

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

**Die Bedeutung von Fibronectin und seiner potenziellen  
Interaktionspartner im Urin und Blasengewebe von Katzen  
mit idiopathischer Zystitis**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Gudrun Treutlein

aus Reutlingen

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Cornelia Deeg

Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

*Meinen lieben Eltern  
und Schosch*

**INHALTSVERZEICHNIS**

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>I.</b>  | <b>EINLEITUNG .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>II.</b> | <b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>   | <b>2</b>  |
| <b>1.</b>  | <b>Die feline idiopathische Zystitis .....</b>  | <b>2</b>  |
| 1.1.       | Klinisches Erscheinungsbild .....   | 2         |
| 1.2.       | Diagnostisches Vorgehen .....   | 3         |
| 1.3.       | Epidemiologie .....   | 3         |
| 1.4.       | Histologie und Pathophysiologie .....   | 4         |
| 1.5.       | Ätiologie .....   | 6         |
| 1.5.1.     | Frühe Hypothesen zur Ätiologie der unteren Harnwegserkrankungen .....                       | 6         |
| 1.5.1.1.   | Bakterielle Erreger .....   | 6         |
| 1.5.1.2.   | Virale Erreger .....  | 7         |
| 1.5.1.3.   | Vesikourachales Divertikulum .....  | 8         |
| 1.5.1.4.   | Struvitkristalle und -steine .....  | 9         |
| 1.5.2.     | Neuere Hypothesen zur Ätiologie der feline idiopathischen Zystitis .....                    | 9         |
| 1.5.2.1.   | Defekte in der protektiven Glykosaminoglykanschicht .....                                   | 9         |
| 1.5.2.2.   | Stress und psycho-neuroendokrine Abnormalitäten .....                                       | 10        |
| 1.5.2.3.   | Ereignisse in der fetalen Entwicklung .....   | 12        |
| 1.5.2.4.   | Neurogene Entzündung .....  | 12        |
| 1.5.2.5.   | Infiltration der Harnblasenwand mit Mastzellen .....  | 14        |
| 1.6.       | Die feline idiopathische Zystitis als Tiermodell der humanen interstitiellen Zystitis ..... | 15        |
| 1.6.1.     | Charakterisierung .....   | 15        |
| 1.6.2.     | Tiermodelle .....   | 15        |
| 1.7.       | Proteinmarker im Urin .....   | 18        |
| 1.7.1.     | Wachstumsfaktoren .....   | 19        |
| 1.7.2.     | Trefoil factor 2 .....  | 21        |
| 1.7.3.     | Fibronektin .....   | 23        |
| <b>2.</b>  | <b>Proteomik .....</b>  | <b>25</b> |

---

|              |                                  |            |
|--------------|----------------------------------|------------|
| 2.1.         | Massenspektrometrie.....         | 26         |
| 2.1.1.       | LC-MS/MS.....                    | 27         |
| 2.1.2.       | LTQ Orbitrap.....                | 27         |
| 2.2.         | Systembiologie.....              | 27         |
| <b>III.</b>  | <b>PUBLIKATION.....</b>          | <b>30</b>  |
| <b>IV.</b>   | <b>DISKUSSION.....</b>           | <b>43</b>  |
| <b>V.</b>    | <b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>      | <b>61</b>  |
| <b>VI.</b>   | <b>SUMMARY.....</b>              | <b>63</b>  |
| <b>VII.</b>  | <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b> | <b>65</b>  |
| <b>VIII.</b> | <b>ANHANG.....</b>               | <b>99</b>  |
| <b>IX.</b>   | <b>DANKSAGUNG.....</b>           | <b>104</b> |

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer feline Harnblase im physiologischen Zustand und mit idiopathischer Zystitis .....</i> | <i>5</i>  |
| <i>Abb. 2: Hunner's ulcer beim Menschen .....</i>  | <i>6</i>  |
| <i>Abb. 3: Hypothese der neurogenen Entzündung.....</i>  | <i>14</i> |
| <i>Abb. 4: Endoskopische Aufnahme einer humanen Harnblase im physiologischen Zustand und mit interstitieller Zystitis .....</i>          | <i>17</i> |
| <i>Abb. 5: Endoskopische Aufnahme einer feline Harnblase im physiologischen Zustand und mit idiopathischer Zystitis .....</i>            | <i>18</i> |

**TABELLENVERZEICHNIS**

|  |            |
|--|------------|
| <i>Tab. 1: Patientendaten.....</i>   | <i>99</i>  |
| <i>Tab. 2: Urin- und Proteinanalyse.....</i>   | <i>100</i> |
| <i>Tab. 3: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten des Komplement<br/>C4a im Western Blot .....</i>                           | <i>101</i> |
| <i>Tab. 4: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten des Galektin-7 im<br/>Western Blot.....</i>                                | <i>101</i> |
| <i>Tab. 5: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten des Intestinalen<br/>Fettsäure-bindenden Proteins im Western Blot.....</i> | <i>102</i> |
| <i>Tab. 6: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten des Thioredoxins im<br/>Western Blot.....</i>                              | <i>102</i> |
| <i>Tab. 7: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten des Nuclear factor-<br/>kappa B p65 im Western Blot.....</i>               | <i>103</i> |
| <i>Tab. 8: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten der p38 Mitogen-<br/>aktivierten Proteinkinase im Western Blot.....</i>    | <i>103</i> |

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

|                |   |
|----------------|---|
| Abb.           | Abbildung   |
| ACTH           | Adreno-corticotropes Hormon   |
| APF            | Antiproliferative factor (Antiproliferativer Faktor)  |
| ASK-1          | Apoptosis signal-regulating kinase-1 (Apoptosesignal-regulierende Kinase 1)   |
| ATP            | Adenosintriphosphat   |
| C4a            | Complement component 4a (Komplement-Komponente 4a)  |
| EGF            | Epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)   |
| ELISA          | Enzyme-linked Immunosorbent Assay   |
| EZM            | Extrazellulärmatrix   |
| FCV            | Felines Calicivirus   |
| FIC            | Feline idiopathic cystitis (feline idiopathische Zystitis)  |
| FFV            | Felines foamy- (syncytium-forming) Virus  |
| FLUTD          | Feline lower urinary tract disease (Erkrankung des unteren Harntrakts bei Katzen)   |
| FUS            | Feline urologic syndrome (felines urologisches Syndrom)   |
| GAG            | Glykosaminoglykan   |
| GIT            | Gastrointestinaltrakt   |
| HB-EGF         | Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (Heparin-bindender, dem epidermalen Wachstumsfaktor-ähnlicher Wachstumsfaktor) |
| IC             | Interstitial cystitis (interstitielle Zystitis)   |
| I-FABP         | Fatty acid-binding protein, intestinal (Intestinales Fettsäure-bindendes Protein)   |
| I $\kappa$ B   | Inhibitor of kappa B (Inhibitorisches Kappa B Protein)  |
| IL-1 $\beta$   | Interleukin-1-beta  |
| kDa            | Kilodalton  |
| LC-MS/MS       | Liquid chromatography tandem mass spectrometry (Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie)                                   |
| MALDI          | Matrix-assisted laser desorption/ionisation (Matrix-assistierte-Laser-Desorption/Ionisation)  |
| MAPK           | Mitogen-aktivierte-Proteinkinase  |
| mRNA           | Messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)   |
| <i>m/z</i>     | Masse-zu-Ladungs-Verhältnis   |
| NADPH          | Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase  |
| NF- $\kappa$ B | Nuclear factor-kappa B (Nukleärer Faktor-Kappa B)   |
| PBS            | Painful bladder syndrom (schmerzhaftes Harnblasensyndrom)   |
| NO             | Nitric oxid (Stickstoffmonoxid)   |
| SPF            | Specific-pathogen-free (spezifisch pathogenfrei)  |

---

|               |   |
|---------------|---|
| Tab.          | Tabelle   |
| TFF2          | Trefoil factor 2  |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor-alpha  |
| TrxR1         | Thioredoxin-Reduktase 1   |
| Txnip         | Thioredoxin-interacting protein (Thioredoxin-interagierendes Protein) |
| UEE           | Unusual external events (ungewöhnliche Ereignisse in der Umwelt)      |
| UGT           | Urogenitaltrakt   |
| USA           | United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)             |

## I. EINLEITUNG

Die feline idiopathische Zystitis (FIC) ist eine spontan auftretende, sterile Entzündung der unteren Harnwege bei Katzen (BUFFINGTON et al., 1996b). Sie zählt zum Symptomkomplex der unteren Harnwegserkrankungen bei Katzen (feline lower urinary tract disease, FLUTD) und ist die am häufigsten vorkommende Ursache, gefolgt von Urolithiasis, bakteriellen Harnwegsinfektionen und Neoplasien der Harnwege (BUFFINGTON et al., 1997a; LEKCHAROENSUK et al., 2001; GERBER et al., 2005; SAEVIK et al., 2011). Die Ätiologie der FIC ist bislang ungeklärt; es existieren jedoch verschiedene Hypothesen über ätiologische Einflüsse, wie zum Beispiel Defekte in der Glykosaminoglykanschicht (BUFFINGTON et al., 1996a), eine hyperaktive Stressantwort (WESTROPP et al., 2006), und eine neurogene Entzündung (BUFFINGTON et al., 1996b). Die FIC ähnelt aufgrund ihres klinischen Erscheinungsbildes, ihres rezidivierenden Charakters und ihrer ungeklärten Ätiologie der interstitiellen Zystitis (IC) beim Menschen (BUTRICK, 2003; DASGUPTA & TINCELLO, 2009) und kann daher als wichtigstes Tiermodell für die IC beim Menschen angesehen werden (WESTROPP & BUFFINGTON, 2002). Aufgrund der noch ungeklärten Ätiologie existiert derzeit keine kausal wirksame Therapie (KRUGER et al., 2009). Der häufig rezidivierende Krankheitsverlauf stellt für die Katzen und die Besitzer eine große Belastung dar und führt sogar dazu, dass junge Katzen letztendlich euthanasiert werden (PATRONEK et al., 1996). Deswegen ist es von großer Bedeutung, die ätiologischen Hintergründe und beteiligten Pathomechanismen zu erforschen. Bei der Beurteilung charakteristischer Proteine im Urin von Katzen mit FIC wies das hochmolekulare Glykoprotein Fibronectin bei Katzen mit FIC im Urin und Blasengewebe eine unterschiedliche Konzentration im Vergleich zu den gesunden Kontrollen auf (LEMBERGER et al., 2011a). Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung eines potenziellen Interaktionsnetzwerks von Fibronectin. Dafür wurden Methoden aus dem Gebiet der Proteomik eingesetzt, um auf Protein-Ebene eine neue Basis für funktionelle und systembiologische Analysen zu schaffen und um das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen sowohl der FIC, als auch der IC zu verbessern.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Die feline idiopathische Zystitis**

Bei 51 – 69 % der Katzen mit Erkrankungen der unteren Harnwege (FLUTD) ist die feline idiopathische Zystitis (FIC) für die klinischen Symptome verantwortlich. Sie ist damit die häufigste Ursache unterer Harnwegserkrankungen der domestizierten Katze (BUFFINGTON et al., 1997a; LEKCHAROENSUK et al., 2001; GERBER et al., 2005; SAEVIK et al., 2011). Die FIC ist eine spontan auftretende, sterile Entzündung der unteren Harnwege, deren ätiologischer Hintergrund trotz intensiver Bemühungen bis heute nicht aufgeklärt werden konnte (BUFFINGTON et al., 1996b; KRUGER et al., 2009). Die Diagnose wird häufig nur als Ausschlussdiagnose gestellt, und es ist bislang nicht gelungen, eine effektive Therapie zu entwickeln (KRUGER et al., 2009).

#### **1.1. Klinisches Erscheinungsbild**

Das klinische Bild der FIC ist gekennzeichnet durch eine Entzündung der unteren Harnwege, die typischerweise einhergeht mit Dysurie, Strangurie, Pollakisurie, Periurie oder Hämaturie. Diese Symptome können einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen auftreten. Des Weiteren zeigen die betroffenen Katzen aufgrund der starken Schmerzen beim Urinabsatz häufig Lautäußerungen und Aggressionsverhalten (GUNN-MOORE, 2003). Man unterscheidet eine nicht-obstruktive von einer obstruktiven Form, wobei erstere in 92 % der Fälle innerhalb von fünf bis sieben Tagen selbstlimitierend verläuft (KRUGER & OSBORNE, 1993; OSBORNE et al., 1996a; KRAIJER et al., 2003). Bei 39 – 65 % der Katzen treten innerhalb von ein bis zwei Jahren im Anschluss an die initiale akute Episode Rezidive auf (KRUGER et al., 2003; GUNN-MOORE & SHENOY, 2004). Persistieren die klinischen Symptome bei den betroffenen Katzen für Wochen bis Monate, spricht man von einer chronischen FIC (CHEW et al., 1998; KRUGER et al., 2009).

Von der obstruktiven Form der FIC sind aufgrund der längeren und engeren Urethra vor allem männliche Tiere betroffen (WESTROPP et al., 2005). Die Ursache der Obstruktion bei der FIC ist nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass Urethritiden und Spasmen des urethralen Muskels bei der

Entstehung eine Rolle spielen (GERBER et al., 2005; WESTROPP et al., 2005; DEFAUW et al., 2011). Infolge der fehlenden Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen über den Urin bei der obstruktiven Form der FIC, entwickeln die Katzen in vielen Fällen eine Azotämie und Elektrolytverschiebungen, die je nach Dauer der Obstruktion mild bis hochgradig ausfallen und zu einem lebensbedrohlichen Zustand führen können (GERBER et al., 2008).

Typische labordiagnostische Befunde bei der Urinuntersuchung von Katzen mit FIC sind Hämaturie, Pyurie und Proteinurie, die in unterschiedlicher Ausprägung gefunden werden (WESTROPP et al., 2005). Das urinspezifische Gewicht ist in den meisten Fällen erhöht, im Urinsediment sind keine Kristalle zu sehen und bakteriologische Harnkulturen sind negativ (WESTROPP et al., 2005).

### **1.2. Diagnostisches Vorgehen**

Die intensiven Bemühungen der Wissenschaft, einen geeigneten Krankheitsmarker für die untere Harnwegssymptomatik bei Menschen und Katzen zu finden, schlugen bislang fehl (KRUGER et al., 2009). Aus diesem Grund wird die Diagnose der FIC häufig nur mittels Ausschluss anderer Erkrankungen der unteren Harnwege gestellt (BUFFINGTON et al., 1999b). Hierbei sind eine vollständige Urinanalyse mit mikroskopischer Beurteilung des Urinsediments und bakteriologischer Urinkultur notwendig, um eine bakterielle Harnwegsinfektion auszuschließen. Röntgenbilder des Abdomens und die abdominale Sonographie dienen dem Ausschluss von Harnsteinen und strukturellen Veränderungen des Harntraktes (WESTROPP et al., 2005). Als letzte Möglichkeit kann eine Zystoskopie durch den Nachweis typischer Schleimhautläsionen sowie Einblutungen die definitive Diagnose erbringen (WESTROPP et al., 2005).

### **1.3. Epidemiologie**

Erkrankungen der unteren Harnwege sind bei domestizierten Katzen weltweit verbreitet. In einer Studie in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) machten die Erkrankungen der unteren Harnwege einen Anteil von ungefähr 1,3 – 1,7 % aller Katzen aus, die beim Tierarzt vorgestellt wurden (LUND et al., 1999). Eine Studie an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München in Deutschland ergab eine Prävalenz von 5,7 % der in der Klinik vorgestellten Katzen (SCHMID et al., 2009). Die FIC ist mit 55 – 69 % die häufigste Ursache der unteren Harnwegserkrankungen (BUFFINGTON et al.,

1997a; LEKCHAROENSUK et al., 2001; GERBER et al., 2005; SAEVIK et al., 2011). FLUTD tritt in jedem Alter auf, wird aber häufiger bei Katzen im Alter von zwei bis sechs Jahren beobachtet (WESTROPP et al., 2005). Eine erhöhte Prävalenz für bestimmte Rassen wurde bisher nicht festgestellt, ebenso wenig ein Unterschied in der Geschlechterverteilung (DEFAUW et al., 2011).

#### **1.4. Histologie und Pathophysiologie**

Die Harnblase ist ein muskuläres Hohlorgan, das innen von Übergangsepithel (Urothel) ausgekleidet ist und je nach Füllungszustand nur zwei bis drei oder bis zu 14 Zellschichten aufweist. Das Epithel, bestehend aus den apikalen Schirmzellen (umbrella cells), den darunterliegenden Intermediärzellen und den tiefen Basalzellen, dient dem darunterliegenden Gewebe als Schutzschicht gegen den hypertonen Harn (LIEBICH, 2004). Besondere Barrieremechanismen der Oberflächenmembran spielen dabei eine bedeutende Rolle. Sie erhöhen den transepithelialen Widerstand und verhindern damit ein Übertreten der Harnkomponenten in die Blasenwand und das periphere Blut (LAVELLE et al., 2000). Die Barriere wird aus der Apikalmembran und den tight junctions der obersten Zellschicht, den Schirmzellen, gebildet (HICKS, 1966; NEGRETE et al., 1996; LAVELLE et al., 1998). Auf den Schirmzellen befinden sich sogenannte Uroplakine, subapikale Vesikel, die bei zunehmender Harnblasendehnung in die Zellmembran eingebaut werden und damit die enorme Dehnbarkeit der Blasenwand erklären (HICKS, 1966; CHANG et al., 1994).

Bei der FIC kommt es zu histologischen Veränderungen, die im Allgemeinen unspezifisch sind und sowohl ein intaktes als auch ein beschädigtes Urothel beinhalten können (WESTROPP et al., 2005). Eine Schädigung des Urothels geht mit subepithelialen Ödemen und dilatierten Blutgefäßen, intramukösen petechialen Blutungen (Glomerulationen) und einer bisweilen verstärkten Mastzellinfiltration in der Submukosa einher (WESTROPP et al., 2005). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten einen großflächigen Verlust von Schirmzellen, Risse im Urothel und eine verminderte Integrität der tight junctions, die zu einem Freiliegen der unteren Epithelschichten führt (LAVELLE et al., 2000) (Abb. 1).

Sowohl bei der humanen IC als auch bei der FIC unterscheidet man die nicht ulzerative von der ulzerativen Form (Hunner's ulcers). Obwohl bei Katzen mit

FIC in den meisten Fällen die nicht ulzerative Form vorliegt, ist dennoch ein Fall beschrieben, bei dem tiefe Ulzerationen im Epithel sichtbar waren (CLASPER, 1990) (Abb. 2). Diese Ulzerationen können so weit in die Tiefe reichen, dass das darunterliegende Binde- und Stützgewebe freiliegt (LAVELLE et al., 2000). Aufgrund der Läsionen in der Blasenwand, kommt es zu einer Verringerung des transepithelialen Widerstandes und demzufolge auch zu einer erhöhten Permeabilität für Harnstoff und Elektrolyte (LAVELLE et al., 2000). Dieser Übertritt der reizenden Harnsubstanzen in das subepitheliale Gewebe führt in der Folge wiederum zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und einer weiteren Schädigung des Blasengewebes (LAVELLE et al., 2000).

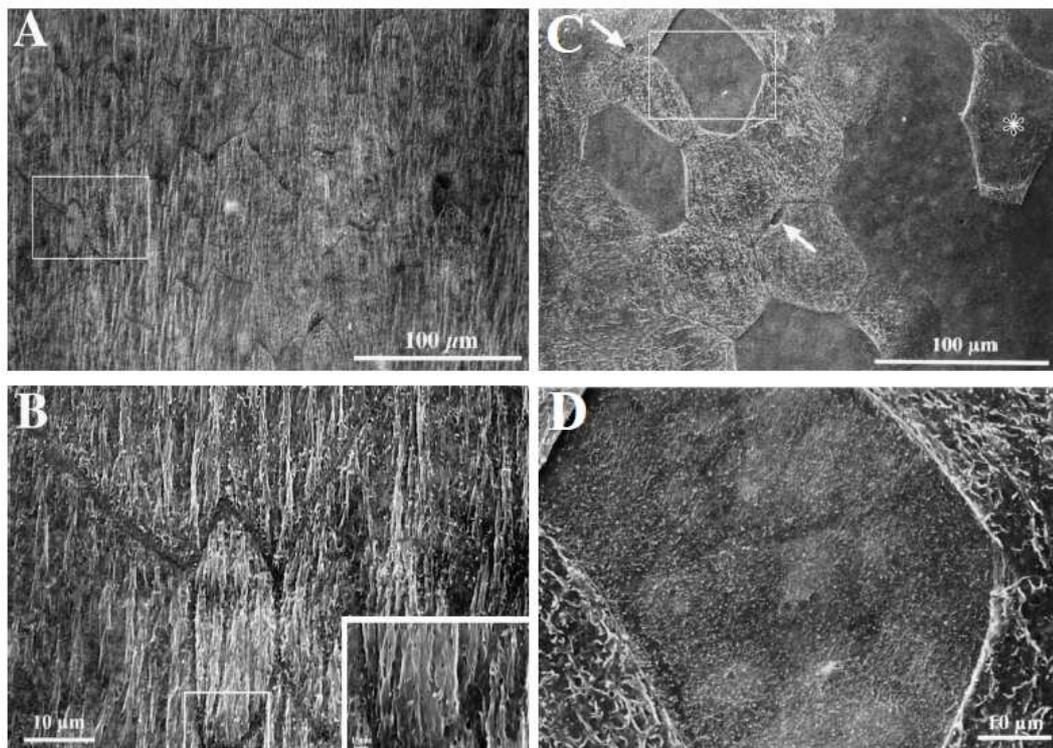
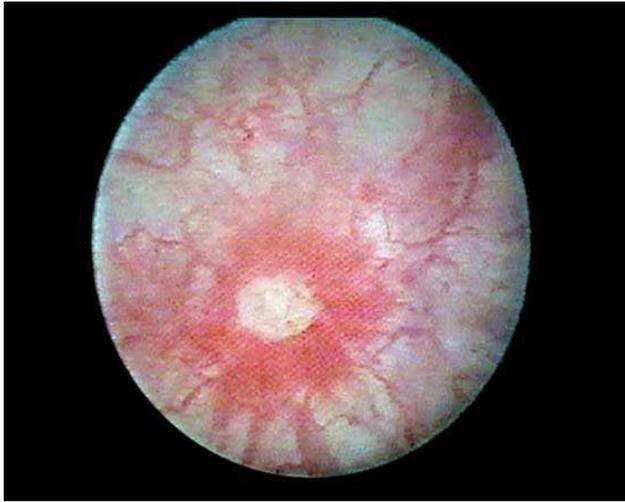


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer feline Harnblase im physiologischen Zustand und mit idiopathischer Zystitis

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Harnblase einer gesunden Katze (A, B) und einer Harnblase einer Katze mit idiopathischer Zystitis (FIC) (C, D) (modifizierte Abbildung nach LAVELLE et al., 2000). A) Übersichtsaufnahme des physiologischen feline Urothels mit Vergrößerungskästchen (siehe B). B) Vergrößerung des markierten Bereiches in A mit Darstellung der physiologischen Struktur des Urothels mit seinen Schirmzellen. C) Übersichtsaufnahme des verletzten Urothels von einer Katze mit idiopathischer Zystitis mit Vergrößerungskästchen (siehe D). Die Pfeile weisen auf fehlende Zell-Zell-Interaktionen zwischen benachbarten Schirmzellen. D) Vergrößerung des markierten Bereiches in C mit Darstellung der fehlenden Schirmzelle.



*Abb. 2: Hunner's ulcer beim Menschen*

*Endoskopische Aufnahme der Harnblase eines Patienten mit ulzerativer interstitieller Zystitis. In der Mitte ist das charakteristische Bild eines Hunner's ulcer zu sehen (nach PERSU et al., 2010).*

## **1.5. Ätiologie**

Trotz eines erheblichen Wissenszuwachses in Bezug auf die Pathogenese der FIC konnte bis heute keine der aufgestellten Hypothesen eindeutig bewiesen werden. Im Laufe der Jahre haben wissenschaftliche Studien zunächst die ätiologischen Hintergründe der FLUTD näher charakterisiert und schließlich Hypothesen zu möglichen Ursachen der FIC aufgestellt, die nachfolgend näher erläutert werden (BUFFINGTON et al., 1996a; BUFFINGTON et al., 1996b; WESTROPP et al., 2006; BUFFINGTON, 2009).

### **1.5.1. Frühe Hypothesen zur Ätiologie der unteren Harnwegserkrankungen**

Zu Beginn der Forschung über Zystitiden bei der Katze dienten die Begriffe FLUTD und „feline urologic syndrom“ (FUS) als geeignete Bezeichnung für die untere Harnwegssymptomatik bei Katzen, ermöglichten jedoch keine Unterscheidung auf ätiologischer Ebene (WESTROPP et al., 2005). Der Begriff der idiopathischen Zystitis war noch nicht etabliert und die Suche nach dem Ursprung für das klinische Erscheinungsbild führte zu verschiedenen Hypothesen (KRUGER et al., 2009).

#### **1.5.1.1. Bakterielle Erreger**

Die Tatsache, dass bakterielle Harnwegsinfektionen die häufigste Ursache von Erkrankungen des unteren Harntrakts bei Hunden darstellten, und dass Katzen mit klinischer Symptomatik häufig im Verlauf einer Therapie mit Antibiotika eine klinische Besserung zeigten, machte die Infektion mit Bakterien zur vorherrschenden Theorie als Ursache für FLUTD in den 60er und 70er Jahren

(KRUGER et al., 2009). Zusätzlich wurde diese Theorie durch die fälschliche Identifizierung und Interpretation von Strukturen, die Bakterien morphologisch ähnelten, sogenannten „Pseudobakterien“, als bakterielle Pathogene im ungefärbten Urinsediment gestützt (KRUGER et al., 2009). In einer späteren Studie stellte sich jedoch ein mikroskopisch „positives“ Ergebnis bei mehr als 40 % der ungefärbten Urinsedimente in der bakteriellen Kultur als negativ heraus (SWENSON et al., 2004). Zusätzlich führte die Beobachtung, dass die Abwehrmechanismen der Harnblase bei Katzen eine angeborene Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen ermöglichen, zu der Annahme, dass die betroffenen Katzen statt der angenommenen bakteriellen Harnwegsinfektion an der selbstlimitierenden Form der FIC litten (LEES, 1984; KRUGER et al., 2009). Mit diesen Erkenntnissen wurde die Theorie einer bakteriellen Ätiologie zunächst in den Hintergrund gedrängt.

Epidemiologische Studien der vergangenen Jahre führten zu unterschiedlichen Angaben bezüglich des Anteils der Katzen mit bakteriellen Harnwegsinfektionen an den Katzen mit FLUTD. Der Anteil an bakteriellen Infektionen wird mit weniger als 3 % (KRUGER et al., 1991), 8 % (GERBER et al., 2005) und 11,8 % (SAEVIK et al., 2011) bis hin zu 28 % (LEKCHAROENSUK et al., 2001) angegeben.

### **1.5.1.2. Virale Erreger**

Die Isolierung von Viren aus dem Urin und Blasengewebe von Katzen mit FLUTD warf die Möglichkeit einer viralen Ursache auf (FABRICANT, 1977, 1984; KRUGER & OSBORNE, 1990). So wurde das feline Calicivirus (FCV) im Urin einer Katze mit Harnröhrenobstruktion entdeckt (RICH & FABRICANT, 1969). Die Inokulation dieses Virus in die Harnblase führte bei einer von zwei Katzen zu einer obstruktiven Uropathie (RICH et al., 1971). Dabei gelang es jedoch nicht, das Virus zu reisolieren (FABRICANT, 1984). Auch waren keine neutralisierenden Antikörper im Serum dieser Katzen nachweisbar (FABRICANT, 1984). Die Isolierung eines weiteren Virus, dem feline foamy- (syncytium-forming) Retrovirus (FFV), bei allen experimentell obstruierten Katzen legte den Verdacht nahe, dass FCV nicht der primär verantwortliche Erreger ist (FABRICANT, 1984). Aber auch FFV ist als auslösende Ursache umstritten, da Antikörper gegen FFV auch bei einem Großteil der gesunden Katzen gefunden wurden (PEDERSEN et al., 1980). Eine neuere Studie konnte

bei 6 % der Katzen mit FIC FCV im Harn nachweisen (LARSON et al., 2011). Katzen mit FIC hatten ebenso wie Katzen mit Katzenschnupfensymptomatik signifikant höhere Antikörpertiter gegen FCV im Vergleich zu gesunden Katzen (LARSON et al., 2011). Dies deutet auf eine vermehrte FCV-Exposition bei Katzen mit FIC hin (LARSON et al., 2011). Ein ätiologischer Zusammenhang zwischen einer FCV Infektion und der FIC bleibt jedoch weiterhin als unwahrscheinlich anzusehen (LARSON et al., 2011).

Ein weiteres Virus, das  $\gamma$ -Herpesvirus (bovines Herpesvirus 4), konnte in einer experimentellen Studie eine Harnwegsobstruktion bei Katzen hervorrufen (FABRICANT, 1977, 1984). Allerdings konnten KRUGER und Mitarbeiter (1990) diese Ergebnisse nicht reproduzieren. Bei der Inokulation von BHV-4 in die Harnblasen von spezifisch pathogenfreien Katzen (specific-pathogen-free, SPF) und Kontrollkatzen, entwickelte lediglich eine BHV-4 exponierte Katze klinische Symptome einer unteren Harnwegserkrankung (KRUGER et al., 1990). KRUGER und Mitarbeiter (1991) untersuchten weiterhin die Seren von Katzen mit FLUTD und die Seren gesunder Katzen auf Antikörpertiter gegen BHV-4. Ein signifikanter Unterschied der Antikörpertiter zwischen den beiden Gruppen war nicht erkennbar (KRUGER et al., 1991). Ebenso ergab sich keine Korrelation zwischen positiven Testergebnissen und einer klinischen Symptomatik (KRUGER et al., 1991). Dies führte zu dem Schluss, dass keines der Viren ein primäres Pathogen darstellt (KRUGER et al., 2009).

### **1.5.1.3. Vesikourachales Divertikulum**

Eine weitere Hypothese war, dass vesikourachale Divertikula, eine kongenitale Anomalie der Harnblase, eine ätiopathogenetische Rolle bei Katzen mit unterer Harnwegssymptomatik spielen könnten (HANSEN, 1977). Diese entstehen durch den unvollständigen Verschluss des am Harnblasenscheitel gelegenen Urachusanteiles (OSBORNE et al., 1989). In den frühen 90er Jahren wurde die chirurgische Exzision dieser Divertikel vorgeschlagen (OSBORNE et al., 1989). Ergebnisse klinischer Studien machten jedoch deutlich, dass sich die Divertikel typischerweise spontan innerhalb von zwei bis drei Wochen nach dem Sistieren von Krankheitssymptomen der unteren Harnwege zurückbildeten und nicht wieder in Erscheinung traten, weshalb eine Divertikelektomie demnach für nicht nötig empfunden wurde (OSBORNE et al., 1989). Aus diesem Grund ging man davon aus, dass mit klinischer Symptomatik assoziierte vesikourachale Divertikel

nicht die Ursache, sondern eher die Folge feliner Zystitiden darstellen (OSBORNE et al., 1987; OSBORNE et al., 1989).

#### **1.5.1.4. Struvitkristalle und -steine**

In den 80er und 90er Jahren, nachdem Bakterien und Viren als postulierte Ursache der FLUTD an Popularität verloren hatten, war der generelle Konsens vieler Forscher und Kliniker, dass Struvitkristalle und Struvitsteine eine Hauptursache für die Entstehung der FLUTD sind (OSBORNE et al., 1999). Dabei ergaben Studien, dass Trockenfutter mit hohem Magnesiumgehalt und solche, die zu einem alkalisierenden Urin-pH führten, zu einer Bildung der Kristalle und Steine beitrugen (FINCO et al., 1985; OSBORNE et al., 1990; OSBORNE et al., 1996b). Daraufhin entwickelte die Futtermittelindustrie Diäten, die der Bildung von Struvitsteinen vorbeugen sollte, was letztendlich dazu führte, dass Katzen vermehrt Kalziumoxalatsteine entwickelten (KRUGER et al., 2009). Die Tatsache, dass nach wie vor bei mehr als 50 % der Katzen mit FLUTD keine Kristallurie beobachtet werden kann, lässt jedoch darauf schließen, dass andere Faktoren an der Entstehung beteiligt sein müssen (KRUGER et al., 1991; BUFFINGTON et al., 1997a; KRUGER et al., 2003; GERBER et al., 2005).

