zentraler Zone und einem Abstand zwischen den Zellen von ca. 2–3 nm (Abb. 1). Im Gefrierbruch zeigten die Replika sehr kleine irregulär angeordnete goldmarkierte Cx45-Gap-junction-Plaques (Abb. 2). Die Lokalisierung der Cx45 im Detrusor mit der In-situ-Hybridisierung zeigte in der Cx45-Antisense-Sonde ein Signal im Zytoplasma, während die Negativkontrolle keine Hybridisierungssignale anreichterte (Abb. 3). Die Immunreaktion gegen Cx45-Proteine wurde konstant mit kräftigen Fluoreszenzsignalen gefunden. Sie zeigte sich entlang der äußeren Plasmamembranen der glatten Muskelzellen (Abb. 4). In Kontrollproben ohne primären Antikörper wurden keine Immunreaktionen beobachtet.

Mit Real-Time PCR haben wir untersucht, ob Patienten mit stabiler überaktiver Blase gegenüber der Kontrollgruppe eine veränderte Cx45-Expression im Detrusor aufweisen. Relative quantitative Analysen zeigten jedoch, daß keine signifikanten Unterschiede in der Cx45-Expression zwischen beiden Gruppen vorliegen ($p = 0,475$).

Diskussion

Der Symptomenkomplex der überaktiven Blase wurde 2005 an einer deutschen Konsenskonferenz in Stuttgart sprachlich geregelt [1]. Wir sprechen von der überaktiven Blase (ÜAB), die der „overactive bladder“ (OAB) gemäß der ICS entspricht. Besteht eine Detrusorinstabilität, wird von der hyperaktiven Blase gesprochen.

Gap junctions wird eine große Bedeutung für die simultane Kontraktion der glatten Muskulatur zugeschrieben, und sie werden als myogene Komponente in der Ätiologie der überaktiven Blase diskutiert. Gap junctions sind Interzellularkontakte, welche ein Kommunikationssystem zwischen benachbarten Zellen bilden (funktionelles Syncytium). Die elektrische Kopplung der Blasenmuskelzellen wurde in elektrophysiologischen Studien klar gezeigt [8, 9]. Die Arbeitsgruppe um Elbadawi beschrieb elektronenmikroskopisch die „close apposition junctions“, die als mögliche Gap junctions diskutiert wurden und im normalen Detrusor nur selten zu finden sind [10]. Morphologisch wurden die Gap junctions und ihre Strukturproteine in der menschlichen Blase erst 2003 durch unsere Arbeitsgruppe konklusiv gezeigt [6, 7]. Die vorliegende Arbeit zeigt nochmals diese Gap junctions und eines ihrer Strukturproteine, Connexin 45, elektronenmikroskopisch (Abb. 1), in der Gefrierbruchtechnik (Abb. 2) und immunhistochemisch (Abb. 4). Wir bestätigen unsere früheren Ergebnisse, daß Gap junctions im normalen Detrusor ungewöhnlich klein sind. Dies mag der Grund sein, daß die Existenz der Gap junctions in der Harnblase viele Jahre umstritten war.

Aus unseren quantitativen Analysen kann man ersehen, daß die Transkriptionsprozesse des Cx45 im Detrusor von Patienten mit überaktiver stabiler Blase nicht signifikant beeinträchtigt sind. Es ist aber voreilig, hieraus auf eine ungestörte interzelluläre Kommunikation zu schließen, da

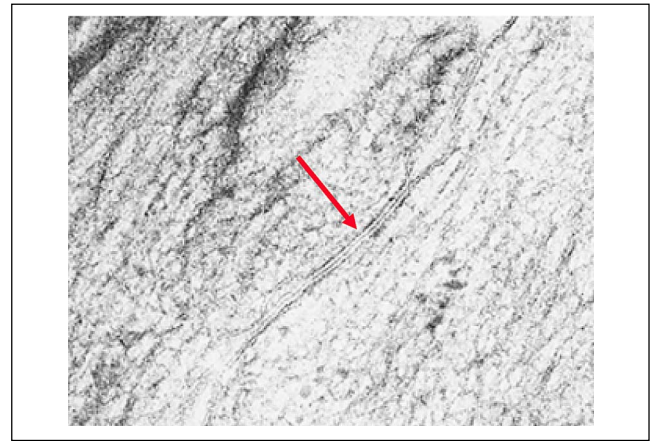


Abbildung 1: Transmissionselektronische Darstellung einer Gap junction mit typischem pentalaminärem Aufbau (Pfeil).