#### **1.5.2. Neuere Hypothesen zur Ätiologie der felinen idiopathischen Zystitis**

Da bei der Mehrheit der Katzen mit unterer Harnwegssymptomatik keine zugrundeliegende Ursache gefunden werden konnte, wurde für dieses Krankheitsbild ohne erkennbare Ätiologie der Begriff der „felinen idiopathischen Zystitis“ eingeführt (WESTROPP et al., 2005). Seither wurden weltweit zahlreiche Studien durchgeführt, um die Pathomechanismen dieser Form der sterilen Zystitis zu erforschen.

##### **1.5.2.1. Defekte in der protektiven Glykosaminoglykanschicht**

Die luminale Oberfläche des unteren Harntrakts wird von der Glykosaminoglykanschicht (GAG-Schicht) ausgekleidet (LEWIS, 2000). Sie verhindert die Adhärenz von Mikroorganismen und Kristallen an das Urothel und den Übertritt von Harnsubstanzen in das umgebende Blasengewebe (HURST et al., 2007; PARSONS, 2007). Eine Vielfalt an Veränderungen in der Quantität und Qualität dieser Schicht wurde in humanmedizinischen Studien als Ursache für die Entstehung der IC postuliert (HURST et al., 1993; WEI et al., 2000; HAUSER et al., 2008). Auch bei der FIC konnten eine erhöhte Permeabilität für bestimmte

Harnsubstanzen, eine verminderte Konzentration an GAG im Urin von Katzen mit FIC im Vergleich zu gesunden Kontrollkatzen und eine erniedrigte Expression von GAG an der Oberfläche nachgewiesen werden (BUFFINGTON et al., 1996a; LAVELLE et al., 2000; PEREIRA et al., 2004). Die meisten Studien zu GAG im Urin sind allerdings limitiert durch die nicht leicht durchführbaren analytischen Tests und die Vielfalt der verwendeten Methoden, so dass die Rolle der GAG-Schicht in der Entstehung der Krankheit nach wie vor unklar ist (LIEBERT, 2009). Eine kürzlich erschienene Studie konnte jedoch signifikant niedrigere GAG-Konzentrationen im Plasma von Katzen mit FIC im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren nachweisen (PANCHAPHANPONG et al., 2011).

#### **1.5.2.2. Stress und psycho-neuroendokrine Abnormalitäten**

Eine weitere wichtige Hypothese postuliert multiple Veränderungen im autonomen Nervensystem und im endokrinen System. Solche Veränderungen wurden in mehreren Studien nachgewiesen (BUFFINGTON & RECHE JUNIOR, 1998; BUFFINGTON & PACAK, 2001; BUFFINGTON, 2002; WESTROPP et al., 2003). Dabei wird angenommen, dass der Einfluss von Stress auf den Körper als Stimulus für die Entstehung dieser Veränderungen dient (BUFFINGTON, 2011). Des Weiteren wurde festgestellt, dass Katzen häufiger an FIC erkranken, wenn sie Stress ausgesetzt sind, wie zum Beispiel reine Wohnungskatzen oder Katzen in Mehrkatzenhaushalten mit sozialen Konflikten (JONES et al., 1997; CAMERON et al., 2004; BUFFINGTON et al., 2006).

Bei an FIC erkrankten Katzen konnte eine erhöhte Aktivität der Tyrosinhydroxylase im Locus coeruleus und im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus festgestellt werden (BUFFINGTON & RECHE JUNIOR, 1998). Ebenso wurde im Blasengewebe von Patienten mit FIC ein erhöhter Gehalt an Neuronen mit Tyrosinhydroxylaseaktivität im Muskelgewebe und Urothel gefunden (BUFFINGTON et al., 2002). Dieses Enzym katalysiert die Katecholaminsynthese (BUFFINGTON et al., 2002). Bei einer gesteigerten Aktivität des Enzyms werden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin vermehrt exprimiert (BUFFINGTON et al., 2002). Weiterhin wurde eine erhöhte Katecholaminkonzentration im Plasma bei Katzen mit FIC im Vergleich zu gesunden Kontrollkatzen nachgewiesen (BUFFINGTON & PACAK, 2001; WESTROPP et al., 2006). Eine weitere Beobachtung in diesem Zusammenhang war die verminderte funktionelle Sensitivität von  $\alpha$ -2-adrenergen Rezeptoren

sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei an FIC erkrankten Katzen (BUFFINGTON et al., 2002; WESTROPP et al., 2007). Die Neurone im Locus coeruleus sind in Ruhephasen wenig aktiv; bei Aufregung kommt es jedoch zu einer starken Reizung dieser Neurone und zur Freisetzung von Noradrenalin (WESTROPP et al., 2007). In diesem Szenario sind  $\alpha$ -2-adrenerge Rezeptoren wichtig für eine Modulation dieser zentralen Noradrenalinfreisetzung (WESTROPP et al., 2007).

Im Rückenmark bewirkt eine Aktivierung dieser Rezeptoren eine verminderte Weiterleitung nozizeptiver Signale an das Gehirn (WESTROPP et al., 2007). Man nimmt an, dass es über die erhöhten Plasma-Katecholaminkonzentrationen zu einer Überstimulation der  $\alpha$ -2-adrenergen Rezeptoren und zu einer Downregulation derselben kommt, wodurch der modulierende Einfluss auf die zentrale Katecholaminsynthese beeinträchtigt wird (WESTROPP et al., 2007). Betroffene Tiere stehen demnach unter dem ständigen Einfluss des sympathischen Nervensystems und leiden somit an einer hyperaktiven Stressantwort (BUFFINGTON & RECHE JUNIOR, 1998).

Eine andere Studie ergab eine signifikant erniedrigte Konzentration an Nebennierenrindenhormonen als Antwort auf die Stimulation mit dem Adrenocorticotropen Hormon (ACTH) und verkleinerte Nebennieren bei Katzen mit FIC im Vergleich zu gesunden Kontrollen (WESTROPP et al., 2003). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang unklar. Man geht davon aus, dass die Antwort des sympathischen Nervensystems auf Stress von der Antwort der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse entkoppelt ist (WESTROPP et al., 2003; BUFFINGTON, 2004; WESTROPP et al., 2006). So wird vermutet, dass die erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems und die inadäquate Nebennierenrindenantwort bei der Pathophysiologie der Erkrankung eine Rolle spielen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie geht auf den Vergleich von sogenannten „Sickness behaviours“ als Antwort auf „unusual external events“ (UEE), also ungewöhnlichen Ereignisse in der Umwelt bei Katzen mit FIC und gesunden Kontrollkatzen ein (STELLA et al., 2011). „Sickness behaviours“ sind bestimmte Reaktionen des Körpers, den Gastrointestinaltrakt (GIT), den Urogenitaltrakt (UGT), die Haut und das Verhalten betreffend, wie zum Beispiel Vomitus, Diarrhöe, Anorexie, Dysurie, oder Periurie, die durch den Einfluss von Stress aufgrund ungewöhnlicher Ereignisse in der Umwelt hervorgerufen werden (STELLA et al., 2011). Dabei

zeigte sich ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von FLUTD durch die Exposition der Katzen mit UEE, weswegen die Autoren die Möglichkeit einer Exposition mit UEE bei Katzen mit Symptomen des unteren Harntrakts in Betracht ziehen (STELLA et al., 2011). Es gibt erste Studien zur Identifizierung von Signaltransduktionswegen, durch die über Stress im Körper zelluläre Dysfunktionen ausgelöst werden (BUFFINGTON, 2011). In einer Studie wurde eine Induktion des Transkriptionsfaktors Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) in peripheren mononukleären Blutzellen nachgewiesen (BIERHAUS et al., 2003). Es wird vermutet, dass die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors ein weiteres Glied in der Kette darstellt, mit der die Antwort des Körpers auf Stress auf die zelluläre Ebene übertragen wird (BIERHAUS et al., 2003).

### **1.5.2.3. Ereignisse in der fetalen Entwicklung**

Das Wissen über eine verstärkte Aktivität des sympathischen Nervensystems im Zusammenhang mit einer verminderten Stimulierbarkeit der Nebennierenrinden und morphologisch kleineren Nebennieren lassen eine genetische oder familiäre Prädisposition, Entwicklungsfehler oder eine Kombination dieser Faktoren bei der Entstehung der FIC vermuten (BUFFINGTON, 2004, 2009). Dabei wird davon ausgegangen, dass widrige Lebensumstände des trächtigen Muttertieres den Verlauf der fetalen Entwicklung beeinflussen (MATTHEWS, 2002). Diese Hypothese geht davon aus, dass es bei den betroffenen Individuen bereits während der fetalen Entwicklung zu einer epigenetischen Modulation der Genexpression und nach der Geburt zu einer intensivierten Stressantwort kommt (BUFFINGTON, 2009). Sie wird unterstützt von mehreren Studien an Ratten und Mäusen, bei denen ebenfalls ein Einfluss von Ereignissen in der frühen Entwicklung auf das spätere Leben nachgewiesen werden konnte (CARD et al., 2005; HOLMES et al., 2005; WEAVER et al., 2005; RANDICH et al., 2006; BARREAU et al., 2007)

### **1.5.2.4. Neurogene Entzündung**

Die Zellen des Urothels besitzen, ähnlich wie nozizeptive und mechanosensitive Neurone, spezielle sensorische und Signal-gebende Eigenschaften, die es ihnen erlauben, auf ihre Umwelt zu reagieren und mit benachbarten Urothel- und Nervenzellen zu kommunizieren (BIRDER et al., 2010). Das Urothel agiert also durch die Expression von Rezeptoren und Ionenkanälen, die eine Reaktion auf

thermale, mechanische und chemische Stimuli ermöglichen, sowohl als „Sensor“, als auch als „Transducer“, in dem es Substanzen ausschüttet und damit die Informationen auf benachbarte Strukturen überträgt (BIRDER et al., 2010). Durch einen pathologischen Stimulus kommt es nun zu einer vermehrten Freisetzung von Neurotransmittern aus dem Urothel, wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO) und Adenosintriphosphat (ATP), die in der Folge die Integrität des Urothels beeinflussen und zusätzlich lokale sensorische afferente Neurone, sogenannte nozizeptive C-Fasern aktivieren (BIRDER et al., 2003; BIRDER et al., 2005). Diese C-Fasern übertragen zum einen Aktionspotentiale an das zentrale Nervensystem, die vom Gehirn als Schmerz wahrgenommen werden und lösen zum anderen einen lokalen Reflex aus, der zu einer Freisetzung von Neuropeptiden, zum Beispiel der Substanz P, Neurokinin und anderen, führt (WESTROPP et al., 2005; BIRDER et al., 2010). Diese Neuropeptide bewirken eine Vasodilatation, eine erhöhte Gefäß- und Gewebspermeabilität, Ödeme der Submukosa, Spasmen der glatten Muskulatur und eine Mastzelldegranulierung und damit das Bild der neurogenen Entzündung (GUNN-MOORE, 2003) (Abb. 3). Als Folge davon erlauben diese strukturellen oder funktionellen Defekte in der Harnblasenwand den Übertritt von Hydrogen-, Magnesium-, Kalzium- und Kaliumionen oder anderen Urinkomponenten, die wiederum die sensorischen afferenten Neurone stimulieren (ROPPOLO et al., 2005; KRUGER et al., 2009). Bislang ist jedoch unklar, inwieweit die neurogene Entzündung ein spezifisches Ereignis der FIC darstellt. Es könnte sich hierbei um einen primären Faktor in der Entstehung der FIC oder lediglich um eine Folgeerscheinung aufgrund einer primären Noxe handeln (GUNN-MOORE, 2003).

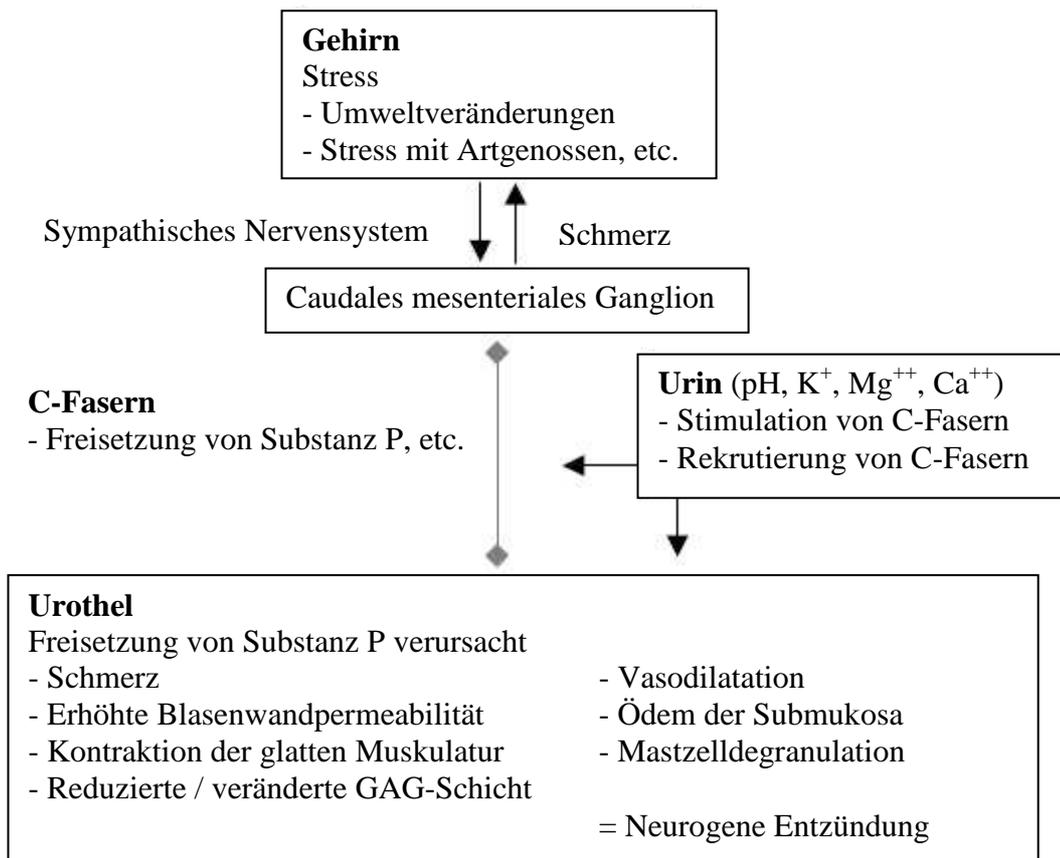


Abb. 3: Hypothese der neurogenen Entzündung

Schematische Darstellung der neurogenen Entzündung bei Katzen mit idiopathischer Zystitis (nach GUNN-MOORE, 2003). GAG = Glykosaminoglykan

#### 1.5.2.5. Infiltration der Harnblasenwand mit Mastzellen

Bei einigen Katzen mit FIC konnte ein erhöhter Anteil an Mastzellen in der Submukosa der Harnblasenwand festgestellt werden (BUFFINGTON et al., 1997b; GUNN-MOORE, 2003). Mastzellen sind verantwortlich für die Sekretion verschiedener Entzündungsmediatoren (z. B. Histamine, Heparin, Serotonin, Zytokine, Interleukine und Prostaglandine) und lösen damit Entzündung, Vasodilatation, Ödeme, Muskelspasmen und eine verstärkte Aktivierung nozizeptiver C-Fasern aus (GUNN-MOORE, 2003). In histologischen Untersuchungen von Blasenbiopsien konnte allerdings kein Unterschied im Grad der Mastzellinfiltration in Blasen von Katzen mit FIC, verglichen mit den Blasen von Katzen mit Urolithiasis, festgestellt werden (SPECHT et al., 2004). Die Rolle der Mastzellen in der Entstehung der FIC ist bislang unklar, und es wird vermutet, dass die Mastozytose im Blasengewebe von Katzen mit FIC nicht spezifisch für diese Erkrankung ist (KRUGER et al., 2009).

## **1.6. Die feline idiopathische Zystitis als Tiermodell der humanen interstitiellen Zystitis**

Die FIC gilt als Tiermodell für die humane IC, auch als schmerzhaftes Harnblasensyndrom (Painful bladder syndrom, PBS) bekannt, da sie viele Eigenschaften der humanen IC widerspiegelt (WESTROPP & BUFFINGTON, 2002; BJORLING et al., 2011). Aus diesem Grund sollen in den nachfolgenden Abschnitten die wichtigsten Charakteristika der IC und die Gemeinsamkeiten mit der FIC näher erläutert werden.

### **1.6.1. Charakterisierung**

Die IC wird definiert als eine schmerzhafte Erkrankung der Harnblase, die mit vermehrter Harnabsatzfrequenz und gesteigertem Harndrang sowie Nokturie und Schmerzen beim Harnabsatz einhergeht (BUTRICK et al., 2009; CAMERON & GAJEWSKI, 2009; FLORES-CARRERAS et al., 2010). Die sterile Entzündung betrifft vorwiegend Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 42 Jahren, tritt aber auch vereinzelt bei Männern und Kindern auf (CLEMENS et al., 2007). Die Prävalenz der IC bei Frauen in den USA liegt bei 0,83 bis 2,71 % (CLEMENS et al., 2007). Eine kürzlich veröffentlichte Studie ergab allerdings eine deutlich höhere Prävalenz mit 1,00 bis 11,00 % an Frauen in den USA, die an IC erkrankt waren (BERRY et al., 2010). Die Ätiologie der Erkrankung ist trotz intensiver Forschung nach wie vor unklar, und eine Diagnose kann nur anhand der typischen Symptomatik und dem Ausschluss anderer Erkrankungen der unteren Harnwege, wie zum Beispiel bakterieller Zystitis, Neoplasien oder chronische Schmerzen im Beckenbereich anderer Genese (z. B. Endometriose, Irritable bowel syndrome, Prostatitis) gestellt werden (VERCELLINI et al., 2009). Eine kausale Therapie ist derzeit nicht vorhanden.

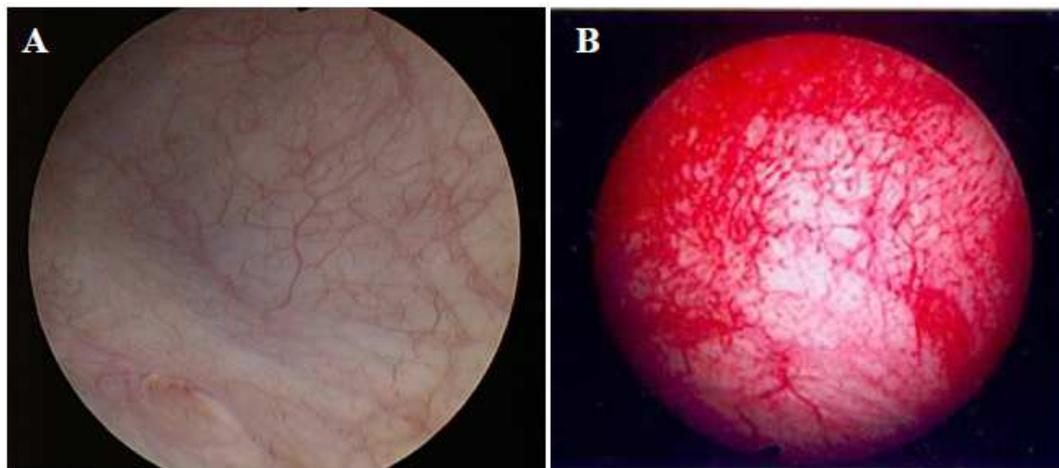
### **1.6.2. Tiermodelle**

Die bislang ungeklärte Ätiologie und die damit verbundene fehlende kausale Therapie machen die IC für die betroffenen Patienten zu einer von unablässigen Schmerzen geprägten „stillen Qual“ (PERSU et al., 2010). Aus diesem Grund ist die heutige Forschung intensiv darum bemüht, die beteiligten Pathomechanismen der IC zu ergründen. Allerdings ist die Gewinnung von Blasengewebe aufwändig. (BJORLING et al., 2011). Für die grundlegende Erforschung der Mechanismen, die zur Auslösung der IC führen, ist daher der Einsatz von Tiermodellen

notwendig (BJORLING et al., 2011). Die experimentelle Zystitis ist eine induzierte Entzündung der Harnblase bei Tieren, die als Modell für die humane natürlich vorkommende Zystitis dient (BJORLING et al., 2011). Eine experimentelle Zystitis wird zum Beispiel ausgelöst durch die intravesikuläre Instillation von Chemikalien bei Mäusen, Ratten und Meerschweinchen. (BARANIUK et al., 1990; WESTROPP & BUFFINGTON, 2002; PHULL et al., 2007; LIN et al., 2008; KRHUT & ZVARA, 2011; PALMA et al., 2011). Eine sogenannte autoimmune Zystitis kann zum Beispiel durch die Injektion von homogenisiertem Blasengewebe, das von gen-identischen Ratten gewonnen wurde, bei Mäusen oder Ratten induziert werden (LUBER-NAROD et al., 1996; PHULL et al., 2007; LIN et al., 2008). Des Weiteren kann eine Zystitis durch die intraperitoneale Injektion von Milz- und Lymphknotenhomogenaten, die zuvor von Mäusen und Ratten mit Harnblasenveränderungen gewonnen wurden, in naiven Mäusen induziert werden (BULLOCK et al., 1992; LUBER-NAROD et al., 1996). Die Tiere entwickelten ähnliche Symptome und histologische Veränderungen in der Blase wie Menschen mit IC. Diese Studien, zusammen mit den klinischen Beobachtungen, unterstützten die Hypothese der Autoimmunität als möglicher ätiologischer Hintergrund für die IC (BJORLING et al., 2011). Allerdings konnten weder Antigene identifiziert werden, noch führte die Therapie mit Immunsuppressiva zu einem Verschwinden oder einer Reduktion der Symptome (BJORLING et al., 2011). Die Bedeutung und die Anwendbarkeit einiger dieser Modelle für die Erforschung der Ätiologie und der beteiligten Pathomechanismen, ist nach wie vor unklar (BJORLING et al., 2011).

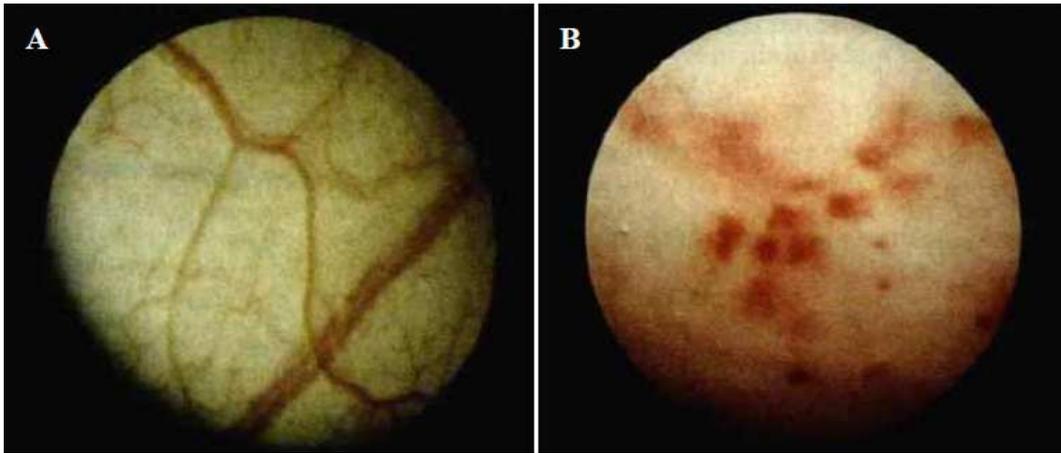
Zum jetzigen Zeitpunkt existiert kein Tiermodell, das der humanen IC mit seinen Charakteristika so ähnelt wie die FIC (WESTROPP & BUFFINGTON, 2002). Katzen mit FIC leiden häufig ebenso wie Menschen mit IC an einem chronischen rezidivierenden Verlauf der Erkrankung, der durch Umweltstressoren verschlimmert werden kann (WHITMORE, 1994; BUFFINGTON et al., 1997b; JONES et al., 1997). Obwohl die FIC normalerweise der klassischen nicht-ulzerativen Form der IC ähnelt, wurde dennoch von einem Fall der ulzerativen Form der FIC (Hunner's ulcers) mit typischen ulzerativen Veränderungen berichtet (CLASPER, 1990). Histologische Veränderungen, wie petechiale subepitheliale Blutungen (Glomerulationen), Ödeme, Fibrose, und der Verlust von oberflächlichen Schirmzellen (umbrella cells) sind sowohl bei der felines als auch

bei der humanen Form der Zystitis beschrieben (LAVELLE et al., 2000) (Abb. 4, Abb. 5). Betrachtet man die Abnormalitäten der lokalen Faktoren (z. B. die verminderte Konzentration an Glykosaminoglykanen), der sensorischen (afferenten) Neurone, des zentralen Nervensystems, der sympathischen (efferenten) Neurone, so können diese sowohl bei Katzen mit FIC als auch bei Menschen mit IC gefunden werden (LOWE et al., 1997; MARCHAND et al., 1998; BUFFINGTON, 2001; SUN & CHAI, 2006; SUN et al., 2009). Die Parallelen zwischen der felines und humanen Zystitis, die Erkenntnisse, die bisher durch die Erforschung der FIC gewonnen werden konnten und der Zugang zu felinem intravesikulärem Probenmaterial machen die FIC zu einem wertvollen und spontanen Tiermodell für die humane IC, mit dessen Hilfe weitere wichtige Einblicke in die beteiligten Pathomechanismen der IC und mögliche therapeutische Ansätze gewonnen werden könnten (WESTROPP & BUFFINGTON, 2002).



*Abb. 4: Endoskopische Aufnahme einer humanen Harnblase im physiologischen Zustand und mit interstitieller Zystitis*

*Endoskopische Aufnahme einer Harnblase eines gesunden Menschen (A) und einer Harnblase eines Patienten mit nicht-ulzerativer interstitieller Zystitis (IC) (B) (modifizierte Abbildung nach Onuma, 2008 und Tyagi et al., 2012). A) Physiologische Harnblase eines gesunden Menschen nach Hydrodistension. B) Pathologische Harnblase eines Patienten mit IC nach Hydrodistension mit typischen Glomerulationen und erhöhter Vaskularität.*



*Abb. 5: Endoskopische Aufnahme einer feline Harnblase im physiologischen Zustand und mit idiopathischer Zystitis*

*Endoskopische Aufnahme einer Harnblase einer gesunden Katze (A) und einer Harnblase einer Katze mit idiopathischer Zystitis (FIC) (B) (modifizierte Abbildung nach BUFFINGTON et al., 1996). A) Physiologische Harnblase einer gesunden Katze nach Hydrodistension. B) Pathologische Harnblase einer Katze mit FIC nach Hydrodistension mit typischen Glomerulationen und erhöhter Vaskularität.*

### **1.7. Proteinmarker im Urin**

Die genauen ätiologischen Hintergründe der FIC und der IC sind nach wie vor unbekannt (KELADA & JONES, 2007; KRUGER et al., 2009). Bei beiden Erkrankungen kann die Diagnose nur über den Ausschluss anderer Erkrankungen oder den endoskopischen Nachweis typischer Blasenwandläsionen gestellt werden (ADAMS & DENMAN, 2011; BUFFINGTON, 2011). Aus diesem Grund ist die aktuelle Forschung intensiv darum bemüht, Proteinbiomarker zu etablieren, mit deren Hilfe die verschiedenen Ursachen unterer Harnwegserkrankungen einfacher differenziert und Fehldiagnosen vermieden werden können (ERICKSON, 2012). Biomarker sind zudem hilfreich für die Aufklärung der ätiologischen Hintergründe der Erkrankung und tragen in Verbindung mit einer definitiven Diagnose zu einer optimalen Therapie der Erkrankung bei (ERICKSON, 2012).

In der Humanmedizin sind zahlreiche Studien über Proteinbiomarker im Urin von Patienten mit IC erschienen (KEAY et al., 1997; KEAY et al., 1998; CHAI et al., 2000; KEAY et al., 2000; KEAY et al., 2001b; ERICKSON et al., 2002; KEAY et al., 2003a; KEAY et al., 2004; ZHANG et al., 2005a; ERICKSON et al., 2007; KEAY et al., 2007; CANTER et al., 2008; DIMITRAKOV, 2008; KIM et al., 2009). In diesem Zusammenhang konnten drei bedeutende Proteine identifiziert

werden: der Antiproliferative factor (APF), der Epidermal growth factor (EGF) und der Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) (ERICKSON, 2001; KEAY et al., 2001a; KEAY et al., 2001b). Für APF und EGF konnte eine signifikant höhere Konzentration im Urin von Patienten mit IC im Vergleich zu den gesunden Kontrollen gezeigt werden, wohingegen HB-EGF bei Patienten mit IC in signifikant niedrigerer Konzentration vorhanden war als bei den gesunden Kontrollen (KEAY et al., 1997; KEAY et al., 2001b). Alle drei Biomarker unterscheiden mit hoher Sensitivität und Spezifität gemeinsam oder alleine zwischen Patienten mit IC und gesunden Kontrollen sowie Patienten mit bakterieller Zystitis (KEAY et al., 1997; KEAY et al., 2001a; KEAY et al., 2001b). Daher wird allen drei Markern eine große Rolle in der Pathogenese der IC und als mögliche Parameter für die Diagnose der IC zugesprochen (KEAY et al., 1997; KEAY et al., 2001a; KEAY et al., 2001b).

In der Veterinärmedizin steht die Forschung nach potenziellen Proteinbiomarkern für die FIC bislang noch am Anfang (BUFFINGTON, 2011; LEMBERGER et al., 2011a; LEMBERGER et al., 2011b). Bei der Suche nach potenziellen Urin-Proteinbiomarkern konnten in den letzten zwei Jahren zwei vielversprechende Proteine, Trefoil factor 2 (TFF2) und Fibronectin, detektiert werden (LEMBERGER et al., 2011a; LEMBERGER et al., 2011b). Diese werden im Urin und im Blasengewebe von Katzen mit FIC und gesunden Katzen in signifikant unterschiedlichen Mengen exprimiert (LEMBERGER et al., 2011a; LEMBERGER et al., 2011b). Bei den bisher bei Menschen und Katzen identifizierten Proteinen handelt es sich jeweils um Wachstumsfaktoren, die in unterschiedlicher Weise Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation des Epithels nehmen (BUFFINGTON, 2011).

### **1.7.1. Wachstumsfaktoren**

Im Jahr 1996 inkubierten KEAY und Mitarbeiter auf der Suche nach einer zytotoxischen Substanz im Urin von Patienten mit IC, die für den Schaden im Blasenepithel verantwortlich sein könnte, Blasenepithelzellen mit Urin von Patienten mit IC. Dabei wurde eine verminderte Proliferationsfähigkeit der inkubierten Epithelzellen festgestellt, weswegen die Forscher den Einfluss von antiproliferativen Substanzen im Urin von Patienten mit IC auf die Pathogenese der Erkrankung vermuteten (KEAY et al., 1996). Der bedeutendste Wachstumsfaktor, APF, wurde erstmals in einer nachfolgenden Studie ein Jahr

später erwähnt (KEAY et al., 1997). Hierbei konnte ein Unterschied in der Produktion von Wachstumsfaktoren zwischen Patienten mit IC und asymptomatischen Kontrollen festgestellt werden, und es wurde ebenfalls der Verdacht auf die Existenz eines antiproliferativen Faktors im Urin geäußert (KEAY et al., 1997). APF ist ein niedrig molekulares Peptid mit hitzestabilen Eigenschaften, das als negativ autokriner Wachstumsfaktor von epithelialen Zellen des Urothels bei der IC vermehrt produziert wird und mithilfe des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporations-Assays an Zellkulturen gemessen werden kann (KEAY et al., 2000). Im Urin von Patienten mit IC konnte, im Vergleich zu Patienten mit bakterieller Zystitis ebenso wie bei gesunden Kontrollen, eine höhere Konzentration an APF festgestellt werden (KEAY et al., 2001b). Dabei ergab sich kein Unterschied in der Konzentration bei Patienten mit der ulzerativen Form und Patienten mit der klassischen nicht-ulzerativen Form der IC (ZHANG et al., 2005a). Des Weiteren wurde in Studien deutlich, dass der APF die Zellproliferation unterdrückt und durch die reduzierte Expression von Proteinen, die an der Bildung des interzellulären Haftkomplexes beteiligt sind, den transepithelialen Widerstand vermindert (KEAY et al., 2003a; ZHANG et al., 2005b). APF führt zudem *in vitro* zu einer verminderten Produktion des Wachstumsfaktor HB-EGF in primären Blasenepithelzellen und verhindert damit eine physiologische Regeneration und Reparatur des Urothels (KEAY et al., 2003b).

HB-EGF wird hauptsächlich von Harnblasenepithelzellen gebildet und ist wichtig für die Zellproliferation und Wundheilung (KEAY et al., 1997; ZHANG et al., 2005a). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass rekombinanter HB-EGF die antiproliferativen Effekte des APF in Blasenepithelzellen sowohl von Patienten mit IC als auch von gesunden Probanden in einer dosisabhängigen Beziehung hemmt (KEAY et al., 2000; ZHANG et al., 2005a). Des Weiteren führt eine Hydrodistension der Blase von Patienten mit IC zu einer Abnahme der APF-Konzentration, während sich die HB-EGF-Werte denen gesunder Probanden annähert (CHAI et al., 2000). Aus diesem Grund wird vermutet, dass die meisten Effekte des APF auf die Zellen von Patienten mit IC aus einer Herunterregulierung der HB-EGF-medierten Signalwege resultieren (KEAY, 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass APF sowohl eine Blockade des G2- und/oder M-Phase-Zellzyklus induziert, als auch eine erhöhte Produktion von p53

und p21 in normalen Blasenepithelzellen bewirkt (RASHID et al., 2004; KIM et al., 2007). Erhöhte Konzentrationen dieser zwei Transkriptionsfaktoren, p53 und p21, bewirken einen Stillstand des Zellzyklus und vermehrt stattfindende Apoptose (KIM et al., 2007). Dies führte zu der Vermutung, dass APF seine antiproliferativen Effekte über Signaltransduktionswege mediiert, die in die Regulation dieser Wachstumssuppressorproteine involviert sind (RASHID et al., 2004; KIM et al., 2007). Die spezifischen Signalwege, die von APF beeinflusst werden, sind bislang unbekannt (KEAY, 2008). Eine kürzlich veröffentlichte Studie kam jedoch zu dem Schluss, dass APF und HB-EGF funktionell antagonistisch zueinander arbeiten und über Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-(MAPK-) Transduktionswege Signale austauschen (KIM et al., 2009).

Ein weiterer von APF beeinflusster Wachstumsfaktor ist EGF (KEAY et al., 2000). EGF wird von vielen epithelialen Zellen produziert und ist der zuerst entdeckte Ligand des EGF-Rezeptors (KEAY & WARREN, 1998; SCHNEIDER & WOLF, 2009). Er wird mithilfe eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) gemessen (ZHANG et al., 2005b). EGF zeigte, ebenso wie APF, eine signifikant erhöhte Konzentration im Urin von Patienten mit IC verglichen mit Patienten mit bakterieller Zystitis und gesunden Kontrollen (KEAY et al., 2001b; ERICKSON et al., 2002). Die Bedeutung des EGF in der Pathogenese der IC ist noch unklar, jedoch konnte in Studien ein negativer Einfluss auf das Zellwachstum durch EGF festgestellt werden (BROMBERG et al., 1998; KEAY et al., 2000).

Die zahlreichen Studien der letzten Jahre, haben zu dem Ergebnis geführt, dass alle drei Wachstumsfaktoren APF, HB-EGF und EGF als Biomarker für die IC von herausragender Bedeutung sind und das Verständnis ihrer veränderten Konzentrationen bei der Aufklärung der beteiligten Pathomechanismen der IC ebenso wie bei der Diagnose einen wesentlichen Beitrag leisten (KEAY et al., 2001b; KIM & FREEMAN, 2011).

### **1.7.2. Trefoil factor 2**

Die Suche nach Proteinen im Urin von Katzen mit FIC mit proteomischen Methoden führte zur Entdeckung eines interessanten Kandidaten, dem TFF2 (LEMBERGER et al., 2011b). TFF2 gehört zu einer Gruppe von kleinen (12-22 kD) Peptiden, von denen bei Säugetieren bisher drei Mitglieder beschrieben

worden sind, TFF 1, 2 und 3 (WRIGHT et al., 1997). TFF2 wurde erstmals im Pankreas von Schweinen entdeckt, und die charakteristische kleeblattähnliche Struktur verlieh dem Protein seinen Namen (JORGENSEN et al., 1982; THIM, 1989). TFF2 wird vereinzelt im Oberflächenepithel des Magens und in großen Mengen in Zellen der Magen-, Pylorus- und Brunnerschen Drüsen exprimiert (TOMASETTO et al., 1990; JEFFREY et al., 1994). Weitere Expressionsorte konnten bislang in verschiedenen Organen gefunden werden, wie zum Beispiel im Darm, im Pankreas, im Hypothalamus, in der Hypophyse und im Respirationstrakt (REGALO et al., 2005). Die abnormale Expression der TFF-Familie in chronisch entzündlichem Gewebe des GIT gab einen ersten Hinweis auf den Einfluss der TFF auf die Schleimhautregeneration (WONG et al., 1999). Alle drei TFF werden bei Schleimhautschäden und -verletzungen vermehrt exprimiert und tragen zur epithelialen Regeneration bei, indem sie die Motilität und Migration der Zellen fördern und gleichzeitig in die Apoptosehemmung involviert sind (ALISON et al., 1995; TAUPIN et al., 2000; KJELLEV, 2009).

Des Weiteren spielt TFF2 eine Rolle in der Immunabwehr des GIT (BAUS-LONCAR et al., 2005a; BAUS-LONCAR et al., 2005b). In einer Studie wurde die Verteilung aller drei TFF im Urogenitaltrakt untersucht (RINNERT et al., 2010). Dabei ließ sich vor allem die Synthese von TFF3, gefolgt von TFF1, im Epithel des gesamten UGT nachweisen, wohingegen TFF2 nur vereinzelt im Epithel zu finden war (RINNERT et al., 2010). Es wurde außerdem festgestellt, dass TFF2 jedoch das vorherrschende TFF-Peptid ist, das in den Urin sezerniert wird (RINNERT et al., 2010). Mithilfe von proteomischen Untersuchungsmethoden konnte in einer kürzlich erschienenen Studie eine Expression von TFF2 im Urin und Blasengewebe sowohl von gesunden Katzen als auch von Katzen mit FIC nachgewiesen werden (LEMBERGER et al., 2011b). Dabei konnte erstmals eine physiologische TFF2-Expression im Übergangsepithel, der Lamina propria mucosae und der Tunica muscularis des Blasengewebes gesunder Katzen gezeigt werden (LEMBERGER et al., 2011b). Des Weiteren fiel eine signifikant niedrigere Konzentration von TFF2 im Urin von Katzen mit FIC im Vergleich zu den gesunden Kontrollkatzen auf (LEMBERGER et al., 2011b). Auch im Blasengewebe konnte eine signifikant niedrigere Expression von TFF2 bei Katzen mit FIC, verglichen mit den gesunden Kontrollkatzen, aufgezeigt werden (LEMBERGER et al., 2011b).

Eine erhöhte Anfälligkeit für gastrointestinale Entzündung und die Entwicklung von Ulzera und malignen Tumoren im GIT, der Leber und der Prostata im Zusammenhang mit einem Mangel an TFF2 wurde bereits in mehreren humanmedizinischen Studien gezeigt (ALISON et al., 1995; FARRELL et al., 2002; LEUNG et al., 2002; GARRAWAY et al., 2004; KURT-JONES et al., 2007; MICHELIS et al., 2009). Aus diesem Grund wird für TFF2 auch in der Schleimhaut des UGT eine schützende Rolle vermutet (LEMBERGER et al., 2011b). Ein Mangel an TFF2 bei Katzen mit FIC könnte zu einer vermehrten Anfälligkeit für schwere Defekte und verminderte Abwehrmechanismen in der Blasenwand führen und damit zu einer reduzierten Reparations- und Regenerationsfähigkeit (LEMBERGER et al., 2011b). TFF2 spielt vermutlich eine wichtige Rolle in der Pathogenese der FIC, wobei nach wie vor unklar ist, ob der Mangel an TFF2 hierbei die Ursache ist oder lediglich eine Folge der Erkrankung darstellt (LEMBERGER et al., 2011b).

### **1.7.3. Fibronektin**

Fibronektin wird seit über mehr als zwei Jahrzehnten in physiologischen und pathologischen Vorgängen untersucht und ist nach wie vor Gegenstand zahlreicher interessanter Studien (PANKOV & YAMADA, 2002). Fibronektin ist ein hochmolekulares Glykoprotein, das als Dimer existiert, dessen Monomere durch ein Paar Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (MOSHER, 1984). Durch alternatives Splicing einer einzigen messenger Ribonukleinsäure (mRNA) kommt es dazu, dass mehr als 20 verschiedene Varianten des humanen Fibronektins existieren (FFRENCH-CONSTANT, 1995; KOSMEHL et al., 1996). Fibronektin ist ein freier löslicher Bestandteil von Plasma und anderen Körperflüssigkeiten und ebenfalls ein Teil der unlöslichen Extrazellulärmatrix (EZM). Deshalb werden zwei Formen unterschieden: das lösliche Plasma-Fibronektin, das vor allem in der Leber gebildet wird, und das unlösliche zelluläre Fibronektin (MOSHER, 1984). Fibronektin werden außergewöhnlich viele verschiedene Funktionen zugesprochen, wie zum Beispiel die Interaktion mit einer Reihe an wichtigen biologischen Molekülen, wie Heparin, Fibrin, Kollagene und Integrine (YAMADA & KENNEDY, 1979; HYNES & YAMADA, 1982; MOSHER, 1984; COUCHMAN et al., 1990; PANKOV & YAMADA, 2002). Weitere wichtige Funktionen sind die Zelladhäsion, Migration, Wachstum und Differenzierung sowie Wundheilung (YAMADA & KENNEDY, 1979; HYNES

& YAMADA, 1982; MOSHER, 1984; PANKOV & YAMADA, 2002).

Fibronectin wurde bereits in mehreren humanmedizinischen und veterinärmedizinischen Studien im Zusammenhang mit fibrotischen Erkrankungen beschrieben (BRAY et al., 1986; STANISLAWSKI & SORIN, 1991; ZHANG et al., 1994; EISMANN et al., 2002). Ein Beispiel ist die interstitielle Nierenfibrose beim Menschen, die eine Hauptursache für ein progressives Nierenversagen darstellt (BOHLE et al., 1979; BOHLE et al., 1990). Hierbei wurde in Tiermodellen eine Erhöhung der Fibronectin-Konzentration im Nierengewebe nachgewiesen (KUNCIO et al., 1991; WRIGHT et al., 1996). Studien deuten darauf hin, dass zwei Splice-Varianten von Fibronectin eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Organfibrose spielen (EISMANN et al., 2002). Damit können sie sich zusätzlich als prognostische Marker für das jeweilige Stadium des Nierenschadens eignen (EISMANN et al., 2002).

Fibronectin ist außerdem beteiligt an entzündlichen Erkrankungen des Darms. So konnte im Tiermodell mit Mäusen zu intestinalen Epithelschäden bei Kolitis eine erhöhte Expression von Fibronectin im Kolonepithel festgestellt werden, und die Autoren vermuten, dass das Fibronectin eine gesteigerte Zelladhäsion und Wundheilung bewirkt (KOLACHALA et al., 2007).

Im Urin sind physiologischer Weise geringe Mengen an Fibronectin vorhanden, die vermutlich im Rahmen physiologischer Prozesse zur Erneuerung des Blasenepithels in den Urin gelangen (GWINNER et al., 1993). Eine erhöhte Konzentration dieses Proteins im Urin wurde jedoch in humanmedizinischen Studien bei Neoplasien der Harnblase festgestellt (DANISMAN et al., 2000; EISSA et al., 2002; HEGELE et al., 2003; MUTLU et al., 2003; MENENDEZ et al., 2005). Man geht hierbei davon aus, dass die Komponenten der EZM durch die Proteasen, die aus der Metastasierung und Invasion resultieren, zersetzt werden und dadurch vermehrt im Urin ausgeschieden werden (KATAYAMA et al., 1989; KATAYAMA et al., 1990; WEISS et al., 1990; KATAYAMA et al., 1991; REDWOOD et al., 1992). Aus diesem Grund fungiert Fibronectin beim Menschen als Tumormarker im Urin und kann mit Hilfe von automatischen Assays gemessen werden (HEGELE et al., 2003; MUTLU et al., 2003; MENENDEZ et al., 2005). Bis heute existieren weder Studien über den Einfluss noch die Beteiligung von Fibronectin an der Entwicklung der humanen IC. In einer kürzlich erschienenen Studie konnte Fibronectin im Urin von Katzen mit

FIC und gesunden Katzen mithilfe proteomischer Methoden nachgewiesen werden (LEMBERGER et al., 2011a). Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Konzentration von Fibronectin im Urin von Katzen mit FIC verglichen mit den gesunden Kontrollkatzen (LEMBERGER et al., 2011a). Eine physiologische Expression im Blasengewebe von gesunden Katzen insbesondere im Bereich der EZM der Lamina propria mucosae und der Tunica muscularis konnte dargestellt werden (LEMBERGER et al., 2011a). Katzen mit FIC zeigten eine deutlich schwächere Signalintensität für Fibronectin in den genannten Schichten als die gesunden Kontrollen (LEMBERGER et al., 2011a). Eine vermehrt stattfindende Fibrose im Blasengewebe von Katzen mit FIC und eine erhöhte Blasenwandpermeabilität infolge der hochgradigen Entzündung und des Verlustes der Schirmzellen und tight junctions (LAVELLE et al., 2000) werden als Ursache für die reduzierte Konzentration im Gewebe vermutet (LEMBERGER et al., 2011a). Ob diese Beobachtungen Ursache oder Folge der Erkrankung sind, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar (LEMBERGER et al., 2011a).

## **2. Proteomik**

Die Proteomik umfasst die Erforschung des Proteoms mit biochemischen Methoden (WILKINS et al., 1996a). Das Proteom beschreibt die Gesamtheit aller in einer Körperflüssigkeit, einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt vorliegenden Proteine (WILKINS et al., 1996a; WILKINS et al., 1996b). Dabei unterliegt das Proteom, im Gegensatz zum statischen Genom, einem hochdynamischen Prozess und erfährt unmittelbare und charakteristische Veränderungen als Antwort auf Krankheitszustände und externe Stimuli (APWEILER et al., 2009). Wesentliche Teilgebiete der Proteomik befassen sich mit der quantitativen und qualitativen Analyse der Proteinexpression, mit der Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen sowie mit der Untersuchung von posttranslationalen Modifikationen (ROTILIO et al., 2012). Aufgrund der Tatsache, dass sich Proteinexpressionsmuster unter bestimmten Bedingungen verändern, ist es für die Erforschung von Krankheitsmechanismen von Bedeutung, die einzelnen Proteine bei unterschiedlichen Bedingungen, also sowohl im gesunden als auch im kranken Zustand, zu untersuchen und zu vergleichen (differenzielle Proteomanalyse) (WILKINS et al., 1996b; BECK et al., 2011). Die wichtigste Analysemethode ist hierbei die Massenspektrometrie (PETSCHNIGG et al., 2011). Sie stellt eine

äußerst effektive Methode zur Analyse von Expressionsmustern, posttranslationalen Modifikationen und der vergleichenden und absoluten quantitativen Proteinanalyse dar (ROTILIO et al., 2012).

### 2.1. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde seit ihrer Entdeckung vor über 100 Jahren weltweit als Analysemethode eingesetzt (CANAS et al., 2006). Sie stellt die Methode der Wahl zur Identifikation, Charakterisierung und Quantifizierung von Proteinen und zur Identifikation von posttranslationalen Modifikationen dar und leistet somit einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Dynamik, der Interaktionen und der Rolle von Proteinen und Peptiden (DOMON & AEBERSOLD, 2006; ANGEL et al., 2012). Des Weiteren gibt sie Einblicke in veränderte Signaltransduktionswege und ermöglicht die Identifikation der für Diagnostik und Therapie von Erkrankungen wichtigen Biomarker (PHAM et al., 2012).

Das Prinzip des Massenspektrometers besteht in der Trennung ionisierter Proteine oder Peptide in Abhängigkeit von ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ). Dies geschieht mithilfe von elektrischen oder magnetischen Feldern, die zu einer Veränderung der räumlichen Flugbahn, der Geschwindigkeit und der Ladung der Ionen führen. Anschließend lassen sich die detektierten Massenspektren der ionisierten Peptide mittels Proteinsequenzdatenbanken und Softwareprogrammen wie zum Beispiel MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) identifizieren. Das Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle zur Erzeugung von Ionen, einem Analysator zur Auftrennung der Ionen und einem Detektor zur Umwandlung der analogen in digitale Signale und zur Aufzeichnung der Massenspektren (CANAS et al., 2006). Als Ionenquelle kann entweder die Elektrospray-Ionisation (FENN et al., 1989) oder die Matrix-assoziierte-Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) (KARAS & HILLENKAMP, 1988) dienen. Die Analyse erfolgt mittels Flugzeit- (time-of-flight, TOF), Quadrupol- oder Ionenfallen-Massenspektrometer. Ionenfallen- und Quadrupol-Massenspektrometer sind häufig mit einer Elektrospray-Ionisation gekoppelt, während Flugzeit-Massenspektrometer meist in Verbindung mit MALDI Ionenquellen genutzt werden. Massenspektrometer können außerdem aus einem oder mehreren Analysatoren hintereinander geschaltet bestehen. Zwei oder mehr Massenanalytoren werden als Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

bezeichnet (CANAS et al., 2006; ROTILIO et al., 2012), wie zum Beispiel die Kopplung von zwei Flugzeit-Massenspektrometern (TOF/TOF) oder die Hintereinanderschaltung von einem Quadrupol- und einem Flugzeit-Massenspektrometer (Q/Q/TOF) (DOMON & AEBERSOLD, 2006).

### **2.1.1. LC-MS/MS**

Bei der LC-MS/MS wird der Massenspektrometrie eine Flüssigkeitschromatographie (LC) vorangeschaltet. Mithilfe der Chromatographie werden die Proteine zuerst aufgetrennt, um dann anschließend im Massenspektrometer analysiert zu werden. Somit kann die Analyse von sehr komplexen proteomischen Proben erleichtert werden (BECK et al., 2011). Dabei werden die komplexen Proteinmischungen zuerst enzymatisch verdaut, um kleine Peptidfragmente zu gewinnen. Nach der Auftrennung im Flüssigkeitschromatographen werden die Peptide dem Elektronenspray-Ionisator zugeführt, um dann anschließend im Massenspektrometer weiter analysiert zu werden (ROTILIO et al., 2012).

### **2.1.2. LTQ Orbitrap**

Die Forschung im Bereich der Proteomik treibt die Entwicklung von neuartigen Massenspektrometern mit hoher Effizienz und geringem Energieaufwand an. Ein derartiges Massenspektrometer, die LTQ Orbitrap, wurde 2005 von MAKAROV entwickelt und stellt heute aufgrund seiner hohen Sensitivität und Massenauflösung ein wichtiges Werkzeug der Proteomik dar (HU et al., 2005; OLSEN & MACEK, 2009). Das LTQ Orbitrap besteht aus einer linearen Ionenfalle (LTQ), die mit einem neuartigen Massenanalysator, der Orbitrap, gekoppelt ist (MAKAROV, 2000; HARDMAN & MAKAROV, 2003; HU et al., 2005). In der Orbitrap kreisen die Ionen zwischen zwei konzentrischen Elektroden, wobei die axiale Bewegung detektiert und anhand ihrer Spiegelströme in ein Massenspektrum transferiert wird. LTQ und Orbitrap sind über eine C-Trap miteinander verbunden, in der die Ionen vorübergehend gelagert werden (OLSEN et al., 2005).

## **2.2. Systembiologie**

Um Biologie auf systemischer Ebene verstehen zu können, müssen die Struktur und die Dynamik der zellulären Funktionen sowie der Funktionen des Organismus und nicht die Eigenschaften isolierter Teile einer Zelle oder eines Organismus

untersucht werden (KITANO, 2002). Seit etwas mehr als einem Jahrzehnt ist die Systembiologie von einer Idee zu einem bedeutenden Forschungszweig herangewachsen (KOHL et al., 2010). Sie wird definiert als eine wissenschaftliche Disziplin, die danach strebt, alle molekularen Elemente eines biologischen Systems zu erfassen und zu quantifizieren (HOOD et al., 2004). Auf diese Weise können die Interaktionen der einzelnen Elemente beurteilt und in graphische Netzwerkmodelle integriert werden, die wiederum als Basis für neue Hypothesen dienen, um neu auftretende Mechanismen und biologische Prozesse erklären zu können (HOOD et al., 2004). Während ein Verständnis für Gene und Proteine weiterhin von Bedeutung sein wird, liegt der Fokus der Systembiologie auf dem Verständnis der Struktur und Dynamik des ganzen Systems (KITANO, 2002). Der systembiologische Ansatz hat bereits in vielen pathologischen Zuständen Einzug gehalten und neue Aspekte der Pathogenese vielschichtiger Krankheiten, wie neurodegenerativer Erkrankungen, ans Licht gebracht (LIU et al., 2010). In der Tumorforschung wurde die Systembiologie bereits verwendet und hat zum Beispiel bei Prostata Tumoren zu der Erkenntnis geführt, dass die unterschiedlichen Stadien sich in der dynamischen Veränderung der Expressionsmuster von Genen und Proteinen in den erkrankten Zellen widerspiegeln (HOOD et al., 2004).

Auch in der Erforschung der humanen IC hat diese junge Wissenschaftsdisziplin bereits Verwendung gefunden (VAN et al., 2003; KIM et al., 2011; YANG et al., 2012). In einer Studie wurde der Gebrauch von proteomischen und metabonomischen Mustern im Urin zur Diagnose der IC getestet und gegenübergestellt (VAN et al., 2003). Dabei wurden mittels Massenspektrometrie und Kernspinmagnetresonanzspektroskopie gewonnene Informationen mit fortgeschrittener Bioinformatik genauestens untersucht und die Spektralmuster mit einer 84%igen Spezifität von Patienten mit IC, Patienten mit bakterieller Zystitis und gesunden Individuen unterschieden (VAN et al., 2003). In einer kürzlich erschienenen Studie wurde mithilfe von quantitativer Proteomik und Transkriptomik versucht, potenzielle Proteine und Gene, die durch APF reguliert sein könnten, zu identifizieren und gleichzeitig das APF-regulierte Netzwerk zu untersuchen (YANG et al., 2012). 4140 verschiedene Gene wurden identifiziert, von denen zehn potenziell durch APF reguliert und fünf nach der Erstellung eines Netzwerks von besonderer Bedeutung sein könnten. Durch die Verwendung der

---

Systembiologie konnten in dieser Studie mögliche Downstream-Mediatoren des APF-Signaltransduktionswegs identifiziert werden (YANG et al., 2012).

Nach wie vor ist die Medizin von heute reaktiv, mit dem Fokus auf die Entwicklung von Therapien für bereits existierende Krankheiten, üblicherweise spät in deren Verlauf. Mithilfe der systembiologischen Herangehensweise wird in Zukunft der Weg zu einer prädiktiven und letztendlich präventiven Medizin geebnet (HOOD et al., 2004).

### III. PUBLIKATION

#### **Novel Potential Interacting Partners of Fibronectin in Spontaneous Animal Model of Interstitial Cystitis**

**Gudrun Treutlein**<sup>1</sup>

**Roswitha Dorsch**, Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA<sup>1</sup>

**Kerstin N. Euler**<sup>2</sup>

**Stefanie M. Hauck**, Dipl. Biol.<sup>3</sup>

**Barbara Amann**<sup>2</sup>

**Katrin Hartmann**, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA<sup>1</sup>

**Cornelia A. Deeg**, Dr. med. vet., PD (Physiologie)<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, München, Germany

<sup>2</sup> Institute of Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, LMU Munich, München, Germany

<sup>3</sup> Research Unit for Protein Science, Helmholtz Zentrum München – German Research Center for Environmental Health (GmbH), Neuherberg, Germany

**PLoS One, veröffentlicht**

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0051391>

# Novel Potential Interacting Partners of Fibronectin in Spontaneous Animal Model of Interstitial Cystitis

Gudrun Treutlein<sup>1</sup>, Roswitha Dorsch<sup>1</sup>, Kerstin N. Euler<sup>2</sup>, Stefanie M. Hauck<sup>3</sup>, Barbara Amann<sup>2</sup>, Katrin Hartmann<sup>1</sup>, Cornelia A. Deeg<sup>2\*</sup>

**1** Clinic of Small Animal Medicine, Center of Clinical Veterinary Medicine, LMU Munich, München, Germany, **2** Institute of Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, LMU Munich, München, Germany, **3** Research Unit for Protein Science, Helmholtz Zentrum München – German Research Center for Environmental Health (GmbH), Neuherberg, Germany

## Abstract

Feline idiopathic cystitis (FIC) is the only spontaneous animal model for human interstitial cystitis (IC), as both possess a distinctive chronic and relapsing character. Underlying pathomechanisms of both diseases are not clearly established yet. We recently detected increased urine fibronectin levels in FIC cases. The purpose of this study was to gain further insight into the pathogenesis by assessing interacting partners of fibronectin in urine of FIC affected cats. Several candidate proteins were identified via immunoprecipitation and mass spectrometry. Considerable changes in FIC conditions compared to physiological expression of co-purified proteins were detected by Western blot and immunohistochemistry. Compared to controls, complement C4a and thioredoxin were present in higher levels in urine of FIC patients whereas loss of signal intensity was detected in FIC affected tissue. Galectin-7 was exclusively detected in urine of FIC cats, pointing to an important role of this molecule in FIC pathogenesis. Moderate physiological signal intensity of galectin-7 in transitional epithelium shifted to distinct expression in transitional epithelium under pathophysiological conditions. I-FABP expression was reduced in urine and urinary bladder tissue of FIC cats. Additionally, transduction molecules of thioredoxin, NF- $\kappa$ B p65 and p38 MAPK, were examined. In FIC affected tissue, colocalization of thioredoxin and NF- $\kappa$ B p65 could be demonstrated compared to absent coexpression of thioredoxin and p38 MAPK. These considerable changes in expression level and pattern point to an important role for co-purified proteins of fibronectin and thioredoxin-regulated signal transduction pathways in FIC pathogenesis. These results could provide a promising starting point for novel therapeutic approaches in the future.

**Citation:** Treutlein G, Dorsch R, Euler KN, Hauck SM, Amann B, et al. (2012) Novel Potential Interacting Partners of Fibronectin in Spontaneous Animal Model of Interstitial Cystitis. PLoS ONE 7(12): e51391. doi:10.1371/journal.pone.0051391

**Editor:** Bernhard Kaltenboeck, Auburn University, United States of America

**Received:** July 31, 2012; **Accepted:** November 5, 2012; **Published:** December 7, 2012

**Copyright:** © 2012 Treutlein et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) SFB 571 A5 Deeg. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

## Introduction

Feline idiopathic cystitis (FIC), a common disease occurring in 55–69% of cats with lower urinary tract signs, is the best spontaneous animal model for human interstitial cystitis (IC), also known as painful bladder syndrome [1–2]. FIC represents most of its features such as bladder pain, urgency and nocturia in the absence of any other identifiable pathology such as urinary tract infection or bladder carcinoma [1,3]. The diagnosis of both IC and FIC can only be made by exclusion of other diseases and confirmed in cystoscopy by characteristic mucosal lesions and hemorrhages [4–5]. To the patients' distress, a causative therapy could not be established so far. Moreover, both diseases are characterized by their chronic and relapsing character [1,6].

Despite extensive research the etiology of FIC and IC is still unknown. In veterinary as well as human medicine there is a consensus that FIC and IC are multifactorial disease syndromes involving the urinary bladder. FIC is currently considered a disease syndrome of several and possibly interrelated mechanisms involving local bladder abnormalities, abnormalities of the nervous and endocrine system as well as

environmental factors as triggers for psychoneuroendocrine dysfunction [7]. There is also evidence that viruses, especially feline Calicivirus (FCV), may play a role at least in some cases of FIC [8]. Regarding human IC different theories for the underlying pathomechanism were hypothesized among which were chronic or subclinical infection, autoimmunity, neurogenic inflammation or bladder urothelial defects affecting bladder permeability [9–10]. One field of IC research engaged the protein contents in urine in order to find potential diagnostic markers and to gain new insight into the pathophysiology of this disease [11–13]. Recently, we identified two differentially expressed proteins in disease, trefoil factor 2 and fibronectin by comparing the protein profiles in urine of healthy and FIC diseased cats using proteomic approaches [14–15]. Fibronectin, a widely expressed high-molecular weight glycoprotein, plays an important role in cell adhesion, migration, growth, differentiation and wound healing and takes part in a wide variety of interactions with numerous proteins, such as heparin, collagen and fibrin [16–17]. It is significantly upregulated in urine of cats with FIC, indicating a more important role of fibrosis in the pathogenesis of this disease than previously thought [15].

The goal of this study was to closely characterize the fibronectin interaction network in urine and urinary bladder tissue of cats with FIC with the aim to gain further insight into the pathophysiology of this disease.

## Materials and Methods

### Collection and Preparation of Urine of Healthy and FIC Cats

All samples were collected from privately owned cats examined at the Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Germany. A total of 46 urine specimens were collected and processed. This study included two groups: the FIC group ( $n=26$ ) and the healthy control group ( $n=20$ ). Inclusion criteria for the FIC group were clinical lower urinary tract signs, such as hematuria, stranguria, pollakisuria and periuria and exclusion of other diseases of the lower urinary tract such as urolithiasis, bacterial urinary tract infection and structural abnormalities (anomalies and neoplasia) [15]. To determine eligibility for inclusion in this study group, abdominal ultrasonography and abdominal radiographs, urinalysis including determination of the urine specific gravity, urine dipstick and urine sediment and aerobic urine culture were performed. Cats were excluded if they showed any sign for crystalluria, bacteriuria, urolithiasis, evidence of structural urinary tract abnormality, or if results of bacterial culture of the urine sample were positive. Only FIC cases with concurrent obstruction of the urethra were included in the study. Healthy control cats were evaluated for health care at the Clinic of Small Animal Medicine. Inclusion criteria for the healthy group were no clinical signs of urinary tract disease, no abnormalities on physical examination and an unremarkable urinalysis, including specific gravity, dipstick and sediment on the day of inclusion. Any history of prior urinary tract disease led to exclusion from the healthy control group. All procedures performed on any of the cats participating in the study were medically indicated. No experimental animals were involved. Urine samples were originally collected for purposes of clinical work-up and used in scientific research with permission from the Small Animal Clinic of LMU Munich, Munich, Germany. Owners gave their consent to use the samples.

A total of 26 urine samples from FIC cats and 20 urine samples from healthy control cats collected by means of cystocentesis (FIC  $n=21$ , controls  $n=20$ ) or catheterization (FIC  $n=5$ ) were included. Cats with FIC were sampled within 24 h after the onset of clinical signs. Immediately after sampling, native urine was subjected to urine analysis (see below). Subsequently, urine samples were centrifuged at 2000 rpm at room temperature (RT) for 5 min and the protein content of supernatants as well as sediments was quantified (see below). Finally, supernatants were divided into aliquots and immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further processing.