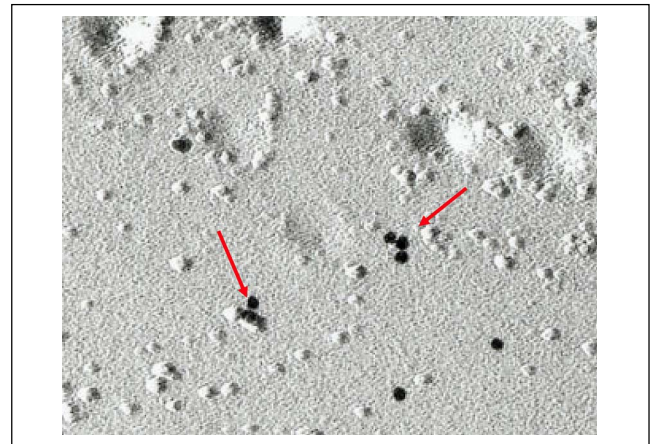


Abbildung 2: „Freeze-fracture immunogold labelling“ (Pfeile) für Connexin 45 in der stabilen Blase.

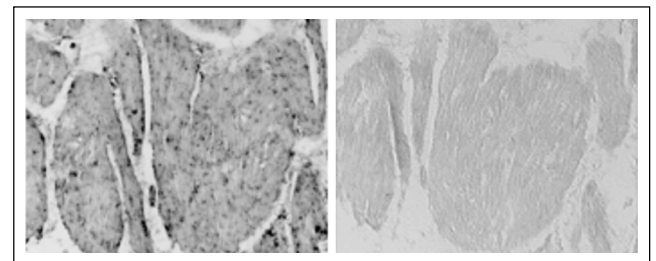


Abbildung 3: In-situ-Hybridisierung für Cx45 in der stabilen Blase: links Anti-Sense-Sonde, rechts Sense-Sonde (Negativ-Kontrolle)

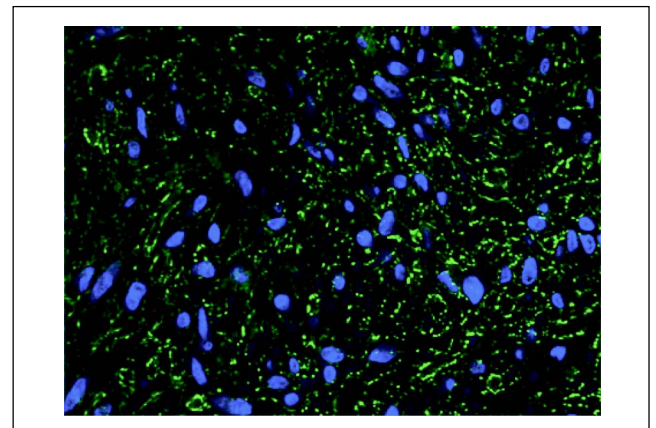


Abbildung 4: Cx45-Immunhistochemie der stabilen Harnblase. Grün: Cx45, hellblau: Zellkerne, dunkelblau: glatte Muskelzellen

zur Zeit keine Informationen zum Cx45-Protein in diesen Patienten vorhanden sind. Ergebnisse aus unseren Cx45-Studien im Detrusor obstruktiver Patienten zeigen beispielsweise, daß es bei unveränderter Cx45-RNA-Expression zu massiven Veränderungen in der intrazellulären Lokalisation des Cx45-Proteins kommen kann, welche auf eine klare Störung der Kopplung benachbarter glatter Muskelzellen schließen lassen [paper submitted]. In einer anderen Studie mit Blasenbiopsien von Patientinnen mit Urge-Beschwerden wurde gezeigt, daß die Cx45-Immunreaktion nicht signifikant von jener der Kontrollgruppe abweicht [11]. Wir sind deshalb zur Zeit dabei, mit immunhistochemischen Mitteln zusätzlich die Proteinexpression und -lokalisation von Cx45 in Patienten mit Blasenhyperaktivität zu untersuchen.