### Collection and Preparation of Urinary Bladder Tissue of Healthy and FIC Cats

Urinary bladders from three cats with obstructive FIC and four cats with a healthy urinary tract were obtained freshly post mortem. Cases with FIC were privately owned and presented as patients at the Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Germany. The reason for euthanasia of the cats was unrelated to our study. Control cats with healthy urinary tract were euthanized due to diseases unrelated to our study and without pathologic alteration of the urinary tract. Owners gave permission for the clinical samples to be used scientifically. No experimental animals were involved.

Urinary bladders were extracted in their entirety within 30 min after euthanasia and sections of various regions were prepared. Sections were fixed by immersion in Bouin's solution (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany), dehydrated in a series of alcohols and subsequently embedded in paraffin (Micom International, Walldorf, Germany).

### Urinalysis and Protein Quantification

Prior to centrifugation of urine samples, a hand refractometer was used to determine urine specific gravity. Additionally, urinalysis was performed by means of the semi-quantitative urinalysis sticks (Combur-9 Roche Diagnostics, Grenzach-Wyhlen, Germany) for determination of pH, total protein content as well as concentration of glucose, ketones, bilirubin, urobilinogen, nitrite and blood/erythrocytes. After centrifugation of urine samples (2000 rpm, RT, 5 min) within 30 min after collection, urine sediments were examined microscopically. Protein content in urine supernatants of each cat included in the study was determined by Bradford analysis (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany).

### Immunoprecipitation of Protein Complexes in Representative FIC Diseased Urine

For immunoprecipitation of fibronectin containing protein complexes, the urine sample (50  $\mu\text{g}$ ) of one FIC cat was incubated with a polyclonal rabbit anti-human fibronectin antibody (5  $\mu\text{g}$  IgG) (ThermoFisher, Bonn, Germany), which according to the manufacturer's declaration also detects feline fibronectin, in immunoprecipitation buffer (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.2% NP40; pH 7.4) at RT for 1 h. As negative control, the same amount of urine was incubated with purified rabbit serum IgG (5  $\mu\text{g}$ ) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) using identical conditions to detect any unspecific antibody binding. Antibody-bound protein complexes were recovered via binding to protein G-Sepharose beads (GE Healthcare, Freiburg, Germany) in illustra MicroSpin G-50 Columns (GE Healthcare). Therefore, 40  $\mu\text{l}$  protein G-Sepharose beads were washed several times with immunoprecipitation buffer on the columns and subsequently incubated with the urine-antibody-, respectively urine-serum-IgG mixture at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 h with gentle agitation. Afterwards, the Sepharose-bound immunoprecipitates were centrifuged at 0.8 rpm for 2 s followed by several washing steps with immunoprecipitation buffer. Immune complexes of both appendages were eluted from beads into 50  $\mu\text{l}$  of Laemmli buffer (4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromphenol blue, 0.125 M Tris; pH 6.8) by agitation on a bench top shaker (1400 rpm) for 10 min and subsequent heating to  $70^{\circ}\text{C}$  for 10 min. After centrifugation, the supernatant containing the immunoprecipitated proteins was separated by SDS-PAGE (8%) and blotted onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; GE Healthcare, Freiburg, Germany). After blocking for 1 h in 1% polyvinylpyrrolidone in PBS-T (PVP-T; PBS containing 0.05% Tween 20) blots were incubated in a 1:1000 dilution of polyclonal rabbit anti-human fibronectin antibody (ThermoFisher) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  followed by detection of binding by a 1:1500 dilution of HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Serotec, Düsseldorf, Germany) for 1 h at RT. Proteins were then visualized with enhanced chemiluminescence (ECL) reagent on X-ray films (Euromed; Christiansen, Planegg, Germany). Remaining supernatant of immunoprecipitation was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further processing.

### Identification of Co-purified Proteins by Liquid-chromatography Mass Spectrometry/mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Directly prior to LC-MS/MS analysis, immunoprecipitated proteins were digested in trypsin and resulting peptides were separated on a reversed phase chromatography column (PepMap, 15 cm × 75 µm ID, 3 µm/100Å pore size, LC Packings) operated on a nano-HPLC apparatus (Ultimate 3000, Dionex GmbH, Idstein, Germany). The nano-HPLC was connected to a linear quadrupole ion trap-Orbitrap (LTQ Orbitrap XL) mass spectrometer (ThermoFisher, Bremen, Germany). The mass spectrometer was operated in the data-dependent mode to automatically switch between Orbitrap-MS and LTQ-MS/MS acquisition. Survey full scan MS spectra (from m/z 300 to 1500) were acquired in the Orbitrap resolution R = 60,000 at m/z 400. Up to ten most intense ions were in parallel selected for fragmentation on the linear ion trap using collision induced dissociation at a target value of 100,000 ions and subsequently dynamically excluded for 30 s. General mass spectrometry settings were: electrospray voltage, 1.25–1.4 kV; no sheath and auxiliary gas flow; ion selection threshold for MS/MS, 500 counts; activation Q-value for MS/MS, 0.25 and activation time for MS/MS, 30 ms. MS/MS spectra were exported from the Progenesis software as Mascot Generic file (mgf) and used for peptide identification using Mascot (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com>), the Uniprot database (<http://www.uniprot.org>) restricted to mammalian entries and the Ensembl cat database (<http://www.ensembl.org>) in particular. A protein was considered as identified if the confidence score was higher than 30 and if the significance threshold was  $p \leq 0.01$ . For quantification, all peptides allocated to a protein were included and the total cumulative abundance of the protein was calculated by summing the abundances of all peptides. Multiple interaction candidates of fibronectin were discovered of which peptide identifications are listed in table 1.

### Verification and Quantification of Co-purified Proteins

**SDS-PAGE, western blotting and signal quantification.** For protein separation, SDS-PAGE was performed loading equal amounts of total protein from all urine supernatants followed by semidry blotting onto PVDF membranes (GE Healthcare). Unspecific binding was then blocked with 1%

PVP-T for 1 h at RT. Blots were incubated overnight at 4°C with the according primary antibody. For detection of candidate proteins, polyclonal rabbit anti-human complement C4-A (C4a) antibody (Abcam, Berlin, Germany) was used at a working dilution of 1:500. Rabbit polyclonal antibody against human galectin-7 (Abcam) was used at a dilution of 1:3000. Polyclonal goat anti-human fatty acid-binding protein 2 (I-FABP) antibody (Abcam) was used at a dilution of 1:1000 and rabbit polyclonal anti-human thioredoxin antibody (Abcam) was utilized at a working dilution of 1:400. Polyclonal rabbit anti-human NF-κB antibody against subunit p65 was purchased from Cell Signaling, (Frankfurt (Main), Germany) and was used at a dilution of 1:1000. Working dilution for polyclonal anti-human p38 MAPK antibody (Cell Signaling) was 1:300. After three washing steps in PBS-T, blots were incubated in respective horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h at RT to detect binding of primary antibody. As secondary antibodies, goat anti-rabbit IgG (Serotec, Düsseldorf, Germany, dilution 1:5000) or rabbit anti-goat IgG (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany; dilution 1:1000) were utilized. Negative controls for all Western blot experiments included omission of the primary antibody as well as incubation with isotype-matched primary antibody of irrelevant specificity.

After twelve further washing steps in PBS-T, signals were detected by ECL on a radiographic film (Euromed). Western blots were imaged on a transmission scanner operated by LAB SCAN 5.0 software and Western blot signals were quantified by means of densitometry using ImageQuantTL software v2005 (all GE Healthcare).

**Immunofluorescent labelling of target tissue.** Urinary bladder tissue blocks were sectioned and subsequently mounted on coated slides (Superfrost; Menzel, Braunschweig, Germany). Heat antigen retrieval was processed at 99°C for 15 min in 0.1 M EDTA-NaOH buffer (pH 8.0). Tissue sections were blocked with 1% BSA in TBS-T and appropriate serum for 40 min at RT prior to incubation with primary antibody. Blocking serum was selected according to the species the secondary antibody was obtained from. In the case of labelling with multiple antibodies, blocking steps (ProteinBlock; Dako, Hamburg, Germany) were inserted between each antibody incubation. Tissue sections were fluorescently labelled by incubation with primary antibodies against fibronectin (monoclonal mouse anti-human fibronectin-antibody, 1:100), C4a (1:50), galectin-7 (1:500), I-FABP (1:200), thioredoxin (1:100), NF-κB p65 (1:50), p38 MAPK (1:50) (all antibodies from

**Table 1.** Urine fibronectin co-purified proteins identified by mass spectrometry.

| Protein name                           | Accession no. <sup>a</sup> | Peptide count <sup>b</sup> | Confidence score <sup>c</sup> | Maximum fold change <sup>d</sup> |
|--|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Fibronectin                            | ENSFCAP0000008544          | 11                         | 575                           | 10.81                            |
| Ig kappa chain V region 3315           | P01683                     | 2                          | 76                            | 50166.98                         |
| Ig gamma chain C region                | P01870                     | 1                          | 1489                          | 6.25                             |
| Alpha-S1-casein                        | P02662                     | 2                          | 82                            | 13.03                            |
| Caspase-14                             | P31944                     | 1                          | 51                            | 7.44                             |
| Complement C4-A                        | P0COL4                     | 2                          | 78                            | 10.14                            |
| Galectin-7                             | P47929                     | 2                          | 104                           | 23.95                            |
| Fatty acid-binding protein, intestinal | P12104                     | 1                          | 63                            | 14.87                            |
| Thioredoxin                            | P10599                     | 1                          | 62                            | 14.98                            |

Multiple co-purified proteins of fibronectin could be identified in urine of FIC cases by LC-MS/MS of which eight are listed. a) Accession number as listed on Uniprot (<http://www.uniprot.org>) or Ensembl (<http://www.ensembl.org>) databases, b) Number of peptides the protein was identified with, c) Confidence score as given in Mascot were considered as significant if the value was higher than 30 (\* $p \leq 0.01$ ), d) Ratio of control IP and FIC IP cumulated peptide intensity signal strengths (progenesis values).

doi:10.1371/journal.pone.0051391.t001

Abcam) and mouse anti-human CD117 (1:50; Serotec); at 4°C overnight followed by incubation with the respective secondary antibody for 30 min at RT. Secondary antibodies were Alexa Fluor dye-labelled and purchased from Invitrogen (Karlsruhe, Germany). All antibodies were used at a working dilution of 1:500 (goat anti-rabbit IgG Alexa 647, donkey anti-goat IgG Alexa 546 and goat anti-mouse IgG Alexa 488). Isotype controls were included as negative controls in all immunohistochemical stainings. Cell nuclei were stained with 4'6-diamidino-2-phenylindol (Invitrogen; dilution 1:1000). Finally, sections were mounted using fluorescence mounting medium. Fluorescent images were recorded with the Axio Imager M1 (Zeiss, Göttingen, Germany) and examined with Axio Vision 4.6 software (Zeiss).

**Statistical analysis.** Calculation of statistical significance was performed using the Paleontological Statistics (PAST) software (<http://folk.uio.no/ohammer/past/index.html>). Variance of protein expression quantified by means of densitometry using the ImageQuantTL software was analysed by a Kolmogorov-Smirnov test. Since the data were not distributed normally, the Mann-Whitney test was used to calculate statistical significance. The differences in the protein expression were considered as significant if the p-value was  $\leq 0.05$ .

## Results

### Novel Potential Interacting Partners of Fibronectin Identified

For identification of the proteins that coprecipitated with fibronectin in the immunoprecipitation assay, LC-MS/MS analysis was used. Multiple co-purified proteins could be clearly identified as well as fibronectin itself, emphasising the affinity of the used antibody actually directed against a human target protein to the feline one (table 1). Peptides with a maximum fold change of more than 5.5 are listed in table 1. These identified proteins were Ig kappa chain region V 3315, Ig gamma chain C region, alpha-S1-casein, caspase-14, C4a, galectin-7, I-FABP and thioredoxin. Next, we decided to verify changed expression patterns of the latter four candidates in urine of a cohort of healthy and FIC cases.

### Expression of Candidates in Urine of FIC Diseased Cases and Healthy Controls

**Complement C4a and galectin-7 levels are increased in urine of FIC cases.** Quantification of C4a signal intensities in urine of FIC cases compared to healthy controls showed a significant ( $p \leq 0.001$ ) increase of C4a levels in the majority of tested urine samples of FIC cases (Fig. 1A, black column) with an almost 5-fold higher concentration in FIC urines compared to healthy control urines (Fig. 1A, white column).

In urine of FIC cases, (Fig. 1B, black column) we found an extraordinary upregulation of galectin-7 with a 45-fold higher expression in urine of FIC compared to healthy control urine (Fig. 1B, white column) with a p-value of  $\leq 0.05$ . Interestingly, only some urine samples of FIC affected cases revealed a higher expression, whereas the signal intensity of galectin-7 in some FIC and all healthy cases was negative (Fig. 1B).

**I-FABP level is decreased in urine of FIC cases.** Fatty acid-binding protein 2 (I-FABP), belongs to the fatty acid-binding protein family and is generally expressed in the entirety of the intestine [18]. I-FABP is physiologically expressed in urine of healthy cats as well (Fig. 1C, white column). In contrast, we found a significant decrease of I-FABP levels to only one half of the physiological amount in urine of FIC diseased cases, indicating a loss of I-FABP in FIC (Fig. 1C, black column).

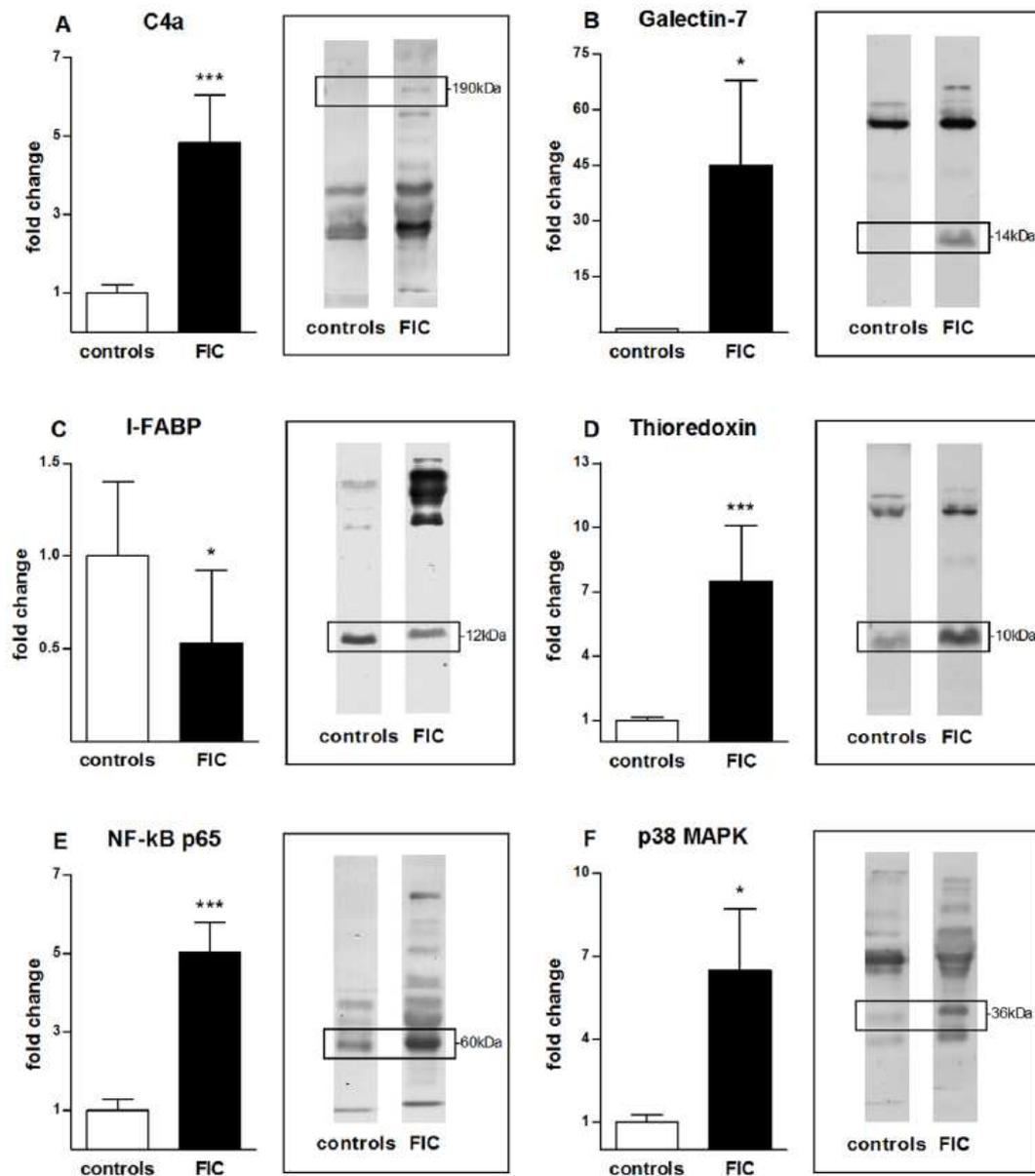
**Thioredoxin and the signal transduction molecules NF- $\kappa$ B p65 and p38 MAPK are upregulated in FIC diseased urine.** Thioredoxin is a small redox-regulating protein that belongs to the thioredoxin family and plays a role in a wide variety of biological functions e.g. in oxidative stress [19]. We quantified the signal intensity of thioredoxin in urine of healthy (Fig. 1D, white column) and FIC diseased cases (Fig. 1D, black column). An average increase by a factor of 7.5 in the majority of FIC samples compared to healthy control samples could be observed. Since thioredoxin was significantly upregulated in urine of FIC affected cases, we next were interested which signal transduction pathways were changed in disease. Therefore, we examined the downstream molecules NF- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B pathway) and p38 MAPK (MAPK pathway) [20–21]. Interestingly, we found a 5-fold increased concentration of NF- $\kappa$ B p65 in almost every urine sample of FIC affected cases (Fig. 1E, black column) compared to healthy control urines (Fig. 1E, white column). Moreover, quantification of p38 MAPK expression showed an average upregulation by factor 6.5 in FIC urine (Fig. 1F, black column) in contrast to physiological p38 MAPK concentration in healthy control urine (Fig. 1F, white column).

### Expression of Fibronectin and its Potential Interacting Partners in Target Tissue of FIC Cases and Healthy Controls

To examine the physiological expression of identified co-purified proteins of fibronectin, we investigated candidate expression patterns with immunohistochemical methods (Fig. 2A, H&E staining, Fig. 3, fluorescent double staining and Fig. 4, left panel). Then, we analyzed appearance of protein partners under FIC condition (Fig. 2B, H&E staining, Fig. 4 right panel). Representative staining of FIC affected bladder tissue with H&E showed marked destruction of normal bladder wall physiology (Fig. 2A) compared to the characteristic architecture of healthy bladder tissue (Fig. 2B).

**I-FABP and thioredoxin co-localize with the interstitial cell marker CD117 in the lamina propria mucosae.** In order to define the specific localization of all candidates under normal condition and to demonstrate the association to certain structures of the bladder tissue (Fig. 3A), we performed immunohistochemical double staining of co-purified proteins with interstitial cell marker CD117, which was markedly expressed in the umbrella and epithelial cells of the transitional cell epithelium as well as in the interstitial cells of the lamina propria mucosae (Fig. 3B). C4a and CD117 overlay could be observed in the urothelial cells as well as a scattered expression in the interstitial cells of the subepithelial layer (Fig. 3C). Galectin-7 only showed an overlay with CD117 in the umbrella cells of the transitional cell epithelium of the healthy bladder and co-localized in the urothelial cells (Fig. 3D). Besides a clear overlay of I-FABP and CD117 in the transitional cell epithelium, an additional co-localization in the interstitial cells of the lamina propria and a separate expression of I-FABP extracellularly could be seen (Fig. 3E). Thioredoxin expression overlapped with CD117 in the epithelial cells of the urothelium as well as in the interstitial cells of the lamina propria (Fig. 3F).

**C4a expression decreases whereas galectin-7 shows a distinct increase of signal intensity in the transitional cell epithelium of FIC cases.** In comparison to physiological fibronectin expression in healthy bladder tissues (Fig. 4A) and loss of fibronectin in FIC diseased tissues (Fig. 4B), C4a was primarily associated to the apical transitional cell epithelium in physiological condition (Fig. 4C), whereas, similar to fibronectin, an absence of C4a expression from bladders of FIC cases was detected (Fig. 4D).



**Figure 1. Quantification of signal intensities of co-purified candidate proteins of healthy and FIC diseased cases.** Western blot signal intensity of healthy controls (white columns, left,  $n = 20$ ) and diseased urine samples (grey columns, right,  $n = 16$ ) were compared for the following co-purified proteins: Complement component 4a (C4a) (A), galectin-7 (B), fatty acid-binding protein, intestinal (I-FABP) (C), thioredoxin (D), NF- $\kappa$ B p65 (E) and p38 MAPK (F). The according Western blot strips visualize the quantitative difference of signal intensities. The left strips show representative control blots, the right ones blots with FIC urine. The corresponding band sizes are displayed in black boxes. Signals were quantified by densitometry and statistical significance was calculated using the Mann-Whitney test. Data are represented in a column bar graph as means with SEM. Expression level of C4a (A) shows a significant ( $***p \leq 0.001$ ) increase in urine of FIC diseased cases with an almost 5-fold higher concentration compared to urine of healthy controls. Galectin-7 (B) is significantly ( $*p \leq 0.05$ ) upregulated in FIC diseased samples compared to healthy control samples with a 45-fold higher expression in FIC affected cases. Quantification of I-FABP expression (C) results in a significant ( $*p \leq 0.05$ ) decrease in urine of FIC cases compared to urine of healthy controls. Thioredoxin (D) is significantly ( $***p \leq 0.001$ ) increased by a factor of 7.5 in FIC compared to urine of controls.

Abundances of NF- $\kappa$ B p65 (E) significantly ( $***p \leq 0.001$ ) increase in diseased specimens compared to healthy specimens with a 5-fold higher expression just as p38 MAPK (F) showing a 6.5-fold higher expression ( $*p = 0.05$ ) in FIC diseased urines in comparison to healthy control urines. doi:10.1371/journal.pone.0051391.g001

Galectin-7 showed a considerable change in the expression of healthy bladder tissues (Fig. 4E) compared to FIC affected tissues (Fig. 4F): a slight signal intensity in the transitional cell epithelium and around blood vessels in the subepithelial tunic of healthy urinary bladders (Fig. 4E), with an obvious increase of galectin-7 expression in FIC diseased bladder tissues in the cytoplasm of cells of the transitional epithelium (Fig. 4F).

**I-FABP and thioredoxin are both expressed in the urinary bladder tissue of healthy controls whereas thioredoxin shows a distinct loss of signal intensity in FIC diseased bladders.** I-FABP was expressed throughout all layers of healthy urinary bladder tissues with a clear reactivity in the transitional cell epithelium (Fig. 4G). In FIC affected tissues (Fig. 4H), loss of signal intensity was visible in all tunics of the urinary bladders.

Thioredoxin was detected in even amounts in all tunics of healthy bladders (Fig. 4I). In FIC cases (Fig. 4J), all tunics of the urinary bladders showed a decrease of reactivity of thioredoxin with a marked leakage into the bladder lumen.

**Fibronectin and its interactor thioredoxin are colocalized in the subepithelial and muscular tunics of healthy bladder tissues.** A coexpression for fibronectin and thioredoxin could be demonstrated in the lamina propria mucosae and the muscle tunic in healthy urinary bladders (Fig. 5A). Additionally, fibronectin was mainly present in the extracellular matrix (ECM), whereas thioredoxin could be found in the cytoplasm of cells. We also observed a distinct leakage of signal intensity of both molecules in all layers of FIC diseased tissues (Fig. 5B) with a loss of coexpression in the subepithelial and muscular tunics.

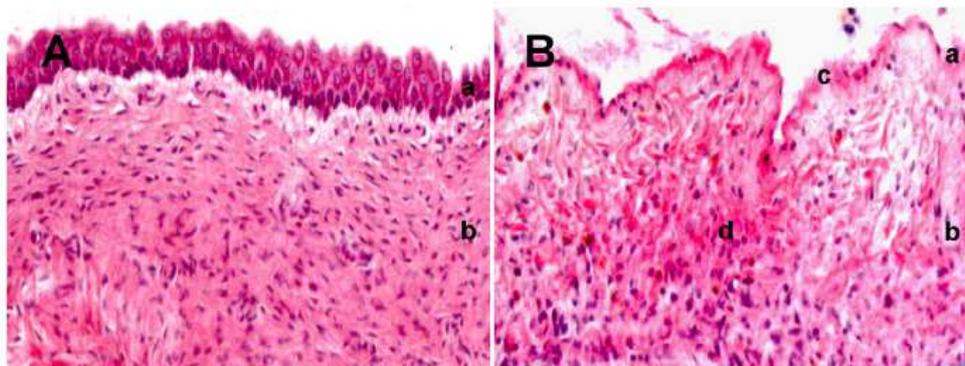
**NF- $\kappa$ B p65 and p38 MAPK clearly appear in FIC affected tissues.** Quantification of Western blot analyses showed a distinct upregulation of thioredoxin as well as the signal transduction molecules NF- $\kappa$ B p65 and p38 MAPK in urine of FIC cases (Fig. 1E and 1F). We performed immunohistochemical double labelling of thioredoxin and either NF- $\kappa$ B p65 or p38 MAPK to investigate the connection between thioredoxin and related signal transduction cascades in urinary bladder tissues of healthy and

diseased cases. Although thioredoxin was expressed in all tunics of the healthy urinary bladders (Fig. 5C), NF- $\kappa$ B p65 was not detectable in any layer of healthy bladder. Interestingly, thioredoxin was almost absent in FIC diseased sections (Fig. 5D) except for a weak signal in the transitional cell epithelium and the lamina propria of the bladder tissues. In contrast, NF- $\kappa$ B p65 was clearly expressed in the subepithelial tunic of FIC bladders. Interestingly, a focal colocalization of NF- $\kappa$ B p65 and thioredoxin could be seen in the lamina propria of FIC diseased bladder tissues at NF- $\kappa$ B p65 expression sites. P38 MAPK showed a slight expression in healthy bladder tissues in the transitional cell epithelium and the lamina propria mucosae (Fig. 5E). In FIC affected tissues, p38 MAPK was clearly expressed in the cytoplasm of the umbrella cells of the transitional cell epithelium as well as in a scattered pattern around cell nuclei in the subepithelial and muscular tunics, without a co-localization (Fig. 5F).

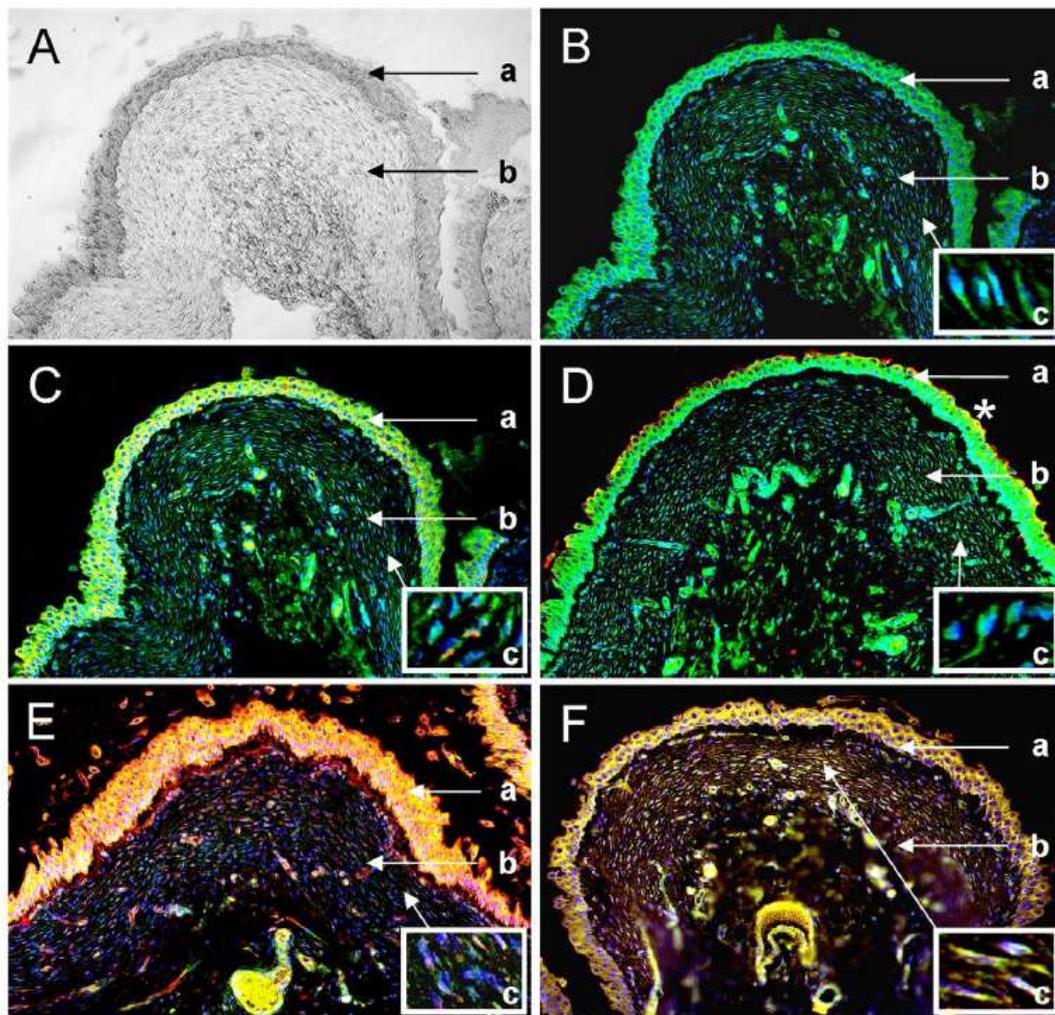
## Discussion

IC/painful bladder syndrome is a common human disease with a burdensome character that leads to an adverse impact on quality of life for affected people [22]. The only spontaneous animal model for IC in humans is currently the feline type of urinary tract disorder. Besides similarities in the clinical appearance and the spontaneous occurrence of both diseases, there are many comparable pathological alterations that indicate the high transferability and relevant input of FIC and IC research [23]. Regarding this, we focussed our study on the protein interaction network of fibronectin in FIC diseased cases to elucidate possible pathomechanisms in the development of this disorder.

To identify potential interacting partners of fibronectin in diseased urine, we performed co-immunoprecipitation followed by mass spectrometry analysis. This approach was successful and numerous co-purified proteins of fibronectin could be discovered (Table 1). We closely examined four candidates of the co-purified proteins and verified their expression patterns in urine of a cohort of healthy and FIC cases (Fig. 1). Furthermore, we investigated



**Figure 2. H&E staining of normal feline bladder (A) and FIC diseased bladder (B).** Histological sections stained with Haematoxylin and Eosin. Healthy urinary bladder section (A) shows characteristic architecture compared with FIC diseased bladder tissue (B), where a loss of normal bladder wall physiology can be seen. Notice the marked loss of transitional cell epithelium, the intramucosal bleeding and oedema in the FIC section (B). a = Transitional cell epithelium, b = Lamina propria mucosae, c = Loss of transitional cell epithelium, d = Intramucosal bleeding and oedema. doi:10.1371/journal.pone.0051391.g002



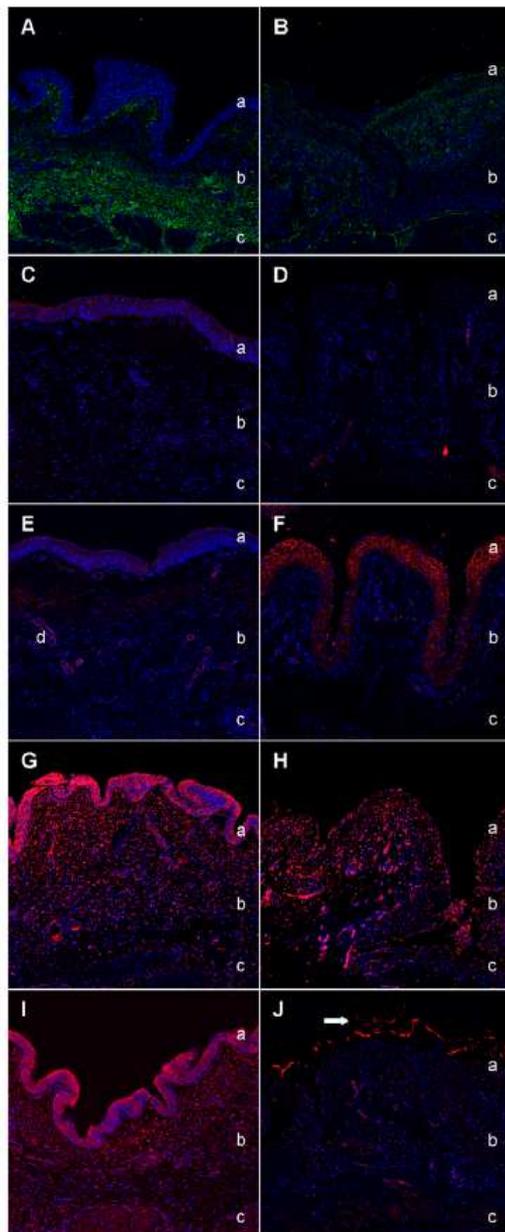
**Figure 3. Expression of co-purified proteins in healthy bladder tissue.** Immunohistochemical double labeling of CD117 and co-purified proteins in a representative healthy bladder tissue. DIC image of healthy bladder tissue (A). CD117 (green) shows a marked reactivity in the epithelial cells of the urothel and in the interstitial cells of the lamina propria of the healthy bladder (B). Overlay image of C4a (red) and CD117 (green) reveals considerable co-localization (overlapping results in yellow colour) at the cell nuclei of the urothelial cells and a scattered expression in the interstitial cells of the lamina propria (C). Galectin-7 (red) and CD117 (green) show a co-localization in the umbrella cells (marked with an asterisk) of the transitional cell epithelium, whereas reactivity of both proteins in the epithelial cells of the urothel indicate a co-expression. Cells of the lamina propria are only CD117 positive (D). I-FABP (red) and CD117 (green) overlay is visible only in the interstitial cells of the lamina propria. Additionally, I-FABP reactivity is seen extracellularly and is distinctly expressed in the basal membrane (E). Thioresdoxin (red) and CD117 (green) co-localize distinctly at all cell nuclei of the transitional epithelial cells and in the interstitial cells of the subepithelial tunic (F). The blue colour reveals staining of cell nuclei (DAPI). a = Transitional cell epithelium, b = Lamina propria mucosae, c = Inserted box shows magnification of respective cells in the lamina propria mucosae.

doi:10.1371/journal.pone.0051391.g003

their physiological expression and specific localization in relation to interstitial cell markers in healthy bladder tissues and their expression patterns under FIC condition with immunohistochemical methods (Fig. 3 and 4).

A candidate closely examined was C4a, a member of the complement cascade [24]. Several studies previously investigated

the involvement of complement in the pathogenesis of human IC [25–27]. A significant depletion of C4 in serum of IC patients could be found suggesting an involvement of a chronic local immunological process in the pathogenesis of this disease [25]. Higher amounts of urinary C4a in FIC cases could be the result of a significant increase of serum levels in FIC. However, fibronectin



**Figure 4. Expression pattern of fibronectin and its co-purified proteins in healthy and diseased bladder tissue.** Urinary bladder expression of fibronectin (green) and its co-purified proteins (red) in a representative healthy (left panels) and FIC diseased bladder (right panels). Physiological distribution of fibronectin (green) in healthy bladder (A). Extracellular matrix of the lamina propria mucosae and the muscle tunic show a distinct immunoreactivity for fibronectin, whereas a loss in FIC affected bladder tissue (B), especially in the subepithelial

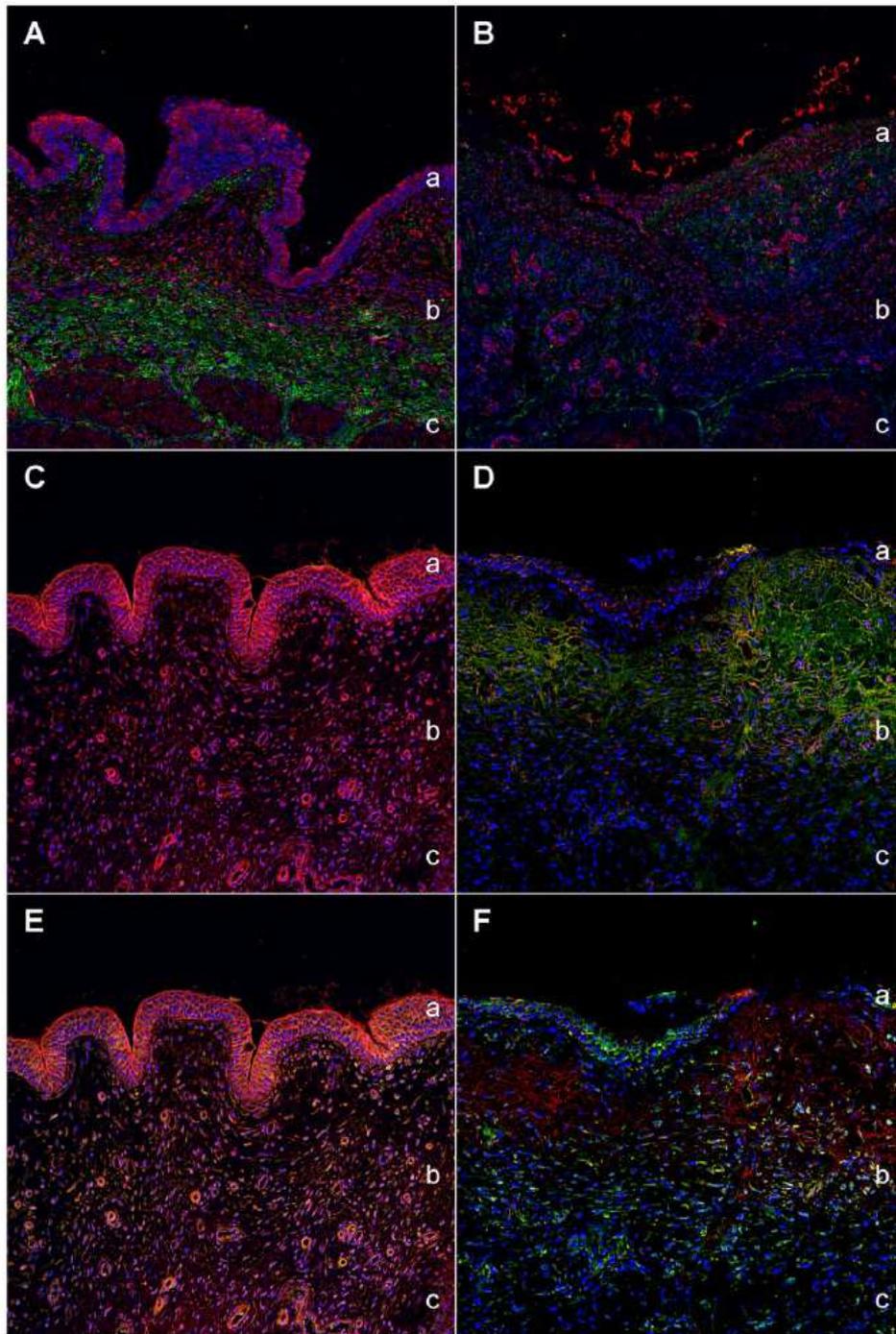
and muscular tunics, is evident. C4a (red) is moderately expressed in the apical transitional cell epithelium of the physiological bladder (C) and disappears in the FIC affected bladder tissue (D). Galectin-7 (red) is expressed especially in umbrella cells of the transitional epithelium and around blood vessels in the lamina propria under normal condition (E). In contrast, expression changes profoundly in FIC affected bladders to distinct expression in the transitional cell epithelium (F). Reactivity of I-FABP (red) throughout all tunics in healthy bladder (G) almost disappears in FIC diseased tissue (H). Thioredoxin (red) reveals a predominant signal in the entire healthy bladder tissue (I) compared to a leakage of thioredoxin into the lumen (arrow) of FIC affected bladder tissue resulting in a slight immunoreactivity of the diseased bladder tissue (J). The blue colour reveals staining of cell nuclei (DAPI). a = Transitional cell epithelium, b = Lamina propria mucosae, c = Muscle tunic, d = Normal vessel.

doi:10.1371/journal.pone.0051391.g004

was recently reported to be increased in the urine of FIC cats due to leakage from damaged urinary bladder tissue [15]. Therefore, the observed decreased abundance of C4a in FIC affected bladder tissue (Fig. 4C and D), but increased abundance in urine of diseased cases (Fig. 1A) could both be resulting from cell death and tissue damage. Helin et al. elucidated the impact of complement to the development of tissue injury and the chronic self-perpetuating inflammation typical for IC [27]. Under physiological conditions complement activation is well-controlled, whereas pathological alteration accelerates its activation due to stimuli such as tissue injury [28]. For this reason, we presume that in the case of FIC, tissue damage of affected bladders cause an augmented activation of the complement system and an increased abundance of peptide mediators like C4a in the inflammatory process, which in return leak into the urine through the damaged, hyper-permeable urinary bladder wall. Furthermore, intense C4a activation could generate a more excessive inflammatory response than necessary to eliminate underlying damage and therefore play a role in the chronic and relapsing character of the disease.

A very interesting co-purified protein of fibronectin identified in this study is galectin-7, which was only present in urine of FIC cases but not in control urine (Fig. 1B). Galectin-7 is mainly distributed in stratified squamous epithelium in various tissues and its functions include cell-to-cell adhesion, cell-matrix interaction, growth regulation and apoptosis [29]. In this study, a physiological presence of galectin-7 in the transitional epithelium and around blood vessels in the subepithelial tunic could be demonstrated in healthy bladder tissues where it co-localizes with CD117, a protein expressed by interstitial cells of Cajal in the transitional cell epithelium of the lower urinary tract (Fig. 3D and 4E) [30]. Interestingly, FIC diseased bladder tissues showed an increase of galectin-7 signal intensity in the transitional epithelium (Fig. 4F). Galectin-7 plays a crucial role in reepithelialisation of corneal [31], epidermal wounds [32] and in wound repair of polarized kidney cells [33]. An increased abundance in the transitional cell epithelium of FIC diseased bladders indicates an upregulation of this protein due to loss of physiological structure of the bladder [15]. We believe that galectin-7 plays an important role in wound healing and reepithelialisation of the impaired tissue in FIC cases as well. Furthermore, the extent of acceleration of the reepithelialisation of galectin-7 in corneal wounds was greater than that of growth factors [31]. Moreover, the clinical potential of galectin-7 seems to be more attractive than that of growth factors due to absent cell mitosis in epithelial cells [34]. On this account, galectin-7 could be of greatest interest for developing novel therapeutic strategies for treatment of FIC and thus also IC.

Fibrosis has recently been proposed to play an important role in the pathogenesis of FIC [15]. Furthermore, the primary cause of fibrotic disease has been suggested to be an uncontrolled



**Figure 5. Immunohistochemical double labelling of candidates in healthy (left panels) and diseased bladder tissue (right panels).** Immunohistochemical double staining of a healthy urinary bladder (A) shows considerable colocalization of fibronectin (green) and its interactor thioredoxin (red) in the subepithelial and muscular tunics. In contrast, lack of green and red colour is evident in FIC (B), indicating a loss of both fibronectin and thioredoxin from its normal distribution in healthy bladder tissue. Overlay image of thioredoxin (red) and NF- $\kappa$ B p65 (green) in a healthy bladder tissue (C) shows a predominant signal of thioredoxin in all tunics of the bladder, whereas NF- $\kappa$ B p65 is not detectable in any tunic of the healthy bladder. In contrast, thioredoxin and NF- $\kappa$ B p65 colocalize (overlapping results in yellow colour) in the lamina propria mucosae with the highest expression in the extracellular matrix of FIC diseased bladder tissue (D). P38 MAPK signal is of moderate intensity localized in transitional epithelium cells and around few blood vessels in the healthy bladder tissue (E). Note that the signal is exclusively of yellow colour indicating a colocalization with thioredoxin, whereas a green colour signal is not visible at all. In contrast, p38 MAPK (green) was highly expressed in the cytoplasm of umbrella cells of the transitional cell epithelium as well as a scattered expression around cell nuclei in the subepithelial and muscular tunics of FIC diseased bladder sections without distinct colocalization (F). The blue colour reveals staining of cell nuclei (DAPI). a= Transitional cell epithelium, b= Lamina propria mucosae, c= Muscular tunic.  
doi:10.1371/journal.pone.0051391.g005

differentiation of fibroblasts into myofibroblasts [35]. A novel study investigated the impact of galectins on the formation of the ECM demonstrating a galectin-7 dependent stimulation of myofibroblast formation and a marked production of a three-dimensional network of fibers containing fibronectin [36]. These findings provide an interesting insight into the pathogenesis of disorders engrained by their fibrotic character such as FIC and is consistent with the findings of our study. In this context, galectin-7 could serve as a positive regulator of tissue fibrosis preventing uncontrolled ECM formation as a result of chronically relapsing inflammation in FIC affected tissue.

A further protein that we identified as a possible binding partner of fibronectin is I-FABP. Several studies described the beneficial use of I-FABP as a urinary marker for intestinal injuries such as during or after acute ischemic diseases [37–38] as well as urothelial carcinomas of the upper urinary tract [39]. We found a reduction of I-FABP in urine of FIC diseased cases by 50% compared to the physiological amount in healthy (Fig. 1C). We furthermore demonstrated a high abundance of I-FABP in all layers of the bladders, especially in the transitional epithelium (Fig. 4G) and a lack of I-FABP in FIC tissues (Fig. 4H) as well as a correlation of I-FABP to interstitial cells of the lamina propria (Fig. 3E). A loss of I-FABP in transitional epithelium of diseased tissues might be the result of an absence of cellular tissue. However, I-FABP concentration was also decreased in urine of FIC cases. Interestingly, Halldén et al. reported that I-FABP expression in intestinal epithelial cells is regulated by factors present in the extracellular matrix such as fibronectin [40]. The decreased concentration of fibronectin in the bladder tissue due to an increased bladder permeability [15] could thus be the trigger for downregulation of I-FABP expression. Since the exact pathways are still unclear, further studies are necessary to elucidate I-FABP function in urinary bladder tissue as well.

Another candidate protein identified by mass spectrometry that seems to be of great significance is thioredoxin. Thioredoxin is important for many biological functions, such as defense against oxidative stress and regulation of apoptosis [41]. In this study, a significantly higher concentration of thioredoxin in urine of FIC affected cats compared to urine of healthy controls could be demonstrated (Fig. 1D). We also verified thioredoxin expression in the transitional cell epithelium, especially in umbrella cells, of healthy urinary bladder tissue (Fig. 3F). Increased abundance of thioredoxin in response to oxidative stress and a protective role of thioredoxin were already reported in renal ischemia/reperfusion injury inducing secretion of thioredoxin into the urine [42]. The authors suggested an excretion that is not due to leakage from dead cells since total protein levels were unchanged in the urine after reperfusion [42]. Thus, higher amounts of thioredoxin in urine of FIC cases could be caused by hypoxia in the kidneys as a result of obstruction of the lower urinary tract. However, distinct immunohistochemical staining of thioredoxin in control tissues

(Fig. 4I) and a loss of signal intensity in all tunics of diseased bladders (Fig. 4J) argue against this hypothesis. Thioredoxin was shown to be over-expressed in bladders of urinary outlet obstructed rats [43]. Furthermore, a recent study experimentally induced IC in rats subsequent to exposure to oxidative stress using bladder instillation of a nitric oxide donor gel [44]. We therefore assume that the urinary bladder of FIC diseased cases is subject to apoptosis. As a consequence, injured tissue cells could secrete cytoplasmic thioredoxin into the urine where it operates as protector against oxidative stress. In accordance to previous reports, these findings are suggesting a protective role of extracellularly injected recombinant human thioredoxin on injury, for example in the case of neuronal cells induced by ischemia/reperfusion [45]. Thioredoxin may therefore be a promising candidate for therapeutics to improve the prognosis and development of FIC as well as of its human counterpart, IC.

To understand the relationship between fibronectin and its potential interacting proteins, we performed immunohistochemical double labelling to determine the expression patterns of fibronectin in association with thioredoxin. We could demonstrate a colocalization of fibronectin and thioredoxin in the subepithelial and muscular tunics of the healthy bladder (Fig. 5A), whereas colocalization disappeared in FIC tissues (Fig. 5B). Interestingly, a previous study investigating the effect of thioredoxin reductase 1 (TrxR1) silencing on gene expression in HepG2 cells identified a regulation of fibronectin 1 gene [46]. However, to which extent the interaction of fibronectin and thioredoxin takes place is still unclear.

Regarding biological functions of thioredoxin, a further important role is the redox regulation of transcription factors such as NF- $\kappa$ B [41]. Immunohistochemical localization experiments of NF- $\kappa$ B in bladder biopsies from patients with IC showed a predominant activation in bladder urothelial cells and cells of the submucosal layer in biopsies from patients with IC compared to a diffuse and faint staining in control samples [47]. These findings are consistent with our colocalization results of thioredoxin and NF- $\kappa$ B in bladder tissue of healthy (Fig. 5C) and FIC cases (Fig. 5D). In addition, we found a significantly higher concentration of NF- $\kappa$ B in urine of FIC cases (Fig. 1E). Research on NF- $\kappa$ B-dependent processes in the pathogenesis of IC revealed an interesting NF- $\kappa$ B-regulated increase of proinflammatory cytokine gene products in the urine of IC patients in comparison to controls suggesting a perpetuation of NF- $\kappa$ B activation via a positive regulatory loop [48]. We could demonstrate an interaction of thioredoxin and NF- $\kappa$ B in FIC tissues which is supposed to play a crucial role in the pathogenesis of this disease. NF- $\kappa$ B activation could reinforce proinflammatory cytokine expression in the development of FIC. In turn, NF- $\kappa$ B-regulated circulation of proinflammatory factors in combination with an increased concentration of thioredoxin could therefore reinforce NF- $\kappa$ B stimulation. This pathway could pose a vicious circle in the

pathogenesis of the disease and could lead to a chronic inflammatory response underlying the relapsing nature of FIC.

Another signal transduction pathway we were interested in is the p38 MAPK pathway. Previous studies identified thioredoxin as a negative regulator of the p38 MAPK pathway, which plays a role in apoptosis regulation [21,49]. Moreover, p38 MAPK is well known to be upregulated in urinary bladder cancer cells playing a crucial role in tumour growth and progression [50]. In our study, comparison of the concentration of urinary p38 MAPK in healthy and FIC diseased specimens revealed a 6.5-fold higher concentration in diseased urine (Fig. 1F). Furthermore, we could demonstrate that in contrast to the low expression of p38 MAPK in healthy tissues in transitional epithelium and subepithelial tunics (Fig. 5E), p38 MAPK showed considerably higher expression in FIC tissues (Fig. 5F). Interestingly, immunohistochemical double staining of thioredoxin and p38 MAPK revealed almost no colocalization in FIC affected bladder tissues. This could be resulting from an inhibitory effect of thioredoxin expression on p38 MAPK under FIC conditions interfering with cytokine- and stress-induced apoptosis. However, loss of thioredoxin into the urine could exhibit a negative factor in the progression of the disease.

## References

- Westropp JJ, Buffington CA (2002) In vivo models of interstitial cystitis. *J Urol* 167: 694–702.
- Gunn-Moore DA (2003) Feline lower urinary tract disease. *J Feline Med Surg* 5: 133–138.
- Lavelle JP, Meyers SA, Ruiz WG, Buffington CA, Zeidel ML, et al. (2000) Urothelial pathophysiological changes in feline interstitial cystitis: a human model. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F540–F553.
- Buffington CA, Chew DJ, Woodworth BE (1999) Feline interstitial cystitis. *J Am Vet Med Assoc* 215: 682–687.
- Nordling J, Fall M, Hanno P (2011) Global concepts of bladder pain syndrome (interstitial cystitis). *World J Urol*.
- Buffington CA (2011) Idiopathic cystitis in domestic cats—beyond the lower urinary tract. *J Vet Intern Med* 25: 784–796.
- Kruger JM, Osborne CA, Lulich JP (2009) Changing paradigms of feline idiopathic cystitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 39: 15–40.
- Larson J, Kruger JM, Wise AG, Kaneene JB, Miller R, et al. (2011) Nested case-control study of feline calicivirus viraemia, oral carriage, and serum neutralizing antibodies in cats with idiopathic cystitis. *J Vet Intern Med* 25: 199–205.
- Hanno P, Dmochowski R (2009) Status of international consensus on interstitial cystitis/bladder pain syndrome/painful bladder syndrome: 2008 snapshot. *NeuroUrol Urodyn* 28: 274–286.
- Dasgupta J, Tincello DG (2009) Interstitial cystitis/bladder pain syndrome: an update. *Maturitas* 64: 212–217.
- Keay S, Zhang CO, Kagen DI, Hise MK, Jacobs SC, et al. (1997) Concentrations of specific epithelial growth factors in the urine of interstitial cystitis patients and controls. *J Urol* 158: 1983–1988.
- Ogawa T, Honma T, Igawa Y, Seki S, Ishizuka O, et al. (2010) CXCR3 binding chemokine and TNFSF14 over expression in bladder urothelium of patients with ulcerative interstitial cystitis. *J Urol* 183: 1206–1212.
- Saban R, Saban MR, Maier J, Fowler B, Tengowski M, et al. (2008) Urothelial expression of neuropilin and VEGF receptors in control and interstitial cystitis patients. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F1613–F1623.
- Lemberger SI, Dorsch R, Hauck SM, Amann B, Hirner S, et al. (2011) Decrease of Trefol factor 2 in cats with feline idiopathic cystitis. *BJU Int* 107: 670–677.
- Lemberger SI, Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Hirner S, et al. (2011) Comparison of urine protein profiles in cats without urinary tract disease and cats with idiopathic cystitis, bacterial urinary tract infection, or urolithiasis. *Am J Vet Res* 72: 1407–1415.
- Martino MM, Tortelli F, Mochizuki M, Traub S, Ben-David D, et al. (2011) Engineering the growth factor microenvironment with fibronectin domains to promote wound and bone tissue healing. *Sci Transl Med* 3: 100va189.
- Pankov R, Yamada KM (2002) Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115: 3861–3863.
- Pelers MM, Namiot Z, Kisilewski W, Namiot A, Januszkiewicz M, et al. (2003) Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem* 36: 529–535.
- Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, et al. (1998) Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J Exp Med* 188: 1445–1451.
- Yoshioka J, Schreier ER, Lee RT (2006) Role of thioredoxin in cell growth through interactions with signaling molecules. *Antioxid Redox Signal* 8: 2143–2151.
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, et al. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 17: 2596–2606.
- Clemens JQ, Link CL, Eggers PW, Kusek JW, Nyberg LM, Jr, et al. (2007) Prevalence of painful bladder symptoms and effect on quality of life in black, Hispanic and white men and women. *J Urol* 177: 1390–1394.
- Bjoding DE, Wang ZY, Bushman W (2011) Models of inflammation of the lower urinary tract. *NeuroUrol Urodyn* 30: 673–682.
- Hugli TE (1984) Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer Semin Immunopathol* 7: 193–219.
- Mattila J, Harnoinen A, Hallstrom O (1983) Serum immunoglobulin and complement alterations in interstitial cystitis. *Eur Urol* 9: 350–352.
- Steinert BW, Diokno AC, Robinson JE, Mitchell BA (1994) Complement C3, eosinophil cationic protein and symptom evaluation in interstitial cystitis. *J Urol* 151: 350–354.
- Helin H, Mattila J, Rantala I, Vaadasi T (1987) In vivo binding of immunoglobulin and complement to elastic structures in urinary bladder vascular walls in interstitial cystitis: demonstration by immunoelectron microscopy. *Clin Immunol Immunopathol* 43: 88–96.
- Zhou W (2011) The new face of anaphylatoxins in immune regulation. *Immunobiology*.
- Sausez S, Kiss R (2006) Galectin-7. *Cell Mol Life Sci* 63: 686–697.
- McCloskey KD (2010) Interstitial cells in the urinary bladder—localization and function. *NeuroUrol Urodyn* 29: 82–87.
- Cao Z, Said N, Wu HK, Kuwabara I, Liu FT, et al. (2003) Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration. *Arch Ophthalmol* 121: 82–86.
- Klima J, Laciná I, Dvorankova B, Herrmann D, Carnswath JW, et al. (2009) Differential regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration. *Physiol Res* 58: 873–884.
- Rondanino C, Poland PA, Kinlough CL, Li H, Rhaibi Y, et al. (2011) Galectin-7 modulates the length of the primary cilia and wound repair in polarized kidney epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F622–F633.
- Schultz G, Khaw PT, Oxford K, MacCauley S, Van Setten G, et al. (1994) Growth factors and ocular wound healing. *Eye (Lond)* 8 (Pt 2): 184–187.
- Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH (1994) Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 145: 114–125.
- Dvorankova B, Szabo P, Laciná I, Gal P, Uhrova J, et al. (2011) Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. *Cells Tissues Organs* 194: 469–480.
- Gollin G, Marks C, Marks WH (1993) Intestinal fatty acid binding protein in serum and urine reflects early ischemic injury to the small bowel. *Surgery* 113: 545–551.

38. Thuijls G, van Wijck K, Grootjans J, Derix JP, van Bijnen AA, et al. (2011) Early diagnosis of intestinal ischemia using urinary and plasma fatty acid binding proteins. *Ann Surg* 253: 303–308.
39. Ho CL, Tsai TS, Chen JC, Tsai HW, Cheng HL, et al. (2008) The molecular signature for urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *J Urol* 179: 1155–1159.
40. Hallden G, Holchouse EL, Dong X, Aponte GW (1994) Expression of intestinal fatty acid binding protein in intestinal epithelial cell lines, hBRIE 380 cells. *Am J Physiol* 267: G730–743.
41. Holmgren A, Lu J (2010) Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun* 396: 120–124.
42. Kasuno K, Nakamura H, Ono T, Muso E, Yodoi J (2003) Protective roles of thioredoxin, a redox-regulating protein, in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 64: 1273–1282.
43. Kim HJ, Sohg I, Kim DH, Lee DC, Hwang CH, et al. (2005) Investigation of early protein changes in the urinary bladder following partial bladder outlet obstruction by proteomic approach. *J Korean Med Sci* 20: 1000–1005.
44. Palma TF, Seabra A, Souto SC, Maciel L, Alvarenga M, et al. (2011) [A new experimental model for inducing interstitial cystitis by oxidative stress using bladder instillation of a nitric oxide donor gel]. *Actas Urol Esp* 35: 253–258.
45. Hori K, Katayama M, Sato N, Ishii K, Waga S, et al. (1994) Neuroprotection by gfal cells through adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin (ADF/TRN). *Brain Res* 652: 304–310.
46. Goreta F, Rumfola TP, VanMeter AJ, Barzaghi D, Chandhoke V, et al. (2005) Identification of thioredoxin reductase 1-regulated genes using small interference RNA and cDNA microarray. *Cancer Biol Ther* 4: 1079–1088.
47. Abdel-Mageed AB, Ghoniem GM (1998) Potential role of rel/nuclear factor-kappaB in the pathogenesis of interstitial cystitis. *J Urol* 160: 2000–2003.
48. Abdel-Mageed AB, Bajwa A, Shenassa BB, Human L, Ghoniem GM (2003) NF-kappaB-dependent gene expression of proinflammatory cytokines in T24 cells: possible role in interstitial cystitis. *Urol Res* 31: 300–305.
49. Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Furuchi S, Maruoka S, et al. (1999) Thioredoxin negatively regulates p38 MAP kinase activation and IL-6 production by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 443–447.
50. Kumar B, Sindair J, Khandrika L, Koul S, Wilson S, et al. (2009) Differential effects of MAPKs signaling on the growth of invasive bladder cancer cells. *Int J Oncol* 34: 1557–1564.

## IV. DISKUSSION

Die FIC ist die häufigste Ursache für Symptome der unteren Harnwege bei Katzen (LEKCHAROENSUK et al., 2001; GERBER et al., 2005; DEFAUW et al., 2011). Aufgrund des chronisch rezidivierenden Charakters und der hochgradigen Schmerzhaftigkeit akuter Entzündungsschübe ist der Leidensdruck erkrankter Tiere hoch, was nicht zuletzt dazu führt, dass die häufig noch jungen Katzen euthanasiert werden (PATRONEK et al., 1996). Aufzeichnungen über diese idiopathische Form der unteren Harnwegserkrankungen existieren in der Veterinärmedizin seit fast zwei Jahrzehnten, jedoch konnten bisher weder die ätiologischen Hintergründe noch die beteiligten Pathomechanismen dieser Erkrankung vollständig aufgeklärt werden (BUFFINGTON & CHEW, 1995; BUFFINGTON et al., 1996b; KRUGER et al., 2009). Auch die Diagnose der idiopathischen Zystitis der Katzen gestaltet sich schwierig, da sie lediglich durch den Ausschluss anderer Ursachen unterer Harnwegssymptomatik und durch charakteristische zystoskopische Befunde gestellt werden kann (BUFFINGTON et al., 1999a).

Die FIC ist nicht nur für die Veterinärmedizin von Bedeutung, sondern leistet auch einen Beitrag zu der humanmedizinischen Zystitisforschung. Die Katze ist bislang die einzige bekannte Spezies, bei der eine der humanen IC vergleichbare Erkrankung natürlich vorkommt und die somit als spontanes Tiermodell für die humane Zystitisforschung von Bedeutung ist (BUFFINGTON et al., 1997b; BJORLING et al., 2011). Die zugrundeliegende Ursache der IC konnte bisher ebenso wenig wie die beteiligten Pathomechanismen eindeutig geklärt werden (NEUHAUS et al., 2011). Da auch in der Humanmedizin die Diagnosestellung schwierig ist, wird vermutet, dass es sich um eine Erkrankung handelt, die häufig nicht oder erst sehr spät in ihrem Verlauf festgestellt wird (NEUHAUS et al., 2011). Mechanistische Studien am Menschen zur Aufklärung pathophysiologischer Prozesse sind ethisch nicht vertretbar, weshalb Tiermodelle bei der Identifizierung Pathogenese-assoziiierter Mechanismen einen hohen Stellenwert haben (BJORLING et al., 2011). Eine experimentelle Zystitis wurde vor allem in Inzuchtlinien von Nagetieren, wie zum Beispiel Mäusen oder Ratten, als Tiermodell für die IC etabliert (BJORLING et al., 2011). Diese experimentellen Tiermodelle haben über die Jahre zu einem besseren Verständnis

der an der Entstehung der IC beteiligten Pathomechanismen geführt und die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien angeregt. Jedes dieser Tiermodelle hat jedoch einen entscheidenden Nachteil. Um einen der IC vergleichbaren Zustand zu erreichen, müssen exogene Substanzen in die Blase instilliert werden, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die natürlich vorkommende Zystitis beim Menschen limitiert (BJORLING et al., 2011). Hier bietet die sich spontan entwickelnde FIC bei Katzen für die Wissenschaft einen großen Vorteil und reproduziert zudem, wie kein anderes Tiermodell, in großem Umfang die Charakteristika der humanen IC (WESTROPP & BUFFINGTON, 2002). Die FIC weist zudem einen ähnlichen chronischen und rezidivierenden Charakter auf wie die IC des Menschen und liefert somit ein wesentlich größeres Potential, den Effekt von Stressoren auf den Verlauf der Erkrankung ebenso wie neue Therapiestrategien zu erforschen als andere Tiermodelle (WESTROPP & BUFFINGTON, 2002).