Schlußfolgerungen

Gap junctions könnten eine myogene Komponente für die Ätiologie der überaktiven Blase bilden. Die ultrastrukturelle Darstellung der Gap junctions ist schwierig. Die immunhistochemischen Resultate deuten auf eine ausgedehnte elektrische Kopplung der Harnblasenmuskulatur hin. Obwohl die quantitative Analyse der Connexin45-Expression bei stabiler überaktiver Blase keinen Unterschied zum normalen Detrusor zeigt, können wir nicht ausschließen, daß eine Störung der Gap-junction-Kommunikation zwischen glatten Muskelzellen

bei Blasenüberaktivität trotzdem eine wichtige Rolle spielen könnte.

Literatur:

1. Jonas U. Überaktive Blase (ÜAB) – aktuell. Thieme, Stuttgart, 2005.
2. Simon AM. Gap junctions: more roles and new structural data. Cell Biology 1999; 9: 169–70.
3. Falk MM. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. Eur J Cell Biol 2000; 79: 564–74.
4. Krüger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. Development 2000; 127: 4179–93.
5. Haefliger JA, Tissieres P, Tawadros T, Formenton A, Beny JL, Nicod P, Frey P, Meda P. Connexins 43 and 26 are differentially increased after rat bladder outlet obstruction. Experimental Cell Research 2002; 274: 216–25.
6. John H, Wang X, Hauri D, Maake C. Gap junctions in der menschlichen Harnblase. Aktuelle Urologie 2003; 34: 328–32.
7. John H, Wang X, Hauri D, Maake C. Evidence for gap junctions in the stable nonobstructed human urinary bladder. J Urol 2003; 169: 745–9.
8. Fry CH, Wu C, Sui GP. Electrophysiological properties of the bladder. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 1998; 9: 291–8.
9. Hanani M, Brading AF. Electrical coupling in smooth muscles. Is it universal? J Basic Clin Physiol Pharmacol 2000; 11: 321–30.
10. Elbadawi A, Yalla SV, Resnick NM. Structural basis of geriatric voiding dysfunction. III. Detrusor overactivity. J Urol 1993; 150: 1668–80.
11. Neuhaus J, Pfeiffer F, Wolburg H, Horn L-C, Dorschner W. Alterations in connexin expression in the bladder of patients with urge symptoms. BJU Int 2005; 96: 670–6.

PD Dr. med. Hubert John

Urologische Weiterbildung in Winterthur, Zürich, Boston und Syracuse, NY. Pionierarbeiten in der funktionellen Blasengrundlagenforschung, in minimal invasiven und roboterassistierten Operationstechniken und Harninkontinenztherapie. Erste vollständige Prostataentfernung wegen Prostatakrebs in der Schweiz mit der DaVinci-Technologie 2002. Verschiedene klinische und basiswissenschaftliche internationale Auszeichnungen, so der C. E. Alken-Preis 2001 und der AUA-ACMI-Preis 2002. Über 80 publizierte Originalarbeiten und über 300 wissenschaftliche Beiträge. 2002–2005 Leitender Arzt an der Urologischen Universitätsklinik Zürich. Seit September 2005 gemeinsame Leitung des Zentrums für Urologie mit Dr. J.-L. Fehr an der Klinik Hirslanden, Zürich.



Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

☒ [Bilddatenbank](#)

☒ [Artikeldatenbank](#)

☒ [Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

☒ [Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)