Die bis heute erschienenen wissenschaftlichen Studien zur Ätiologie und Pathogenese der idiopathischen Zystitis bei Katzen kamen allesamt zu dem Schluss, dass die FIC ein multifaktorielles Geschehen darstellt, welches unter anderem das Zielorgan Harnblase betrifft. Aus diesem Grund ist die Forschung bemüht, die in der Harnblase auftretenden pathohistologischen Abnormalitäten zu untersuchen und zu beurteilen (LAVELLE et al., 2000). Neben dem Harnblasengewebe stellt insbesondere der Urin für die Erforschung von Pathogenese-assoziierten Veränderungen ebenso wie für die Etablierung von neuen diagnostischen Hilfsmitteln eine wichtige Substanz dar, da er in großen Mengen leicht zu gewinnen und sehr stabil ist (DECRAMER et al., 2008). Nicht nur für Erkrankungen der Niere und des Urogenitaltrakts spielt Urin für die Wissenschaft eine wichtige informative Rolle, sondern er ist häufig auch bei der Untersuchung von pathologischen Zuständen außerhalb des Urogenitaltrakts verändert (DECRAMER et al., 2008). Die massenspektrometrische Analyse von Proteinen und Peptiden im Urin ist dabei von Bedeutung (DECRAMER et al., 2008). In jüngster Zeit wird vor allem aber auch die Validierung von Proteinbiomarkern im Urin in großen prospektiven Studien vorangetrieben (DECRAMER et al., 2008). Dabei gewinnt der systembiologische Ansatz für die Forschung immer mehr an Bedeutung. Dieser zielt auf die Erforschung aller molekularen Elemente eines biologischen Systems und die Erfassung von

Interaktionen und Netzwerken dieser Elemente (KOHL et al., 2010). Proteine können in verschiedenen funktionalen Gruppen und somit bei unterschiedlichen biologischen Mechanismen eine Rolle spielen (MONTI et al., 2009). Für das Verständnis der physiologischen und pathologischen Mechanismen und des Einflusses einzelner Proteine auf diese ist eine umfassende Kenntnis der Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung (VON MERING et al., 2007). Die vorliegende Studie befasste sich daher mit der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen und neuer potenzieller Proteinbiomarker im Urin von Katzen mit FIC im Vergleich zu gesunden Kontrollenkatzen mit Hilfe proteomischer Analysemethoden.

In der humanmedizinischen Forschung hat die Suche nach Proteinbiomarkern im Urin von Menschen mit IC in den letzten Jahren stark zugenommen. Bereits 1997 konnten Veränderungen in der Konzentration von Wachstumsfaktoren im Urin von Patienten mit IC im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt werden (KEAY et al., 1997). Eine Bedeutung dieser Proteine für die Pathophysiologie der Erkrankung konnte seither in verschiedenen Studien bestätigt werden (KEAY et al., 1997; KEAY et al., 2001a; KEAY, 2008; KIM et al., 2009; KIM & FREEMAN, 2011). Mittlerweile kennt man viele weitere Proteine im Urin von Patienten mit IC, die im Vergleich zu dem Urin gesunder Menschen veränderte Konzentrationen aufweisen, wie zum Beispiel das Eosinophile kationische Protein (LOSE et al., 1983), das Glykoprotein-51 (MOSKOWITZ et al., 1994; BYRNE et al., 1999) sowie verschiedene Entzündungsmediatoren (LOTZ et al., 1994; LUNDBERG et al., 1996; SMITH et al., 1996). Auch in der veterinärmedizinischen Wissenschaft hat die Suche nach Proteinen im Urin von Katzen mit FIC Einzug gehalten. In einer vorherigen Studie wurde mithilfe von SDS-PAGE, 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie erstmalig das Schleimhautschutz-Protein TFF2 im Urin und im Blasengewebe von Katzen identifiziert (LEMBERGER et al., 2011b). Katzen mit FIC zeigten im Vergleich zu gesunden Katzen eine deutlich geringere Konzentration im Urin, weswegen eine verringerte Regenerations- und Reparationsfähigkeit des Blasenepithels bei den erkrankten Katzen vermutet wird (LEMBERGER et al., 2011b). In einer weiteren Studie wurde ein weiteres Protein im Urin und Blasengewebe von Katzen mit FIC näher beleuchtet, das hochmolekulare Glykoprotein Fibronectin, das bei den betroffenen Katzen eine signifikant höhere Konzentration im Urin

aufwies als bei den gesunden, jedoch im Blasengewebe der Patienten mit FIC deutlich weniger vorhanden war als bei den Kontrolltieren (LEMBERGER et al., 2011a). Diese Veränderungen weisen auf eine im Blasengewebe stattfindende Fibrose hin und eine Erhöhung der Blasenwandpermeabilität, die zu einem Verlust von Fibronectin in den Urin führt. Beide Proteine liefern einen neuen und interessanten Einblick in die Pathomechanismen der FIC und könnten ferner als mögliche Proteinmarker im Urin von Katzen mit FIC zum Einsatz kommen. Die Suche nach möglichen an der Entstehung der FIC beteiligten Proteinen steht in der Veterinärmedizin noch am Anfang, und es bedarf weiterer Studien zur Aufklärung der bisher ätiologisch noch ungeklärten, jedoch häufig vorkommenden FIC.

In der vorliegenden Studie wurde zunächst mithilfe von Immunpräzipitation und Massenspektrometrie nach möglichen co-präzipitierenden Proteinen des ubiquitären Fibronectins gesucht. Dieser Versuch war erfolgreich, weswegen im Folgenden Veränderungen im Proteinexpressionsmuster von vier der identifizierten Kandidaten im Urin und Blasengewebe von erkrankten und gesunden Katzen untersucht wurden. Es wurden erstmalig viele verschiedene potenzielle Interaktionspartner von Fibronectin im Urin von Katzen mit FIC nachgewiesen (Tab. 1, Publikation), darunter die Immunglobuline Ig kappa chain V region 3315 und Ig gamma chain C region. Weitere Proteine, die mit Fibronectin co-präzipitierten, waren das milchdrüsenspezifische Protein Alpha-S1-Casein (KUNZ & LONNERDAL, 1990) und Caspase-14, ein 1998 neu identifiziertes Mitglied der Caspase-Familie von Cysteinproteasen, das eine Rolle beim apoptotischen Zelltod spielt (HU et al., 1998).

Ein Kandidat, der in der vorliegenden Studie näher analysiert wurde, ist die Komplement-Komponente 4a (C4a). Sie gehört zu einer Gruppe von niedermolekularen Entzündungsmediatoren, den sogenannten Anaphylatoxinen (HUGLI, 1984). Im Verlauf der Komplementaktivierung werden diese Peptide freigesetzt und nehmen Einfluss auf die Aktivierung und Regulierung des Entzündungsprozesses (HUGLI, 1984). Ein Mangel an C4-Komponenten, bestehend aus den zwei Allotypen 4a und 4b, konnte in humanmedizinischen Studien bereits mit unterschiedlichen Krankheitszuständen assoziiert werden, wie zum Beispiel dem Erythema nodosum, der systemischen Sklerose, der kongenitalen adrenalen Hyperplasie, dem Diabetes mellitus Typ 1 und der Immunkomplex-

medierten Glomerulonephritis (DESCHAMPS et al., 1992; PARLATO et al., 1992; DE MESSIAS et al., 1993; MOULDS et al., 1993; PAIMELA et al., 1996; TAKEUCHI et al., 1998). Auch bei Harnwegsinfektionen mit Chlamydien beim Menschen wurde ein Mangel an Komplement C4 gefunden (GORA et al., 2011).

C4a konnte in der vorliegenden Studie erstmalig im Urin von Katzen nachgewiesen werden (Abb. 1A, Publikation). Dabei zeigte sich eine fast fünffach höhere Konzentration im Urin von Katzen mit FIC als bei gesunden Kontrollkatzen (Abb. 1A Publikation). Es existieren aktuell keine veterinärmedizinischen Studien über den Einfluss des Komplementsystems auf die idiopathische untere Harnwegserkrankung der Katzen. Die Komplement-Komponente C4a und ihr Einfluss auf den Pathomechanismus der humanen IC war jedoch bereits Gegenstand mehrerer humanmedizinischer Studien (MATTILA et al., 1983; HELIN et al., 1987; STEINERT et al., 1994). C4a wird physiologischerweise über die Nieren in den Urin ausgeschieden, wobei die täglich ausgeschiedene Menge 0,1 % der totalen Plasmakonzentration beträgt (GORSKI, 1981). Eine erhöhte Konzentration im Urin könnte bei Katzen mit FIC auf einen erhöhten Serumspiegel zurückzuführen sein. Das Komplementsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation des Gewebes nach Ischämie- und Reperfusionsschäden in verschiedenen Organen, wie zum Beispiel dem Gastrointestinaltrakt und der Leber (STAHL et al., 2003; HEIJNEN et al., 2006). In diesen Fällen wirkt sich die Komplementaktivierung im Serum allerdings negativ auf die Reperfusionsschäden aus (STAHL et al., 2003; HEIJNEN et al., 2006). Eine Obstruktion der unteren Harnwege führt durch den Rückstau unweigerlich zu einer Ischämie in den Nieren. Dadurch könnte es zu einer erhöhten Komplementkonzentration im Serum kommen (ATILGAN et al., 2012). Bei Patienten mit IC konnten jedoch signifikant niedrigere Konzentrationen an C4 im Serum festgestellt werden. Die Autoren schlossen auf einen chronischen lokalen immunologischen Prozess in der Harnblase (MATTILA et al., 1983). Ein erhöhter C4a-Level im Urin könnte deswegen auch aus einer erhöhten Expression im Harnblasengewebe selbst und dem Verlust dieses Proteins in den Urin aufgrund der erhöhten Blasenwandpermeabilität resultieren, vergleichbar mit der erhöhten Fibronectin-Expression im Blasengewebe bei Katzen mit FIC (LEMBERGER et al., 2011a). Demnach könnte die beobachtete erniedrigte Menge an C4a in Blasengewebe von Katzen mit FIC (Abb. 4C und D,

Publikation) und die Erhöhung im Urin von erkrankten Katzen durch die gleiche Ätiologie bedingt sein. Der Verlust der C4a-Signalintensität ist also vermutlich das Ergebnis von im Blasengewebe stattfindendem Zelltod und Gewebsschaden. Im gesunden Blasengewebe zeigte C4a eine deutliche Expression im Urothel und auch vereinzelt die Bindung an Interstitialzellen der Lamina propria mucosae (Abb. 3C, Publikation). HELIN und Mitarbeiter (1987) beobachteten in einer Studie zur IC des Menschen die Bindung von Komplement an elastische Strukturen der Gefäßwände in der geschädigten Harnblase. Die Autoren vermuteten einen Einfluss des Komplements auf die Entwicklung des Gewebeschadens als Folge der Bindung von Autoantikörpern an Antigene in der Harnblasenschleimhaut (HELIN et al., 1987). Das Komplement trägt somit höchstwahrscheinlich an dem für die IC typischen chronischen und sich selbst erhaltenden Entzündungsprozess bei. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu einer spontanen und kontrollierten Aktivierung des Komplements, wohingegen im Falle einer pathologischen Veränderung, aufgrund einer Stimulation, zum Beispiel durch Infektionserreger oder Gewebsschäden, die Aktivierung forciert ist (ZHOU, 2012). Der Gewebeschaden in den Harnblasen von Katzen mit FIC verursacht möglicherweise eine gesteigerte Aktivierung des Komplementsystems und damit auch eine erhöhte Konzentration der Peptidmediatoren, wie zum Beispiel der Komponente C4a, im Entzündungsprozess. Diese könnten als Folge einer hyperpermeablen Blasenwand in den Urin gelangen und dort in höheren Konzentrationen vorhanden sein. Zusätzlich ist denkbar, dass C4a zu einer exzessiveren Entzündungsreaktion führt, als für die Beseitigung des zugrundeliegenden Schadens notwendig wäre und daher zu dem chronischen und rezidivierenden Charakter der Erkrankung FIC beiträgt.

Galektin-7 ist ein niedermolekulares Protein aus der Familie der Lektine, die eine besondere Affinität zu beta-Galaktosiden besitzen (SAUSSEZ & KISS, 2006). Es wird nicht ausschließlich, aber insbesondere im Plattenepithel verschiedenster Gewebe exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Zellentwicklung und -differenzierung, Zell-zu-Zell-Adhäsion, Zell-Matrix-Interaktion, Wachstumsregulierung und Apoptose (SAUSSEZ & KISS, 2006). In der massenspektrometrischen Untersuchung des Urins konnte für Galektin-7 eine Co-Präzipitation von Galektin-7 mit Fibronectin festgestellt werden (Tab. 1,

Publikation). Anschließend wurde der Galektin-7-Gehalt im Urin von gesunden und kranken Katzen mittels Western Blot quantifiziert (Abb. 1B, Publikation). Dabei zeigten ausschließlich die Katzen mit FIC eine deutliche Signalintensität für dieses Protein. Im Urin der Kontrollgruppe konnte kein Galektin-7 nachgewiesen werden, wohingegen im Blasengewebe der gesunden Katzen erstmalig eine physiologische Expression dieses Proteins im Übergangsepithel, insbesondere in den Schirmzellen, dargestellt werden konnte (Abb. 3D und 4E, Publikation). Vereinzelt zeigte sich auch eine Färbung um die Blutgefäße der Lamina propria mucosae (Abb. 4E, Publikation). Interessanterweise ließ die immunhistologische Betrachtung des Blasengewebes von Katzen mit FIC eine deutlich gesteigerte Expression von Galektin-7 im Übergangsepithel erkennen (Abb. 4F, Publikation). Bisher gibt es keine Informationen zum Vorkommen und zur Funktion von Galektin-7 im Urin und Blasengewebe von gesunden Katzen und Katzen mit FIC. Allerdings wurde schon in mehreren humanmedizinischen Studien ein positiver Effekt dieses Proteins auf die Wundheilung in anderen Organen nachgewiesen (CAO et al., 2003; KLIMA et al., 2009; RONDANINO et al., 2011). So zeigte Galektin-7 zum Beispiel bei Korneadefekten eine stimulierende Wirkung auf die Migration der Epithelzellen, ebenso wie auf die Reepithelialisierung, weswegen die Autoren als Konsequenz sogar einen therapeutischen Einsatz von Galektin-7 vorschlugen (CAO et al., 2003). Auch in der Haut von Schweinen wurde ein entscheidender Einfluss von Galektin-7 auf die Wundheilung und Differenzierung des Epithels nachgewiesen (KLIMA et al., 2009). Des Weiteren untersuchte eine kürzlich erschienene Studie die Funktion von Galektin-7 in polarisierten Nierenepithelzellen (RONDANINO et al., 2011). Dabei wurde festgestellt, dass dieses Protein eine wichtige Funktion als Modulator der Kinozilienlänge hat (RONDANINO et al., 2011). Deswegen wird angenommen, dass dieses Proteins ebenfalls eine wichtige Rolle in der Wundheilung von Zellen einnimmt (RONDANINO et al., 2011). In Harnblasenkarzinomen bei Menschen konnte, je nach Differenzierungsgrad der Tumore, eine vermehrte oder aber eine verminderte Expression von Galektin-7 festgestellt werden (OSTERGAARD et al., 1997; LANGBEIN et al., 2007). Die in der vorliegenden Studie gefundene erhöhte Abundanz im Übergangsepithel der geschädigten Harnblasen von Katzen mit FIC könnte eine Heraufregulierung dieses Proteins aufgrund eines Verlustes der physiologischen Harnblasenstruktur anzeigen. In diesem Zusammenhang könnte Galektin-7 auch bei der FIC eine

Rolle in der Wundheilung und Reepithelialisierung des geschädigten Blasengewebes spielen. Als Folge der Schädigung des Harnblasenepithels kommt es zu einem Übergang von Galectin-7 aus den Zellen in den Urin. Dort lässt sich das Protein bei Katzen mit FIC, im Gegensatz zu gesunden Katzen nachweisen (Abb. 1B, Publikation). Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Erkenntnis, dass das Ausmaß einer beschleunigten Wiederherstellung des Epithels bei Hornhautdefekten durch Galektin-7 größer ist als das von Wachstumsfaktoren (CAO et al., 2003). Aus diesem Grund könnte dieser neue potenzielle Bindungspartner von Fibronectin möglicherweise als neuer Therapieansatz auch bei der FIC von Nutzen sein.

Eine erhöhte Fibronectin-Konzentration wurde in einer vorangegangenen Studie im Urin von Katzen mit FIC beschrieben (LEMBERGER et al., 2011a). Fibronectin tritt vor allem bei fibrotischen und entzündlichen Erkrankungen vermehrt auf (MOSHER, 1984). Außerdem stellte sich in humanmedizinischen Studien heraus, dass das hochmolekulare Glykoprotein als Tumormarker geeignet ist, da es aufgrund der Tumordinvasion aus dem Gewebe vermehrt in den Urin übertritt und dort somit messbar ist (HEGELE et al., 2003; MUTLU et al., 2003; MENENDEZ et al., 2005). Bei verschiedenen Erkrankungen, die mit einer Gewebsfibrose einhergehen, zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Konzentration an Fibronectin im Urin, wie zum Beispiel der interstitiellen Nierenfibrose bei Ratten, der Lungenfibrose bei Hunden sowie der zystischen Fibrose bei Menschen (BRAY et al., 1986; STANISLAWSKI & SORIN, 1991; EISMANN et al., 2002). Als primäre Ursache der Fibrose bei diesen Erkrankungen wird eine unkontrollierte Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten angenommen (ZHANG et al., 1994). Eine kürzlich erschienene Studie untersuchte den Einfluss von Galektinen auf die Ausbildung einer Extrazellulärmatrix (EZM) (DVORANKOVA et al., 2011). Dabei stellten die Autoren fest, dass Galektin-7 in der Lage ist, Fibroblasten in Myofibroblasten umzuwandeln und ein dreidimensionales Netzwerk aus Fibronectin enthaltenden Fasern zu bilden (DVORANKOVA et al., 2011). Diese Befunde gehen mit den Ergebnissen dieser Studie konform und liefern außerdem interessante Einblicke in die Pathomechanismen von Krankheiten, die durch ihren fibrotischen Charakter geprägt sind. Galektin-7 könnte somit positiv in den Mechanismus der Fibrosebildung im Gewebe eingreifen, indem es der unkontrollierten Entwicklung

der EZM bei Katzen mit FIC vorbeugt. Diese pathologische Differenzierung der EZM ist vermutlich das Resultat einer chronisch rezidivierenden Entzündung im Harnblasengewebe bei an FIC erkrankten Katzen.

Ein weiterer massenspektrometrisch identifizierter Bindungspartner von Fibronectin ist das Intestinale Fettsäure-bindende Protein (I-FABP) (Tab. 1, Publikation). Dieses kleine zytoplasmatische und lösliche Protein (OCKNER & MANNING, 1974) zeigte im Urin bei den an FIC erkrankten Katzen eine Reduktion der Konzentration um die Hälfte verglichen mit der gesunden Kontrolltiere (Abb. 1C, Publikation). I-FABP ist hauptsächlich in die Pufferung und den Transport von langkettigen Fettsäuren involviert (OCKNER & MANNING, 1974). Es wird vor allem in der Darmmukosa und anderen Organen, die Fettsäuren aufnehmen und metabolisieren, wie der Leber, dem Myokard, dem Fettgewebe und der Niere, exprimiert (OCKNER et al., 1972). Im Zusammenhang mit intestinalen Schäden wurde I-FABP als Urinmarker bereits beschrieben, wie zum Beispiel während oder nach akuten ischämischen Zuständen (GOLLIN et al., 1993; EVENNETT et al., 2010; THUIJLS et al., 2011). Bisher ist jedoch über die Verteilung und Funktion von I-FABP weder im physiologischen Urogenitaltrakt, noch bei pathologischen Zuständen viel bekannt. Bei der Suche nach einem Markerprofil für urotheliale Karzinome des oberen Harntrakts wurde I-FABP mit hoher Spezifität als Urinmarker etabliert (HO et al., 2008). In der vorliegenden Studie zeigte I-FABP immunhistologisch eine deutliche Reaktivität in allen Schichten des Harnblasengewebes bei den gesunden Kontrollkatzen (Abb. 4G, Publikation), wobei I-FABP vor allem in den Epithelzellen des Übergangsepithels sowie vereinzelt in den Interstitialzellen der Lamina propria exprimiert wird. In geringen Mengen ist dieses Protein auch extrazellulär vorhanden (Abb. 3E, Publikation). Im Vergleich dazu war bei den Katzen mit FIC eine deutlich geringere I-FABP-Reaktivität im Blasengewebe sichtbar (Abb. 4H, Publikation). Eine verminderte Signalintensität dieses co-präzipitierenden Proteins könnte aus der Zerstörung des Harnblasengewebes, das infolge des entzündlichen Prozesses die physiologische Struktur verliert, resultieren. Allerdings zeigte sich auch im Urin eine verminderte Konzentration bei den erkrankten Katzen. Interessanterweise wurde in einer Studie über die Expression von I-FABP in Darmepithelzellen während der Zelldifferenzierung und die Modulation der Expression durch extrazelluläre Faktoren ein deutlicher Einfluss von Fibronectin

auf die Expression von I-FABP beobachtet (HALLDEN et al., 1994). Aufgrund dessen könnte die verminderte Konzentration von Fibronectin im Blasengewebe durch den Verlust über die Blasenwand zu einer Herunterregulierung der I-FABP-Expression im Blasengewebe und ebenso auch im Urin führen. Die Funktion von I-FABP sowohl im gesunden, als auch im kranken Harnblasengewebe ist unklar und sollte durch weitere Studien näher untersucht werden.

Ein äußerst interessantes und komplexes Protein, für das in dieser Studie eine Co-Präzipitation mit Fibronectin aufgezeigt werden konnte (Tab. 1, Publikation), ist das kleine ubiquitäre Protein Thioredoxin (HOLMGREN & LU, 2010). Es besitzt als charakteristisches Merkmal eine Disulfidbrücke als aktives Zentrum (HOLMGREN & LU, 2010). Thioredoxin ist einer der wichtigsten Regulatoren der zellulären Redox-Reaktionen und kommt in allen Organismen vor, von den Archaea bis zum Menschen (ARNER & HOLMGREN, 2000). Es wurde erstmals vor 40 Jahren in *Escherichia coli* entdeckt. Die Vielzahl und Vielfalt der Abläufe, in die Thioredoxin in der menschlichen Zelle involviert ist, wurden jedoch erst in jüngster Zeit deutlich (LAURENT et al., 1964; BURKE-GAFFNEY et al., 2005). Es gehört zum klassischen Thioredoxin-System, das von der Thioredoxin-Reduktase und seinem charakteristischen Substrat, dem Redox-aktiven Protein Thioredoxin, gebildet wird (GROMER et al., 2004). Thioredoxin wird dabei durch den Verbrauch von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxid (NADPH) reduziert; dies gibt der Reaktion den Namen (GROMER et al., 2004; STEFANKOVA et al., 2005). Anschließend wird es oxidiert, wobei es seinen Zielmolekülen, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren, die reduzierende Äquivalente überträgt (HOLMGREN & BJORNSTEDT, 1995; ARNER & HOLMGREN, 2000; GROMER et al., 2004). Thioredoxin spielt insbesondere als Antioxidans in der Abwehr gegen oxidativen Stress und in der Unterdrückung des natürlichen Zelltods eine wichtige Rolle (STEFANKOVA et al., 2005). Weitere durch Thioredoxin regulierte biologische Funktionen schließen die Unterstützung des Zellwachstums sowie die Modulation von Entzündungen im Körper ein (BURKE-GAFFNEY et al., 2005). Aus diesem Grund war Thioredoxin bereits Gegenstand intensiver Forschung (BURKE-GAFFNEY et al., 2005). So ist beispielsweise bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen eine Heraufregulierung von Thioredoxin und ein anfänglich antioxidativer Effekt, der sich später zu einem das

Tumorwachstum fördernden Einfluss entwickelt, bekannt (POWIS et al., 2000). Des Weiteren wurde in mehreren Studien von einer Beteiligung bei viralen oder kardialen Erkrankungen und beim Alterungsprozess berichtet (NAKAMURA et al., 2002; YAMAMOTO et al., 2003; YOSHIDA et al., 2003; LIU et al., 2004; MIYAMOTO et al., 2004). Auch bei der Entwicklung von Früh- und Neugeborenen leistet Thioredoxin einen entscheidenden Beitrag, indem es beide Entwicklungsstadien vor Schäden durch die sich stark verändernden Sauerstoffbedingungen schützt (KOBAYASHI-MIURA et al., 2002; DAS, 2004). In diesen Studien stellte sich heraus, dass Thioredoxin oft eine dichotome Rolle einnimmt, das heißt, sowohl eine protektive, als auch destruktive Funktion bekleidet (BURKE-GAFFNEY et al., 2005). Ein weiterer pathologischer Zustand, der im Zusammenhang mit Thioredoxin intensiv untersucht wurde, ist der renale Ischämie- und Reperfusionsschaden, der zu einer erhöhten Sekretion des Thioredoxins in den Urin führt (KASUNO et al., 2003). Die Autoren gehen hierbei nicht von einem Verlust über die geschädigte Zellwand der abgestorbenen Zellen als Ursache für die erhöhte Thioredoxin-Konzentration aus, da die Proteinkonzentration im Urin nach der Reperfusion unverändert bleibt (KASUNO et al., 2003). Nichtsdestotrotz ist die Funktion von Thioredoxin im Urin bislang unklar. In einer nachfolgenden Studie über renale Ischämie konnte eine erhöhte Konzentration aufgrund der Sekretion von Thioredoxin durch tubuläre Nierenepithelzellen nachgewiesen werden, jedoch keine *De-novo*-mRNA-Synthese (KASUNO et al., 2011).

Thioredoxin zeigte in der vorliegenden Studie eine signifikant erhöhte Konzentration im Urin von Katzen mit FIC im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Abb. 1D, Publikation). Im Hinblick auf die oben geschilderten Befunde der kürzlich erschienenen humanmedizinischen Studien könnte die erhöhte Thioredoxin-Konzentration im Urin der kranken Katzen aus einer Hypoxie im Nierengewebe resultieren, die sich aus der Obstruktion der unteren Harnwege und einem Rückstau des Urins in das Nierenbecken entwickelt. Jedoch zeigte die immunhistologische Färbung der gesunden Blasengewebe eine deutliche Signalintensität für Thioredoxin in den Zellen des Übergangsepithels, ebenso wie in den Zellen der Lamina propria mucosae (Abb. 3F und 4I, Publikation). Dahingegen stellte sich ein Verlust der Farbintensität für Thioredoxin in allen Schichten der Harnblasen von an FIC erkrankten Katzen dar

(Abb. 4J, Publikation). Dies lässt auf einen insbesondere in der Harnblase stattfindenden Prozess bei der FIC schließen. Bislang existieren keine Untersuchungen zu Thioredoxin bei Katzen mit FIC. Wie bereits in früheren Studien wurde kürzlich, bei der Suche nach Markern für oxidativen Stress, ein erhöhter Thioredoxin-Level in Harnblasenkarzinomen im Vergleich zu gesunden Harnblasengewebe gefunden (SOINI et al., 2011). Thioredoxin wird in der Harnblase von Ratten mit Ausflusstraktobstruktion vermehrt exprimiert (KIM et al., 2005). Durch den Entzündungsprozess im Blasegewebe von Katzen mit FIC, ebenso wie bei der humanen IC, finden apoptotische Vorgänge statt (SHIE et al., 2012). Außerdem ist die Harnblase oxidativem Stress ausgesetzt, was durch die Instillation eines Stickoxid-haltigen Gels in die Harnblase und der darauffolgenden Auslösung einer experimentelle IC bei Ratten nachgewiesen werden konnte (PALMA et al., 2011). Als Konsequenz sezernieren die Zellen der Harnblase bei den Katzen mit FIC vermutlich vermehrt Thioredoxin aus dem Zytoplasma in den Urin. Dadurch sind die Konzentrationen signifikant höher als die gesunder Tiere. Zusätzlich übernimmt Thioredoxin höchstwahrscheinlich antioxidative Funktionen und agiert gegen den auf die Zellen einwirkenden oxidativen Stress. Diese Befunde stehen im Einklang mit früheren Berichten, in denen extrazellulär injiziertes rekombinantes humanes Thioredoxin bei Gewebsschäden, wie zum Beispiel Ischämie- und Reperfusionsschäden in Gliazellen, eine schützende Wirkung zeigte (HORI et al., 1994). Thioredoxin könnte demnach auch bei der FIC von therapeutischem Nutzen sein und eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes bewirken und sich in der Folge positiv auf die Prognose für die betroffenen Katzen auswirken.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nichts über eine Interaktion zwischen Fibronectin und Thioredoxin bekannt. Die immunhistologische Doppelfärbung von Fibronectin und Thioredoxin zeigte jedoch eine Co-Lokalisation beider Proteine in der Lamina propria mucosae und in der Tunica muscularis des physiologischen Harnblasengewebes (Abb. 5A, Publikation). Jedoch konnte die Co-Expression von Fibronectin und Thioredoxin im Harnblasengewebe der kranken Katzen nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 5B, Publikation). Dies könnte mit dem Verlust beider Proteine über die zerstörte Blasenwand erklärt werden. Eine humanmedizinische Studie untersuchte den Effekt des Gen-Silencing der Thioredoxin-Reduktase 1 (TrxR1) auf die Genexpression in HepG2-Zellen, einer

menschlichen hepatozellulären Tumorzelllinie, mithilfe von siRNA- und Mikroarray-Technik (GORRETA et al., 2005). Interessanterweise konnten verschiedene TrxR1-abhängige Gene identifiziert werden, darunter auch Gene mit Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts und der EZM, wie Keratin 19 und Fibronectin (GORRETA et al., 2005). Demnach könnte Thioredoxin nicht nur als Antioxidans bei der FIC eine Rolle spielen, sondern auch, ähnlich wie Galektin-7, die Formierung der EZM beeinflussen.

Thioredoxin leistet einen entscheidenden Beitrag in der Redox-Regulierung von Transkriptionsfaktoren und somit auch von zellulären Signaltransduktionswegen (HOLMGREN & LU, 2010). Dazu zählt auch der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der in seiner aktiven Form aus zwei Untereinheiten, p65 und p50, besteht und ein wichtiger und intensiv erforschter Regulationsfaktor der Zelle ist (BALDWIN, 1996). NF- $\kappa$ B kontrolliert eine Vielzahl an Genen, die in die Antwort auf oxidativen Stress und die zellulären Abwehrmechanismen involviert sind, spielt eine Rolle bei immunologischen und entzündlichen Prozessen und greift in den Pathomechanismus verschiedenster Erkrankungen ein (BALDWIN, 1996). NF- $\kappa$ B liegt im Zytoplasma als inaktiver Komplex mit dem Inhibitor of kappa B (I $\kappa$ B) vor (WORONICZ et al., 1997). Sobald ein Aktivierungssignal den Komplex erreicht, wird das Protein I $\kappa$ B durch I $\kappa$ B-Kinasen phosphoryliert und dissoziiert von NF- $\kappa$ B, das im Folgenden vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert (STANCOVSKI & BALTIMORE, 1997). In den 90er Jahren wurde erstmalig ein Zusammenhang zwischen NF- $\kappa$ B und Thioredoxin erkannt. In weiteren wissenschaftlichen Studien stellte sich heraus, dass Thioredoxin eine duale und entgegengesetzte Rolle in der Regulierung des NF- $\kappa$ B spielt (HIROTA et al., 1999). Im Zytoplasma beeinträchtigt es das Signal auf die I $\kappa$ B-Kinasen und blockiert damit indirekt die Degradierung von I $\kappa$ B, wohingegen es im Zellkern die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivitäten fördert, indem es seine Bindungsfähigkeit an die DNA steigert (HIROTA et al., 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von oxidativem Stress auf die Zelle Thioredoxin, ebenso wie NF- $\kappa$ B, vom Zytoplasma in den Zellkern wandert (HIROTA et al., 1999). Aus diesem Grund kam man zu dem Schluss, dass Thioredoxin im Falle von oxidativem Stress als positiver Regulator des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsmechanismus fungiert (HIROTA et al., 1999). Auch in der humanmedizinischen IC-Forschung wurde dieser Transkriptionsfaktor bereits untersucht (ABDEL-MAGEED &

GHONIEM, 1998; ABDEL-MAGEED et al., 2003). Immunhistologische Experimente zur Untersuchung der Lokalisation von NF- $\kappa$ B in Blasenbiopsien von Patienten mit IC zeigten dabei eine dominante Aktivität in den Epithelzellen und Zellen der Submukosa, wohingegen Harnblasenbiopate gesunder Probanden eine diffuse und vor allem nur schwache Färbung aufwiesen (ABDEL-MAGEED & GHONIEM, 1998). In der vorliegenden Studie konnte dieses Ergebnis sowohl bei den kranken als auch den gesunden Katzen bestätigt werden (Abb. 5C und D, Publikation). Bei der Untersuchung der NF- $\kappa$ B-p65-Konzentration im Urin der Katzen mit FIC zeigte sich eine signifikant höhere Konzentration verglichen mit den gesunden Kontrollkatzen (Abb. 1E, Publikation). In der Humanmedizin wurde eine Studie zur NF- $\kappa$ B-abhängigen Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen und die mögliche Rolle in der Pathogenese der IC des Menschen durchgeführt (ABDEL-MAGEED et al., 2003). Dabei wurde im Urin der Patienten mit IC im Vergleich zu den gesunden Kontrollen eine signifikante höhere Menge an NF- $\kappa$ B-regulierten proinflammatorischen zytokinen Genprodukten gefunden (ABDEL-MAGEED et al., 2003). Die Tatsache, dass einige dieser Faktoren, wie zum Beispiel Interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivieren und durch diesen über einen positiven Feedback-Mechanismus wiederum vermehrt exprimiert werden, indiziert, dass die Sekretion dieser Faktoren in den Urin die Aktivierung von NF- $\kappa$ B weiter anregt (ABDEL-MAGEED et al., 2003). Aus diesem Grund vermuten die Autoren, dass die fortwährende Stimulation von NF- $\kappa$ B im Blasenepithel durch die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine und chemokiner Gene den IC-spezifischen entzündlichen Prozess aufbauschen könnte (ABDEL-MAGEED et al., 2003). Des Weiteren spielt auch bei der IC die Hypoxie im Gewebe eine mögliche Rolle in der Ätiologie der Erkrankung, weswegen die Hypothese der NF- $\kappa$ B-Aktivierung eine potenzielle Schlüsselrolle in der Pathogenese einnimmt (ABDEL-MAGEED et al., 2003). Als Konsequenz könnten zum einen  $\kappa$ B-abhängige Genprodukte im Urin als nichtinvasive Biomarker Einsatz finden, zum anderen könnten lokal instillierte Antioxidantien bei Patienten mit IC eine wirksame Therapie darstellen (ABDEL-MAGEED et al., 2003). Auch bei der FIC verstärkt die NF- $\kappa$ B-Aktivierung möglicherweise die Zytokinexpression im Verlauf der FIC, und die Zirkulation dieser proinflammatorischen Faktoren treibt wiederum die NF- $\kappa$ B-Stimulation voran. Aufgrund des oxidativen Stresses im Harnblasengewebe der kranken Katzen

kommt es zu einer vermehrten Expression des Antioxidans Thioredoxin im Gewebe, das in Folge der Gewebsschädigung und erhöhten Blasenwandpermeabilität in den Urin übertritt. Eine Co-Expression beider Proteine im Blasengewebe der Katzen mit FIC konnte in dieser Studie gezeigt werden (Abb. 5C und D, Publikation). Im Anfangsstadium der FIC könnte der Interaktionspartner Thioredoxin möglicherweise ebenfalls die Sekretion und Aktivierung von NF- $\kappa$ B anregen. Dieser Signaltransduktionsweg spielt demzufolge möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der FIC und stellt einen potenziellen Teufelskreislauf in der Entwicklung der Erkrankung dar. Er könnte auch eine Erklärung für den chronisch rezidivierenden Charakter der FIC sein. Thioredoxin stellt ein neues wichtiges Protein im Pathomechanismus der FIC dar, dessen Signaltransduktionsweg darüber hinaus einen möglichen Angriffspunkt für neue Therapiestrategien darstellen könnte, und sollte aus diesem Grund Gegenstand weiterer Forschung sein.

Zu den wichtigsten biologischen Aktivitäten von Thioredoxin zählen, neben der antioxidativen Funktion, die Wachstumsregulierung und antiapoptotische Eigenschaften (STEFANKOVA et al., 2005). Mechanismen, bei denen Thioredoxin das Zellwachstum reguliert, schließen die Bindung von Signaltransduktionsmolekülen, wie dem Thioredoxin-interacting protein (Txnip) und der Apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK-1) ein (YOSHIOKA et al., 2006). SAITOH und Mitarbeiter (1998) konnten in einer Studie einen negativen Einfluss von Thioredoxin auf die endogene ASK-1-Aktivität belegen und postulierten Thioredoxin als ihren physiologischen Inhibitor. Diese ASK-1 aktiviert bekanntermaßen den p38-MAPK-Signalweg durch eine Phosphorylierung, was zu einer Aktivierung ihrer zugehörigen Proteinkinasen führt (TAKEDA et al., 2007). Im Jahr 1999 konnte von HASHIMOTO und Kollegen nachgewiesen werden, dass Thioredoxin auch indirekt einen hemmenden Einfluss auf die p38-MAPK ausübt und eine Überexpression dieses Proteins eine verminderte Aktivierung der p38-MAPK bewirkt, wobei die Mechanismen dieser Hemmung bisher noch unklar sind. Dieser Signalweg wurde 1994 erstmals identifiziert und zählt zusammen mit zwei weiteren Kinasen zum MAPK-Signalweg, welcher eine Fülle an zellulären Prozessen kontrolliert (HAN et al., 1994; KOSTENKO et al., 2011). Die Aktivierung des p38-MAPK-Signaltransduktionswegs ist bei einer Vielzahl von biologischen Vorgängen

beteiligt, wie zum Beispiel der natürlichen Entwicklung und Funktion der Zellen des Immunsystems, der Zytokinsynthese und insbesondere der Regulierung der Apoptose (HAN et al., 1994; CUENDA et al., 1995; SHAPIRO & DINARELLO, 1995; BEYAERT et al., 1996; FOLTZ et al., 1997; HASHIMOTO et al., 1999a; HASHIMOTO et al., 1999b). Außerdem ist bekannt, dass in Tumorzellen der Harnblase eine vermehrte Expression der p38-MAPK stattfindet, was ein verstärktes Tumorwachstum und eine Metastasierung der Tumorzellen zur Folge hat (SWIATKOWSKI et al., 2003; KUMAR et al., 2009). Diese Erkenntnisse machen diese Kinase als Target für therapeutische Maßnahmen zu einem interessanten Ansatzpunkt für klinische Studien (KUMAR et al., 2009). Um die Interaktion von Thioredoxin und p38-MAPK und mögliche Veränderungen in der Signalkaskade bei der FIC näher zu beleuchten, wurde in der vorliegenden Studie eine immunhistologische Doppelfärbung beider Proteine durchgeführt (Abb. 5E und F, Publikation). Dabei wurde die p38-MAPK, ausschließlich als Co-Expression mit Thioredoxin, im Übergangsepithel und vereinzelt in der Lamina propria mucosae des gesunden Harnblasengewebes angefärbt. Im Gegensatz dazu konnte keine Co-Lokalisation im Harnblasengewebe der Katzen mit FIC dargestellt werden; hier zeigte die p38-MAPK eine deutliche solitäre Färbung im Übergangsepithel und in der Lamina propria mucosae. Im Urin war die p38-MAPK-Konzentration bei Katzen mit FIC um das 6,5-fache erhöht im Vergleich zu der Konzentration bei den gesunden Kontrollkatzen (Abb. 1F, Publikation). Wenn man die Ergebnisse früherer Studien betrachtet, könnte die erhöhte Intensität des p38-MAPK-Signals im Harnblasengewebe der Katzen mit FIC aufgrund einer vermehrten Apoptose durch die zugrunde gehenden Zellen des entzündlichen Prozesses entstehen. Durch den Verlust von Thioredoxin über die defekte Harnblasenwand könnte die hemmende Wirkung dieses Proteins fehlen, so dass es zu einer vermehrten Expression der p38-MAPK kommt. Eine daraus resultierende vermehrte Ausschüttung von Zytokinen könnte, ähnlich den Vorgängen im NF- $\kappa$ B-Signalweg, den Entzündungsprozess in der Harnblase weiter vorantreiben. Es wäre denkbar, dass als Folge dieser Pathomechanismen das in der gesunden Harnblase vorherrschende Gleichgewicht aus Apoptose und Apoptosehemmung verloren geht.

Signaltransduktionskaskaden sind eine interessante neu erforschte Disziplin in der medizinischen Wissenschaft. Ihr Verständnis hilft dabei, zuvor unbekannte

Pathomechanismen bei Krankheiten aufzuklären und therapeutische Angriffsziele zu etablieren. Die von Thioredoxin regulierten Signaltransduktionswege NF- $\kappa$ B und p38-MAPK stellen eine wichtige Komponente in der Pathogenese der FIC dar.

Eine Limitation der vorliegenden Studie könnte in der ausschließlichen Einbeziehung von Katzen mit obstruktiver FIC gesehen werden. Die Mehrzahl der Katzen, die an FIC erkranken, sind männliche Katzen, und die Harnröhrenobstruktion ist eine häufige Komplikation bei männlichen Katzen mit FIC (GERBER et al., 2005; DEFAUW et al., 2011; ZEZZA et al., 2012). Als Ursache dafür wird eine gleichzeitig stattfindende Entzündung der Urethra und ein Urethraspasmus angenommen, ebenso wie die Bildung eines Entzündungspropfes, der aus einer Präzipitation von Serumproteinen, Entzündungszellen und Struvitkristallen besteht und sich an der Engstelle der Urethra der männlichen Katzen festsetzt. Von allen Katzen mit Harnröhrenobstruktion leiden 53 % der Tiere an einer FIC (GERBER et al., 2005). Darüber hinaus zeigte ein Vergleich von Katzen mit und ohne Obstruktion einen signifikant höheren Grad an Pyurie, Hämaturie und einen höheren Urin/Protein-Quotienten bei den Katzen mit Obstruktion, vermutlich aufgrund einer schwerwiegenderen Entzündung in den obstruierten Fällen (GERBER et al., 2005; DEFAUW et al., 2011). Da männliche Katzen mit Harnröhrenobstruktion häufiger im Notdienst vorgestellt werden und Katzen mit nicht-obstruktiver FIC meist von Tierärzten in der Praxis behandelt werden, überwiegen im Klientel der Medizinischen Kleintierklinik Katzen mit Obstruktion. In einer vorangegangenen Studie wurde kein signifikanter Unterschied im Fibronektin Gehalt des Urins zwischen Katzen mit obstruktiver und nicht-obstruktiver FIC festgestellt. Aufgrund der deutlich größeren Anzahl an Patienten mit obstruktiver FIC in der Klinikpopulation wurden ausschließlich diese Patienten in die vorliegende Studie eingeschlossen. Weitere Studien, die auch Probenmaterial von Katzen mit nicht-obstruktiver FIC einschließen, wären wünschenswert. Im Hinblick auf die Bedeutung der felines idiopathischen Zystitis als Modell für die IC des Menschen wäre die Untersuchung von humanem Probenmaterial von großem Interesse. Die bei der Katze identifizierten Veränderungen der Proteine und Signaltransduktionswege könnten auch für die Humanmedizin neue therapeutische Aspekte darstellen.

In der vorliegenden Studie konnten unterschiedliche potenzielle Interaktionspartner von Fibronectin im Urin und Harnblasengewebe von Katzen mit FIC und gesunden Katzen identifiziert werden. Dabei zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Interaktionspartner im Urin und Blasengewebe bei den an FIC erkrankten Katzen im Vergleich zu den gesunden Kontrollkatzen. Diese Veränderungen lassen auf eine wichtige Rolle dieser potenziellen Interaktionspartner von Fibronectin in der Pathogenese der FIC schließen und sollten mithilfe weiterführender Studien näher untersucht werden. Des Weiteren konnte eine veränderte Aktivität der Signaltransduktionsmoleküle NF- $\kappa$ B und p38-MAPK bei Katzen mit FIC im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Da die FIC als spontanes Tiermodell für die humane IC von Bedeutung ist, könnten die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse auch einen interessanten Einblick in die Pathogenese der IC liefern.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

### **Die Bedeutung von Fibronektin und potenzieller Interaktionspartner im Urin und Blasengewebe von Katzen mit idiopathischer Zystitis**

G. Treutlein

Die feline idiopathische Zystitis ist weltweit mit 55 – 69 % die häufigste Ursache für untere Harnwegserkrankungen bei der domestizierten Katze. Diese spontan auftretende Zystitis stellt, aufgrund des häufig chronisch rezidivierenden Charakters und der akuten hochgradig schmerzhaften Entzündungsschübe, ein hohes Leidenspotenzial für die betroffenen Katzen dar. Außerdem ist die idiopathische Zystitis das einzige spontane Tiermodell für die humane interstitielle Zystitis. Trotz umfangreicher Forschungstätigkeit konnten bisher die ätiologischen Hintergründe und pathophysiologischen Vorgänge nicht eindeutig geklärt werden, und zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine kausal wirksame Therapie für diese Erkrankung bei Katze und Mensch. Das Ziel dieser Studie war die Charakterisierung potenzieller Interaktionspartner des Glykoproteins Fibronektin im Urin und Blasengewebe von Katzen mit idiopathischer Zystitis, um ein besseres Verständnis der Pathogenese-assoziierten Vorgänge im Zielorgan bei der idiopathischen Zystitis zu ermöglichen. Mithilfe proteomischer Analysemethoden wurden unterschiedliche Interaktionspartner von Fibronektin identifiziert und anschließend vier Kandidaten, Komplement C4a, Galektin-7, Intestinales Fettsäure-bindendes Protein und Thioredoxin, im Urin und Blasengewebe von Katzen mit idiopathischer Zystitis und Kontrolltieren weiter untersucht. Komplement C4a ist ein wichtiges Anaphylatoxin, das bei der Aktivierung und Regulierung von Entzündungsprozessen eine große Rolle spielt. Katzen mit idiopathischer Zystitis zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren eine signifikant höhere Konzentration im Urin, wohingegen die Gewebsexpression im Harnblasengewebe der Katzen mit idiopathischer Zystitis in allen Gewebsschichten vermindert war. Galektin-7 konnte ausschließlich im Urin der Katzen mit idiopathischer Zystitis nachgewiesen werden und zeigte im Blasengewebe dieser Katzen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ein verändertes Expressionsmuster hin zu einer verstärkten Expression im Übergangsepithel. Dieser Kandidat könnte bei der feline idiopathischen Zystitis

eine wichtige Rolle in der Reepithelialisierung und Wundheilung des zerstörten Blasengewebes spielen. Des Weiteren konnte in dieser Studie das Verteilungsmuster des Intestinalen Fettsäure-bindenden Proteins im Urin und Blasengewebe aufgezeigt werden. Bei den an idiopathischer Zystitis erkrankten Katzen zeigte sich eine um die Hälfte reduzierte Konzentration im Urin verglichen mit den gesunden Kontrolltieren und ebenfalls eine verminderte Expression im Blasengewebe. Thioredoxin, eines der wichtigsten redox-regulierenden Proteine der Zelle, wies, ähnlich seinem Interaktionspartner Fibronectin, eine signifikant erhöhte Konzentration im Urin und eine verringerte Expression im Blasengewebe der Katzen mit idiopathischer Zystitis im Vergleich mit den gesunden Tieren auf. Zum ersten Mal wurde außerdem die Bedeutung der Signaltransduktionswege NF- $\kappa$ B und p38-MAPK am Pathomechanismus der idiopathischen Zystitis verdeutlicht. Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse lassen eine Beteiligung dieser neuen potenziellen Interaktionspartner von Fibronectin an der Pathogenese der Erkrankung vermuten. Weitere funktionelle Untersuchungen sind notwendig, um ein besseres Verständnis der Pathogenese-assoziierten Vorgänge bei der feline idiopathischen Zystitis zu erlangen.

## VI. SUMMARY

### **Fibronectin and its novel potential interacting partners in urine and urinary bladder tissue of cats with feline idiopathic cystitis**

G. Treutlein

Feline idiopathic cystitis is the most common cause of lower urinary tract signs of the domestic cat worldwide, accounting for 55 – 69 % of cases. Its chronic and relapsing character in combination with acute and painful inflammatory episodes leads to suffering of affected cats. Moreover, idiopathic cystitis is the only spontaneous animal model of interstitial cystitis in humans. Despite extensive research, underlying aetiology failed to be elucidated in both the feline and the human disease. Therefore, causative therapy cannot be established. The aim of this study was the characterization and verification of potential novel interacting partners of fibronectin in urine and urinary bladder tissue of cats with idiopathic cystitis to gain a better understanding of the pathogenesis-related mechanisms occurring in the target tissue of the disease. For this purpose, extensive techniques from the field of proteomics were applied. Different co-precipitating proteins of fibronectin were identified, including complement C4a, galectin-7, fatty acid-binding protein intestinal and thioredoxin that were further analyzed in urine and urinary bladder tissue of cats with idiopathic cystitis compared to healthy controls. Complement C4a, a member of the complement cascade, plays an important role in activation and modulation of inflammatory processes. Cats with idiopathic cystitis showed significantly higher amounts of C4a in the urine compared to controls, whereas urinary bladder expression was decreased in all tunics of cats with FIC. Galectin-7 was solely detectable in urine of cats with idiopathic cystitis and showed an altered expression pattern in bladder tissue of affected cats with increased expression in transitional cell epithelium. It is very likely that this protein plays an important role in reepithelialisation and wound healing of the destructed bladder tissue. In the present study, the expression pattern of fatty acid-binding protein intestinal was investigated for the first time in urine and urinary bladder tissue of cats. A 50% reduction of this protein was found in urine of cats with idiopathic cystitis compared to control cats, as well as decreased tissue reactivity. Thioredoxin, one of the most important cellular redox-regulating

---

proteins, revealed significantly higher amounts in urine and decreased expression in urinary bladder tissue of cats with idiopathic cystitis compared to controls. For the first time, signal transduction pathways of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK were examined in feline idiopathic cystitis conditions and showed considerable changes compared to controls pointing to an involvement in the pathomechanism of idiopathic cystitis. The results of this study indicate a contributing role of novel potential interacting partners of fibronectin to the pathogenesis of the disease. Further functional investigations are warranted to gain a better understanding of involved pathomechanism in feline idiopathic cystitis.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdel-Mageed AB, Ghoniem GM. Potential role of rel/nuclear factor-kappaB in the pathogenesis of interstitial cystitis. *J Urol* 1998; 160: 2000-3.

Abdel-Mageed AB, Bajwa A, Shenassa BB, Human L, Ghoniem GM. NF-kappaB-dependent gene expression of proinflammatory cytokines in T24 cells: possible role in interstitial cystitis. *Urol Res* 2003; 31: 300-5.

Adams K, Denman MA. Bladder pain syndrome: a review. *Female Pelvic Med Reconstr Surg* 2011; 17: 279-89.

Alison MR, Chinery R, Poulson R, Ashwood P, Longcroft JM, Wright NA. Experimental ulceration leads to sequential expression of spasmolytic polypeptide, intestinal trefoil factor, epidermal growth factor and transforming growth factor alpha mRNAs in rat stomach. *J Pathol* 1995; 175: 405-14.

Angel TE, Aryal UK, Hengel SM, Baker ES, Kelly RT, Robinson EW, Smith RD. Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chem Soc Rev* 2012; 41: 3912-28.

Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T, Gerstner A, Hansen J, Hochstrasser D, Kellner R, Kubicek M, Lottspeich F, Maser E, Mewes HW, Meyer HE, Mullner S, Mutter W, Neumaier M, Nollau P, Nothwang HG, Ponten F, Radbruch A, Reinert K, Rothe G, Stockinger H, Tarnok A, Taussig MJ, Thiel A, Thiery J, Ueffing M, Valet G, Vandekerckhove J, Wagener C, Wagner O, Schmitz G. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics. *Cytometry A* 2009; 75: 816-32.

Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6102-9.

Atilgan D, Parlaktas BS, Uluocak N, Erdemir F, Firat F, Erkorkmaz U, Saylan O.

Effects of melatonin on partial unilateral ureteral obstruction induced oxidative injury in rat kidney. *Urol Ann* 2012; 4: 89-93.

Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-83.

Baraniuk JN, Kowalski ML, Kaliner MA. Relationships between permeable vessels, nerves, and mast cells in rat cutaneous neurogenic inflammation. *J Appl Physiol* 1990; 68: 2305-11.

Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L. New insights in the etiology and pathophysiology of irritable bowel syndrome: contribution of neonatal stress models. *Pediatr Res* 2007; 62: 240-5.

Baus-Loncar M, Kayademir T, Takaishi S, Wang T. Trefoil factor family 2 deficiency and immune response. *Cell Mol Life Sci* 2005a; 62: 2947-55.

Baus-Loncar M, Schmid J, Lalani el N, Rosewell I, Goodlad RA, Stamp GW, Blin N, Kayademir T. Trefoil factor 2 (TFF2) deficiency in murine digestive tract influences the immune system. *Cell Physiol Biochem* 2005b; 16: 31-42.

Beck M, Claassen M, Aebersold R. Comprehensive proteomics. *Curr Opin Biotechnol* 2011; 22: 3-8.

Berry SH, Bogart LM, Pham C, Liu K, Nyberg L, Stoto M, Suttorp M, Clemens JQ. Development, validation and testing of an epidemiological case definition of interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *J Urol* 2010; 183: 1848-52.

Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P, Fiers W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 1996; 15: 1914-23.

Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, Ferstl R, von Eynatten M, Wendt T, Rudofsky G, Joswig M, Morcos M, Schwaninger M, McEwen B, Kirschbaum C, Nawroth PP. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1920-5.

Birder LA, Barrick SR, Roppolo JR, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Buffington CA. Feline interstitial cystitis results in mechanical hypersensitivity and altered ATP release from bladder urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F423-9.

Birder LA, Wolf-Johnston A, Buffington CA, Roppolo JR, de Groat WC, Kanai AJ. Altered inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in the bladder of cats with feline interstitial cystitis. *J Urol* 2005; 173: 625-9.

Birder LA, Wolf-Johnston AS, Chib MK, Buffington CA, Roppolo JR, Hanna-Mitchell AT. Beyond neurons: Involvement of urothelial and glial cells in bladder function. *Neurourol Urodyn* 2010; 29: 88-96.

Bjorling DE, Wang ZY, Bushman W. Models of inflammation of the lower urinary tract. *Neurourol Urodyn* 2011; 30: 673-82.

Bohle A, Christ H, Grund KE, Mackensen S. The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. *Contrib Nephrol* 1979; 16: 109-14.

Bohle A, Mackensen-Haen S, von Gise H, Grund KE, Wehrmann M, Batz C, Bogenschutz O, Schmitt H, Nagy J, Muller C, et al. The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis. *Pathol Res Pract* 1990; 186: 135-44.

Bray BA, Osman M, Ashtyani H, Mandl I, Turino GM. The fibronectin content of canine lungs is increased in bleomycin-induced fibrosis. *Exp Mol Pathol* 1986; 44: 353-63.

Bromberg JF, Fan Z, Brown C, Mendelsohn J, Darnell JE, Jr. Epidermal growth factor-induced growth inhibition requires Stat1 activation. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 505-12.

Buffington CA, Blaisdell JL, Binns SP, Jr., Woodworth BE. Decreased urine glycosaminoglycan excretion in cats with interstitial cystitis. *J Urol* 1996a; 155: 1801-4.

Buffington CA, Chew DJ, DiBartola SP. Interstitial cystitis in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996b; 26: 317-26.

Buffington CA, Chew DJ, Kendall MS, Scrivani PV, Thompson SB, Blaisdell JL, Woodworth BE. Clinical evaluation of cats with nonobstructive urinary tract diseases. *J Am Vet Med Assoc* 1997a; 210: 46-50.

Buffington CA, Chew DJ, Woodworth BE. Animal model of human disease--feline interstitial cystitis. *Comp Path Bull* 1997b; 29: 3-6.

Buffington CA, Reche Junior A. Increased tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the locus coeruleus of cats with interstitial cystitis. *J Urol* 1998; 159: 1045-8.

Buffington CA, Chew DJ, DiBartola SP. On the definition of feline interstitial cystitis. *J Am Vet Med Assoc* 1999a; 215: 186-8.

Buffington CA, Chew DJ, Woodworth BE. Feline interstitial cystitis. *J Am Vet Med Assoc* 1999b; 215: 682-7.

Buffington CA. Visceral pain in humans: lessons from animals. *Curr Pain Headache Rep* 2001; 5: 44-51.

Buffington CA, Pacak K. Increased plasma norepinephrine concentration in cats with interstitial cystitis. *J Urol* 2001; 165: 2051-4.

Buffington CA. External and internal influences on disease risk in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220: 994-1002.

Buffington CA, Teng B, Somogyi GT. Norepinephrine content and adrenoceptor function in the bladder of cats with feline interstitial cystitis *J Urol* 2002; 167: 1876-80.

Buffington CA. Comorbidity of interstitial cystitis with other unexplained clinical conditions. *J Urol* 2004; 172: 1242-8.

Buffington CA, Westropp JL, Chew DJ, Bolus RR. Risk factors associated with clinical signs of lower urinary tract disease in indoor-housed cats. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228: 722-5.

Buffington CA. Developmental influences on medically unexplained symptoms. *Psychother Psychosom* 2009; 78: 139-44.

Buffington CA. Idiopathic cystitis in domestic cats--beyond the lower urinary tract. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 784-96.

Buffington T, Chew DJ. Idiopathic, lower urinary tract disease. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995; 31: 455-6.

Bullock AD, Becich MJ, Klutke CG, Ratliff TL. Experimental autoimmune cystitis: a potential murine model for ulcerative interstitial cystitis. *J Urol* 1992; 148: 1951-6.

Burke-Gaffney A, Callister ME, Nakamura H. Thioredoxin: friend or foe in human disease? *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 398-404.

Butrick CW. Interstitial cystitis and chronic pelvic pain: new insights in neuropathology, diagnosis, and treatment. *Clin Obstet Gynecol* 2003; 46: 811-23.

Butrick CW, Sanford D, Hou Q, Mahnken JD. Chronic pelvic pain syndromes: clinical, urodynamic, and urothelial observations. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2009; 20: 1047-53.

Byrne DS, Sedor JF, Estojak J, Fitzpatrick KJ, Chiura AN, Mulholland SG. The urinary glycoprotein GP51 as a clinical marker for interstitial cystitis. *J Urol* 1999; 161: 1786-90.

Cameron AP, Gajewski JB. Bladder outlet obstruction in painful bladder syndrome/interstitial cystitis. *Neurourol Urodyn* 2009; 28: 944-8.

Cameron ME, Casey RA, Bradshaw JW, Waran NK, Gunn-Moore DA. A study of environmental and behavioural factors that may be associated with feline idiopathic cystitis. *J Small Anim Pract* 2004; 45: 144-7.

Canas B, Lopez-Ferrer D, Ramos-Fernandez A, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006; 4: 295-320.

Canter MP, Graham CA, Heit MH, Blackwell LS, Wilkey DW, Klein JB, Merchant ML. Proteomic techniques identify urine proteins that differentiate patients with interstitial cystitis from asymptomatic control subjects. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 553 e1-6.

Cao Z, Said N, Wu HK, Kuwabara I, Liu FT, Panjwani N. Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 82-6.

Card JP, Levitt P, Gluhovsky M, Rinaman L. Early experience modifies the postnatal assembly of autonomic emotional motor circuits in rats. *J Neurosci* 2005; 25: 9102-11.

Chai TC, Zhang CO, Shoenfelt JL, Johnson HW, Jr., Warren JW, Keay S. Bladder

stretch alters urinary heparin-binding epidermal growth factor and antiproliferative factor in patients with interstitial cystitis. *J Urol* 2000; 163: 1440-4.

Chang A, Hammond TG, Sun TT, Zeidel ML. Permeability properties of the mammalian bladder apical membrane. *Am J Physiol* 1994; 267: C1483-92.

Chew DJ, Buffington CA, Kendall MS, DiBartola SP, Woodworth BE. Amitriptyline treatment for severe recurrent idiopathic cystitis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213: 1282-6.

Clasper M. A case of interstitial cystitis and Hunner's ulcer in a domestic shorthaired cat. *N Z Vet J* 1990; 38: 158-60.

Clemens JQ, Link CL, Eggers PW, Kusek JW, Nyberg LM, Jr., McKinlay JB. Prevalence of painful bladder symptoms and effect on quality of life in black, Hispanic and white men and women. *J Urol* 2007; 177: 1390-4.

Couchman JR, Austria MR, Woods A. Fibronectin-cell interactions. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 7S-14S.

Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 1995; 364: 229-33.

Danisman A, Bulut K, Kukul E, Ozen I, Sevuk M. Urinary fibronectin levels in patients treated with intravesical bacillus Calmette-Guerin for superficial bladder cancer. *Urol Int* 2000; 64: 198-201.

Das KC. Thioredoxin system in premature and newborn biology. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 177-84.

Dasgupta J, Tincello DG. Interstitial cystitis/bladder pain syndrome: an update.

Maturitas 2009; 64: 212-7.

de Messias IJ, Santamaria J, Brenden M, Reis A, Mauff G. Association of C4B deficiency (C4B\*Q0) with erythema nodosum in leprosy. *Clin Exp Immunol* 1993; 92: 284-7.

Decramer S, Gonzalez de Peredo A, Breuil B, Mischak H, Monsarrat B, Bascands JL, Schanstra JP. Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1850-62.

Defauw PA, Van de Maele I, Duchateau L, Polis IE, Saunders JH, Daminet S. Risk factors and clinical presentation of cats with feline idiopathic cystitis. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 967-75.

Deschamps I, Boitard C, Hors J, Busson M, Marcelli-Barge A, Mogenet A, Robert JJ. Life table analysis of the risk of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in siblings according to islet cell antibodies and HLA markers. An 8-year prospective study. *Diabetologia* 1992; 35: 951-7.

Dimitrakov J. A road map to biomarker discovery and validation in urological chronic pelvic pain syndrome. *J Urol* 2008; 179: 1660-1.

Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 2006; 312: 212-7.

Dvorankova B, Szabo P, Lacina L, Gal P, Uhrova J, Zima T, Kaltner H, Andre S, Gabius HJ, Sykova E, Smetana K, Jr. Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair. *Cells Tissues Organs* 2011; 194: 469-80.

Eismann U, Sommer M, Kosmehl H, Appenroth D, Fleck C, Stein G. Fibronectin splice variants--prognostic markers for the stage of renal interstitial fibrosis in the

rat. Nephron 2002; 92: 379-88.

Eissa S, Swellam M, Sadek M, Mourad MS, El Ahmady O, Khalifa A. Comparative evaluation of the nuclear matrix protein, fibronectin, urinary bladder cancer antigen and voided urine cytology in the detection of bladder tumors. J Urol 2002; 168: 465-9.

Erickson DR. Urine markers of interstitial cystitis. Urology 2001; 57: 15-21.

Erickson DR, Xie SX, Bhavanandan VP, Wheeler MA, Hurst RE, Demers LM, Kushner L, Keay SK. A comparison of multiple urine markers for interstitial cystitis. J Urol 2002; 167: 2461-9.

Erickson DR, Kunselman AR, Bentley CM, Peters KM, Rovner ES, Demers LM, Wheeler MA, Keay SK. Changes in urine markers and symptoms after bladder distention for interstitial cystitis. J Urol 2007; 177: 556-60.

Erickson DR. Identifying biomarkers for interstitial cystitis/bladder pain syndrome. J Urol 2012; 187: 1958-9.

Evennett NJ, Hall NJ, Pierro A, Eaton S. Urinary intestinal fatty acid-binding protein concentration predicts extent of disease in necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg 2010; 45: 735-40.

Fabricant CG. Herpesvirus-induced urolithiasis in specific-pathogen-free male cats. Am J Vet Res 1977; 38: 1837-42.

Fabricant CG. The feline urologic syndrome induced by infection with a cell-associated herpesvirus. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1984; 14: 493-502.

Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, Chen D, Zhao CM, Podolsky DK, Wang TC. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. J Clin Invest 2002; 109:

193-204.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246: 64-71.

Ffrench-Constant C. Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions. *Exp Cell Res* 1995; 221: 261-71.

Finco DR, Barsanti JA, Crowell WA. Characterization of magnesium-induced urinary disease in the cat and comparison with feline urologic syndrome. *Am J Vet Res* 1985; 46: 391-400.

Flores-Carreras O, Gonzalez-Ruiz MI, Martinez-Espinoza CJ, Calderon-Lara SA. [Clinical and diagnostic evaluation in patients with interstitial cystitis]. *Ginecol Obstet Mex* 2010; 78: 275-80.

Foltz IN, Lee JC, Young PR, Schrader JW. Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 1997; 272: 3296-301.

Garraway IP, Seligson D, Said J, Horvath S, Reiter RE. Trefoil factor 3 is overexpressed in human prostate cancer. *Prostate* 2004; 61: 209-14.

Gerber B, Boretti FS, Kley S, Luluha P, Muller C, Sieber N, Unterer S, Wenger M, Fluckiger M, Glaus T, Reusch CE. Evaluation of clinical signs and causes of lower urinary tract disease in European cats. *J Small Anim Pract* 2005; 46: 571-7.

Gerber B, Eichenberger S, Reusch CE. Guarded long-term prognosis in male cats with urethral obstruction. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 16-23.

Gollin G, Marks C, Marks WH. Intestinal fatty acid binding protein in serum and urine reflects early ischemic injury to the small bowel. *Surgery* 1993; 113: 545-51.

Gora NV, Bairakova AL, Kozlov LV. [Enzyme immunoassay of masked complement component C4 deficiency in patients with urogenital Chlamydia infection]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2011; 76-80.

Gorreta F, Runfola TP, VanMeter AJ, Barzaghi D, Chandhoke V, Del Giacco L. Identification of thioredoxin reductase 1-regulated genes using small interference RNA and cDNA microarray. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1079-88.

Gorski JP. Quantitation of human complement fragment C4ai in physiological fluids by competitive inhibition radioimmune assay. *J Immunol Methods* 1981; 47: 61-73.

Gromer S, Urig S, Becker K. The thioredoxin system--from science to clinic. *Med Res Rev* 2004; 24: 40-89.

Gunn-Moore DA. Feline lower urinary tract disease. *J Feline Med Surg* 2003; 5: 133-8.

Gunn-Moore DA, Shenoy CM. Oral glucosamine and the management of feline idiopathic cystitis. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 219-25.

Gwinner W, Jackle-Meyer I, Stolte H. Origin of urinary fibronectin. *Lab Invest* 1993; 69: 250-5.

Hallden G, Holehouse EL, Dong X, Aponte GW. Expression of intestinal fatty acid binding protein in intestinal epithelial cell lines, hBRIE 380 cells. *Am J Physiol* 1994; 267: G730-43.

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994; 265: 808-11.

Hansen JS. Urachal remnant in the cat: occurrence and relationship to the feline urological syndrome. *Vet Med Small Anim Clin* 1977; 72: 1735-46.

Hardman M, Makarov AA. Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. *Anal Chem* 2003; 75: 1699-705.

Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Furuichi S, Maruoka S, Takeshita I, Hirota K, Yodoi J, Horie T. Thioredoxin negatively regulates p38 MAP kinase activation and IL-6 production by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 1999a; 258: 443-7.

Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Nakayama T, Takeshita I, Horie T. Hyperosmolarity-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Crit Care Med* 1999b; 159: 634-40.

Hauser PJ, Dozmorov MG, Bane BL, Slobodov G, Culkin DJ, Hurst RE. Abnormal expression of differentiation related proteins and proteoglycan core proteins in the urothelium of patients with interstitial cystitis. *J Urol* 2008; 179: 764-9.

Hegele A, Heidenreich A, Varga Z, von Knobloch R, Olbert P, Kropf J, Hofmann R. Cellular fibronectin in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Res* 2003; 30: 363-6.

Heijnen BH, Straatsburg IH, Padilla ND, Van Mierlo GJ, Hack CE, Van Gulik TM. Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 15-23.

Helin H, Mattila J, Rantala I, Vaalasti T. In vivo binding of immunoglobulin and complement to elastic structures in urinary bladder vascular walls in interstitial cystitis: demonstration by immunoelectron microscopy. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 43: 88-96.

Hicks RM. The permeability of rat transitional epithelium. Kertinization and the barrier to water. *J Cell Biol* 1966; 28: 21-31.

Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* 1999; 274: 27891-7.

Ho CL, Tzai TS, Chen JC, Tsai HW, Cheng HL, Eisenberger CF, Chow NH. The molecular signature for urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *J Urol* 2008; 179: 1155-9.

Holmes A, le Guisquet AM, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29: 1335-46.

Holmgren A, Bjornstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 1995; 252: 199-208.

Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 120-4.

Hood L, Heath JR, Phelps ME, Lin B. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science* 2004; 306: 640-3.

Hori K, Katayama M, Sato N, Ishii K, Waga S, Yodoi J. Neuroprotection by glial cells through adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin (ADF/TRX). *Brain Res* 1994; 652: 304-10.

Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 2005; 40: 430-43.

Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* 1998; 273: 29648-53.

Hugli TE. Structure and function of the anaphylatoxins. Springer Semin Immunopathol 1984; 7: 193-219.

Hurst RE, Parsons CL, Roy JB, Young JL. Urinary glycosaminoglycan excretion as a laboratory marker in the diagnosis of interstitial cystitis. J Urol 1993; 149: 31-5.

Hurst RE, Moldwin RM, Mulholland SG. Bladder defense molecules, urothelial differentiation, urinary biomarkers, and interstitial cystitis. Urology 2007; 69: 17-23.

Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. J Cell Biol 1982; 95: 369-77.

Jeffrey GP, Oates PS, Wang TC, Babyatsky MW, Brand SJ. Spasmolytic polypeptide: a trefoil peptide secreted by rat gastric mucous cells. Gastroenterology 1994; 106: 336-45.

Jones BR, Sanson RL, Morris RS. Elucidating the risk factors of feline lower urinary tract disease. N Z Vet J 1997; 45: 100-8.

Jorgensen KH, Thim L, Jacobsen HE. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. Regul Pept 1982; 3: 207-19.

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem 1988; 60: 2299-301.

Kasuno K, Nakamura H, Ono T, Muso E, Yodoi J. Protective roles of thioredoxin, a redox-regulating protein, in renal ischemia/reperfusion injury. Kidney Int 2003; 64: 1273-82.

Kasuno K, Kimura H, Takahashi N, Mikami D, Yokoyama Y, Nobukawa Y,

Shigemi K, Yoshida H. [Clinical application of urinary redox regulating protein, thioredoxin]. *Rinsho Byori* 2011; 59: 189-95.

Katayama M, Hino F, Odate Y, Goto S, Kimizuka F, Kato I, Titani K, Sekiguchi K. Isolation and characterization of two monoclonal antibodies that recognize remote epitopes on the cell-binding domain of human fibronectin. *Exp Cell Res* 1989; 185: 229-36.

Katayama M, Hino F, Kato I. [Urinary fibronectin of cancer patients detected by monoclonal antibody]. *Nihon Rinsho* 1990; 48 Suppl: 946-8.

Katayama M, Hino F, Kamihagi K, Sekiguchi K, Titani K, Kato I. Urinary fibronectin fragments (a potential tumor marker) measured by immunoenzymometric assay with domain-specific monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1991; 37: 466-71.

Keay S, Zhang CO, Trifillis AL, Hise MK, Hebel JR, Jacobs SC, Warren JW. Decreased <sup>3</sup>H-thymidine incorporation by human bladder epithelial cells following exposure to urine from interstitial cystitis patients. *J Urol* 1996; 156: 2073-8.

Keay S, Zhang CO, Kagen DI, Hise MK, Jacobs SC, Hebel JR, Gordon D, Whitmore K, Bodison S, Warren JW. Concentrations of specific epithelial growth factors in the urine of interstitial cystitis patients and controls. *J Urol* 1997; 158: 1983-8.

Keay S, Warren JW. A hypothesis for the etiology of interstitial cystitis based upon inhibition of bladder epithelial repair. *Med Hypotheses* 1998; 51: 79-83.

Keay S, Zhang CO, Hise MK, Hebel JR, Jacobs SC, Gordon D, Whitmore K, Bodison S, Gordon N, Warren JW. A diagnostic in vitro urine assay for interstitial cystitis. *Urology* 1998; 52: 974-8.

Keay S, Kleinberg M, Zhang CO, Hise MK, Warren JW. Bladder epithelial cells from patients with interstitial cystitis produce an inhibitor of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor production. *J Urol* 2000; 164: 2112-8.

Keay S, Zhang CO, Marvel R, Chai T. Antiproliferative factor, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, and epidermal growth factor: sensitive and specific urine markers for interstitial cystitis. *Urology* 2001a; 57: 104.

Keay S, Seillier-Moiseiwitsch F, Zhang CO, Chai TC, Zhang J. Changes in human bladder epithelial cell gene expression associated with interstitial cystitis or antiproliferative factor treatment. *Physiol Genomics* 2003a; 14: 107-15.

Keay S, Zhang CO, Shoenfelt JL, Chai TC. Decreased in vitro proliferation of bladder epithelial cells from patients with interstitial cystitis. *Urology* 2003b; 61: 1278-84.

Keay S, Zhang CO, Chai T, Warren J, Koch K, Grkovic D, Colville H, Alexander R. Antiproliferative factor, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, and epidermal growth factor in men with interstitial cystitis versus chronic pelvic pain syndrome. *Urology* 2004; 63: 22-6.

Keay S, Reeder JE, Koch K, Zhang CO, Grkovic D, Peters K, Zhang Y, Kusek JW, Nyberg LM, Payne CK, Propert KJ. Prospective evaluation of candidate urine and cell markers in patients with interstitial cystitis enrolled in a randomized clinical trial of Bacillus Calmette Guerin (BCG). *World J Urol* 2007; 25: 499-504.

Keay S. Cell signaling in interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Cell Signal* 2008; 20: 2174-9.

Keay SK, Zhang CO, Shoenfelt J, Erickson DR, Whitmore K, Warren JW, Marvel R, Chai T. Sensitivity and specificity of antiproliferative factor, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, and epidermal growth factor as urine markers for interstitial cystitis. *Urology* 2001b; 57: 9-14.

Kelada E, Jones A. Interstitial cystitis. *Arch Gynecol Obstet* 2007; 275: 223-9.

Kim HJ, Sohng I, Kim DH, Lee DC, Hwang CH, Park JY, Ryu JW. Investigation of early protein changes in the urinary bladder following partial bladder outlet obstruction by proteomic approach. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 1000-5.

Kim J, Keay SK, Dimitrakov JD, Freeman MR. p53 mediates interstitial cystitis antiproliferative factor (APF)-induced growth inhibition of human urothelial cells. *FEBS Lett* 2007; 581: 3795-9.

Kim J, Keay SK, Freeman MR. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor functionally antagonizes interstitial cystitis antiproliferative factor via mitogen-activated protein kinase pathway activation. *BJU Int* 2009; 103: 541-6.

Kim J, Freeman MR. Antiproliferative factor signaling and interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Int Neurourol J* 2011; 15: 184-91.

Kim J, Ji M, DiDonato JA, Rackley RR, Kuang M, Sadhukhan PC, Mauney JR, Keay SK, Freeman MR, Liou LS, Adam RM. An hTERT-immortalized human urothelial cell line that responds to anti-proliferative factor. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011; 47: 2-9.

Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science* 2002; 295: 1662-4.

Kjellev S. The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 1350-69.

Klima J, Lacina L, Dvorankova B, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H, Kaltner H, Andre S, Motlik J, Gabius HJ, Smetana K, Jr. Differential regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration. *Physiol Res* 2009; 58: 873-84.

Kobayashi-Miura M, Nakamura H, Yodoi J, Shiota K. Thioredoxin, an anti-oxidant protein, protects mouse embryos from oxidative stress-induced developmental anomalies. *Free Radic Res* 2002; 36: 949-56.

Kohl P, Crampin EJ, Quinn TA, Noble D. Systems biology: an approach. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88: 25-33.

Kolachala VL, Bajaj R, Wang L, Yan Y, Ritzenthaler JD, Gewirtz AT, Roman J, Merlin D, Sitaraman SV. Epithelial-derived fibronectin expression, signaling, and function in intestinal inflammation. *J Biol Chem* 2007; 282: 32965-73.

Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch* 1996; 429: 311-22.

Kostenko S, Dumitriu G, Laegreid KJ, Moens U. Physiological roles of mitogen-activated-protein-kinase-activated p38-regulated/activated protein kinase. *World J Biol Chem* 2011; 2: 73-89.

Kraijer M, Fink-Gremmels J, Nickel RF. The short-term clinical efficacy of amitriptyline in the management of idiopathic feline lower urinary tract disease: a controlled clinical study. *J Feline Med Surg* 2003; 5: 191-6.

Krhut J, Zvara P. Intravesical instillation of botulinum toxin A: an in vivo murine study and pilot clinical trial. *Int Urol Nephrol* 2011; 43: 337-43.

Kruger JM, Osborne CA. The role of viruses in feline lower urinary tract disease. *J Vet Intern Med* 1990; 4: 71-8.

Kruger JM, Osborne CA, Goyal SM, O'Brien TD, Pomeroy KA, Semlak RA. Clinicopathologic analysis of herpesvirus-induced urinary tract infection in specific-pathogen-free cats given methylprednisolone. *Am J Vet Res* 1990; 51: 878-85.

Kruger JM, Osborne CA, Goyal SM, Wickstrom SL, Johnston GR, Fletcher TF, Brown PA. Clinical evaluation of cats with lower urinary tract disease. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 211-6.

Kruger JM, Osborne CA. The role of uropathogens in feline lower urinary tract disease. Clinical implications. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1993; 23: 101-23.

Kruger JM, Conway TS, Kaneene JB, Perry RL, Hagenlocker E, Golombek A, Stuhler J. Randomized controlled trial of the efficacy of short-term amitriptyline administration for treatment of acute, nonobstructive, idiopathic lower urinary tract disease in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222: 749-58.

Kruger JM, Osborne CA, Lulich JP. Changing paradigms of feline idiopathic cystitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2009; 39: 15-40.

Kumar B, Sinclair J, Khandrika L, Koul S, Wilson S, Koul HK. Differential effects of MAPKs signaling on the growth of invasive bladder cancer cells. *Int J Oncol* 2009; 34: 1557-64.

Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 1991; 39: 550-6.

Kunz C, Lonnerdal B. Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. *Am J Clin Nutr* 1990; 51: 37-46.

Kurt-Jones EA, Cao L, Sandor F, Rogers AB, Whary MT, Nambiar PR, Cerny A, Bowen G, Yan J, Takaishi S, Chi AL, Reed G, Houghton J, Fox JG, Wang TC. Trefoil family factor 2 is expressed in murine gastric and immune cells and controls both gastrointestinal inflammation and systemic immune responses. *Infect Immun* 2007; 75: 471-80.

Langbein S, Brade J, Badawi JK, Hatzinger M, Kaltner H, Lensch M, Specht K, Andre S, Brinck U, Alken P, Gabius HJ. Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance. *Histopathology* 2007; 51: 681-90.

Larson J, Kruger JM, Wise AG, Kaneene JB, Miller R, Fitzgerald SD, Kiupel M, Maes RK. Nested case-control study of feline calicivirus viraemia, oral carriage, and serum neutralizing antibodies in cats with idiopathic cystitis. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 199-205.

Laurent TC, Moore EC, Reichard P. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from *Escherichia Coli* B. *J Biol Chem* 1964; 239: 3436-44.

Lavelle JP, Apodaca G, Meyers SA, Ruiz WG, Zeidel ML. Disruption of guinea pig urinary bladder permeability barrier in noninfectious cystitis. *Am J Physiol* 1998; 274: F205-14.

Lavelle JP, Meyers SA, Ruiz WG, Buffington CA, Zeidel ML, Apodaca G. Urothelial pathophysiological changes in feline interstitial cystitis: a human model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F540-53.

Lees GE. Epidemiology of naturally occurring feline bacterial urinary tract infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1984; 14: 471-9.

Lekcharoensuk C, Osborne CA, Lulich JP. Epidemiologic study of risk factors for lower urinary tract diseases in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 1429-35.

Lemberger SI, Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Hirmer S, Hartmann K, Dorsch R. Comparison of urine protein profiles in cats without urinary tract disease and cats with idiopathic cystitis, bacterial urinary tract infection, or urolithiasis. *Am J Vet Res* 2011a; 72: 1407-15.

Lemberger SI, Dorsch R, Hauck SM, Amann B, Hirmer S, Hartmann K, Deeg CA. Decrease of Trefoil factor 2 in cats with feline idiopathic cystitis. *BJU Int* 2011b; 107: 670-7.

Leung WK, Yu J, Chan FK, To KF, Chan MW, Ebert MP, Ng EK, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J Pathol* 2002; 197: 582-8.

Lewis SA. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F867-74.

Liebert M. The urothelial glycosaminoglycan layer revisited. *J Urol* 2009; 182: 2103-4.

Liebich HG. Harnorgane. In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 4th edn München: Schattauer 2004: 269-70.

Lin YH, Liu G, Kavran M, Altuntas CZ, Gasbarro G, Tuohy VK, Daneshgari F. Lower urinary tract phenotype of experimental autoimmune cystitis in mouse: a potential animal model for interstitial cystitis. *BJU Int* 2008; 102: 1724-30.

Liu W, Nakamura H, Shioji K, Tanito M, Oka S, Ahsan MK, Son A, Ishii Y, Kishimoto C, Yodoi J. Thioredoxin-1 ameliorates myosin-induced autoimmune myocarditis by suppressing chemokine expressions and leukocyte chemotaxis in mice. *Circulation* 2004; 110: 1276-83.

Liu X, Ren X, Deng X, Huo Y, Xie J, Huang H, Jiao Z, Wu M, Liu Y, Wen T. A protein interaction network for the analysis of the neuronal differentiation of neural stem cells in response to titanium dioxide nanoparticles. *Biomaterials* 2010; 31: 3063-70.

Lose G, Frandsen B, Hojensgard JC, Jespersen J, Astrup T. Chronic interstitial

cystitis: increased levels of eosinophil cationic protein in serum and urine and an ameliorating effect of subcutaneous heparin. *Scand J Urol Nephrol* 1983; 17: 159-61.

Lotz M, Villiger P, Hugli T, Koziol J, Zuraw BL. Interleukin-6 and interstitial cystitis. *J Urol* 1994; 152: 869-73.

Lowe EM, Anand P, Terenghi G, Williams-Chestnut RE, Sinicropi DV, Osborne JL. Increased nerve growth factor levels in the urinary bladder of women with idiopathic sensory urgency and interstitial cystitis. *Br J Urol* 1997; 79: 572-7.

Luber-Narod J, Austin-Ritchie T, Banner B, Hollins C, 3rd, Maramag C, Price H, Menon M. Experimental autoimmune cystitis in the Lewis rat: a potential animal model for interstitial cystitis. *Urol Res* 1996; 24: 367-73.

Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Kolar LM, Klausner JS. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 214: 1336-41.

Lundberg JO, Ehren I, Jansson O, Adolfsson J, Lundberg JM, Weitzberg E, Alving K, Wiklund NP. Elevated nitric oxide in the urinary bladder in infectious and noninfectious cystitis. *Urology* 1996; 48: 700-2.

Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* 2000; 72: 1156-62.

Marchand JE, Sant GR, Kream RM. Increased expression of substance P receptor-encoding mRNA in bladder biopsies from patients with interstitial cystitis. *Br J Urol* 1998; 81: 224-8.

Matthews SG. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 373-80.

Mattila J, Harmoinen A, Hallstrom O. Serum immunoglobulin and complement alterations in interstitial cystitis. *Eur Urol* 1983; 9: 350-2.

Menendez V, Fernandez-Suarez A, Galan JA, Perez M, Garcia-Lopez F. Diagnosis of bladder cancer by analysis of urinary fibronectin. *Urology* 2005; 65: 284-9.

Michelis R, Sela S, Sbeit W, Cohen HI, Reshef R. Decreased TFF2 expression in the gastric antrum in patients infected with CagA-positive *Helicobacter pylori*. *Isr Med Assoc J* 2009; 11: 11-5.

Miyamoto M, Kishimoto C, Nimata M, Nakamura H, Yodoi J. Thioredoxin, a redox-regulating protein, is expressed in spontaneous myocarditis in inbred strains of mice. *Int J Cardiol* 2004; 95: 315-9.

Monti M, Cozzolino M, Cozzolino F, Vitiello G, Tedesco R, Flagiello A, Pucci P. Puzzle of protein complexes in vivo: a present and future challenge for functional proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2009; 6: 159-69.

Mosher DF. Physiology of fibronectin. *Annu Rev Med* 1984; 35: 561-75.

Moskowitz MO, Byrne DS, Callahan HJ, Parsons CL, Valderrama E, Moldwin RM. Decreased expression of a glycoprotein component of bladder surface mucin (GP1) in interstitial cystitis. *J Urol* 1994; 151: 343-5.

Moulds JM, Warner NB, Arnett FC. Complement component C4A and C4B levels in systemic lupus erythematosus: quantitation in relation to C4 null status and disease activity. *J Rheumatol* 1993; 20: 443-7.

Mutlu N, Turkeri L, Emerk K. Analytical and clinical evaluation of a new urinary tumor marker: bladder tumor fibronectin in diagnosis and follow-up of bladder cancer. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1069-74.

Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. Redox imbalance and its control in HIV infection. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 455-64.

Negrete HO, Lavelle JP, Berg J, Lewis SA, Zeidel ML. Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *Am J Physiol* 1996; 271: F886-94.

Neuhaus J, Schwalenberg T, Horn LC, Alexander H, Stolzenburg JU. New aspects in the differential diagnosis and therapy of bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Adv Urol* 2011; 2011: 639479.

Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WK. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* 1972; 177: 56-8.

Ockner RK, Manning JA. Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J Clin Invest* 1974; 54: 326-38.

Olsen JV, de Godoy LM, Li G, Macek B, Mortensen P, Pesch R, Makarov A, Lange O, Horning S, Mann M. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 2010-21.

Olsen JV, Macek B. High accuracy mass spectrometry in large-scale analysis of protein phosphorylation. *Methods Mol Biol* 2009; 492: 131-42.

Osborne C, Kroll R, JP L. Medical management of vesicourachal diverticula in 15 cats with lower urinary tract disease. *J Small Anim Pract* 1989; 30: 608-12.

Osborne CA, Johnston GR, Kruger JM, O'Brien TD, Lulich JP. Etiopathogenesis and biological behavior of feline vesicourachal diverticula. Don't just do something--stand there. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1987; 17: 697-733.

Osborne CA, Lulich JP, Kruger JM, Polzin DJ, Johnston GR, Kroll RA. Medical dissolution of feline struvite urocystoliths. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 196: 1053-63.

Osborne CA, Kruger JM, Lulich JP, Johnston GR, Polzin DJ, Ulrich LK, Sanna J. Prednisolone therapy of idiopathic feline lower urinary tract disease: a double-blind clinical study. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996a; 26: 563-9.

Osborne CA, Lulich JP, Thumchai R, Ulrich LK, Koehler LA, Bird KA, Bartges JW. Feline urolithiasis. Etiology and pathophysiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996b; 26: 217-32.

Osborne CA, Kruger JM, Lulich JP, Polzin DJ. Feline urologic syndrome, feline lower urinary tract disease, feline interstitial cystitis: what's in a name? *J Am Vet Med Assoc* 1999; 214: 1470-80.

Ostergaard M, Rasmussen HH, Nielsen HV, Vorum H, Orntoft TF, Wolf H, Celis JE. Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res* 1997; 57: 4111-7.

Paimela L, Leirisalo-Repo M, Lokki ML, Koskimies S. Prognostic significance of complement alleles Bf and C4 in early rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1996; 15: 594-8.

Palma TF, Seabra A, Souto SC, Maciel L, Alvarenga M, Siniscalchi R, Ganzarolli M, Ricetto C. [A new experimental model for inducing interstitial cystitis by oxidative stress using bladder instillation of a nitric oxide donor gel]. *Actas Urol Esp* 2011; 35: 253-8.

Panchaphanpong J, Asawakarn T, Pusoonthornthum R. Effects of oral administration of N-acetyl-d-glucosamine on plasma and urine concentrations of glycosaminoglycans in cats with idiopathic cystitis. *Am J Vet Res* 2011; 72: 843-50.

Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002; 115: 3861-3.

Parlato F, Pisano G, Misiano G, Cosentini E, Cacciapuoti C, Cavalcanti MR, Brai M, Bellastella A. HLADR5 and C4BQO high frequency and antinuclear antibodies positivity in patients with 21 hydroxylase deficiency from Campania region. *J Endocrinol Invest* 1992; 15: 429-36.

Parsons CL. The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis. *Urology* 2007; 69: 9-16.

Patronek GJ, Glickman LT, Beck AM, McCabe GP, Ecker C. Risk factors for relinquishment of cats to an animal shelter. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 209: 582-8.

Pedersen NC, Pool RR, O'Brien T. Feline chronic progressive polyarthritis. *Am J Vet Res* 1980; 41: 522-35.

Pereira DA, Aguiar JA, Hagiwara MK, Michelacci YM. Changes in cat urinary glycosaminoglycans with age and in feline urologic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1672: 1-11.

Persu C, Cauni V, Gutue S, Blaj I, Jinga V, Geavlete P. From interstitial cystitis to chronic pelvic pain. *J Med Life* 2010; 3: 167-74.

Petschnigg J, Snider J, Stagljar I. Interactive proteomics research technologies: recent applications and advances. *Curr Opin Biotechnol* 2011; 22: 50-8.

Pham TV, Piersma SR, Oudgenoeg G, Jimenez CR. Label-free mass spectrometry-based proteomics for biomarker discovery and validation. *Expert Rev Mol Diagn* 2012; 12: 343-59.

Phull H, Salkini M, Purves T, Funk J, Copeland D, Comiter CV. Angiotensin II plays a role in acute murine experimental autoimmune cystitis. *BJU Int* 2007;

100: 664-7.

Powis G, Mustacich D, Coon A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 312-22.

Randich A, Uzzell T, DeBerry JJ, Ness TJ. Neonatal urinary bladder inflammation produces adult bladder hypersensitivity. *J Pain* 2006; 7: 469-79.

Rashid HH, Reeder JE, O'Connell MJ, Zhang CO, Messing EM, Keay SK. Interstitial cystitis antiproliferative factor (APF) as a cell-cycle modulator. *BMC Urol* 2004; 4: 3.

Redwood SM, Liu BC, Weiss RE, Hodge DE, Droller MJ. Abrogation of the invasion of human bladder tumor cells by using protease inhibitor(s). *Cancer* 1992; 69: 1212-9.

Regalo G, Wright NA, Machado JC. Trefoil factors: from ulceration to neoplasia. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2910-5.

Rich LJ, Fabricant CG. Urethral obstruction in male cats: transmission studies. *Can J Comp Med* 1969; 33: 164-5.

Rich LJ, Fabricant CG, Gillespie JH. Virus induced urolithiasis in male cats. *Cornell Vet* 1971; 61: 542-53.

Rinnert M, Hinz M, Buhtz P, Reiher F, Lessel W, Hoffmann W. Synthesis and localization of trefoil factor family (TFF) peptides in the human urinary tract and TFF2 excretion into the urine. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 639-47.

Rondanino C, Poland PA, Kinlough CL, Li H, Rbaibi Y, Myerburg MM, Al-bataineh MM, Kashlan OB, Pastor-Soler NM, Hallows KR, Weisz OA, Apodaca G, Hughey RP. Galectin-7 modulates the length of the primary cilia and wound repair in polarized kidney epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301:

F622-33.

Roppolo JR, Tai C, Booth AM, Buffington CA, de Groat WC, Birder LA. Bladder Adelta afferent nerve activity in normal cats and cats with feline interstitial cystitis. *J Urol* 2005; 173: 1011-5.

Rotilio D, Della Corte A, D'Imperio M, Coletta W, Marcone S, Silvestri C, Giordano L, Di Michele M, Donati MB. Proteomics: bases for protein complexity understanding. *Thromb Res* 2012; 129: 257-62.

Saevik BK, Trangerud C, Ottesen N, Sorum H, Eggertsdottir AV. Causes of lower urinary tract disease in Norwegian cats. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 410-7.

Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998; 17: 2596-606.

Saussez S, Kiss R. Galectin-7. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 686-97.

Schmid C, Dorsch R, Sauter-Louis C, Hartmann K. Epidemiologie und klinische Präsentation von Katzen mit FLUTD. *Tierärztl Prax* 2009; 37: A24.

Schneider MR, Wolf E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol* 2009; 218: 460-6.

Shapiro L, Dinarello CA. Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 12230-4.

Shie JH, Liu HT, Kuo HC. Increased cell apoptosis of urothelium mediated by inflammation in interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Urology* 2012; 79: 484 e7-13.

Smith SD, Wheeler MA, Foster HE, Jr., Weiss RM. Urinary nitric oxide synthase

activity and cyclic GMP levels are decreased with interstitial cystitis and increased with urinary tract infections. *J Urol* 1996; 155: 1432-5.

Soini Y, Haapasaari KM, Vaarala MH, Turpeenniemi-Hujanen T, Karja V, Karihtala P. 8-hydroxydeguanosine and nitrotyrosine are prognostic factors in urinary bladder carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2011; 4: 267-75.

Specht AJ, Kruger JM, Fitzgerald SD. Histochemical and immunohistochemical features of chronic feline idiopathic cystitis. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 416.

Stahl GL, Xu Y, Hao L, Miller M, Buras JA, Fung M, Zhao H. Role for the alternative complement pathway in ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2003; 162: 449-55.

Stancovski I, Baltimore D. NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* 1997; 91: 299-302.

Stanislawski L, Sorin M. Modifications of plasma fibronectin in cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 1991; 59: 949-54.

Stefankova P, Kollarova M, Barak I. Thioredoxin - structural and functional complexity. *Gen Physiol Biophys* 2005; 24: 3-11.

Steinert BW, Diokno AC, Robinson JE, Mitchell BA. Complement C3, eosinophil cationic protein and symptom evaluation in interstitial cystitis. *J Urol* 1994; 151: 350-4.

Stella JL, Lord LK, Buffington CA. Sickness behaviors in response to unusual external events in healthy cats and cats with feline interstitial cystitis. *J Am Vet Med Assoc* 2011; 238: 67-73.

Sun Y, Chai TC. Augmented extracellular ATP signaling in bladder urothelial cells from patients with interstitial cystitis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290:

C27-34.

Sun Y, Keay S, Lehrfeld TJ, Chai TC. Changes in adenosine triphosphate-stimulated ATP release suggest association between cytokine and purinergic signaling in bladder urothelial cells. *Urology* 2009; 74: 1163-8.

Swenson C, Kruger J, Gibbons-Burgener S. Accurate light microscopic detection of bacteriuria in cats. *J Vet Intern Med* 2004; 441

Swiatkowski S, Seifert HH, Steinhoff C, Prior A, Thievessen I, Schliess F, Schulz WA. Activities of MAP-kinase pathways in normal uroepithelial cells and urothelial carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 2003; 282: 48-57.

Takeda K, Shimozono R, Noguchi T, Umeda T, Morimoto Y, Naguro I, Tobiume K, Saitoh M, Matsuzawa A, Ichijo H. Apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 2 functions as a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in a heteromeric complex with ASK1. *J Biol Chem* 2007; 282: 7522-31.

Takeuchi F, Nabeta H, Hong GH, Matsuta K, Tokunaga K, Tanimoto K, Nakano K. C4A and C4B null alleles are genetic markers of different types of systemic sclerosis in Japanese patients. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 55-60.

Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 799-804.

Thim L. A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett* 1989; 250: 85-90.

Thuijls G, van Wijck K, Grootjans J, Derikx JP, van Bijnen AA, Heineman E, Dejong CH, Buurman WA, Poeze M. Early diagnosis of intestinal ischemia using urinary and plasma fatty acid binding proteins. *Ann Surg* 2011; 253: 303-8.

Tomasetto C, Rio MC, Gautier C, Wolf C, Hareuveni M, Chambon P, Lathe R. hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J* 1990; 9: 407-14.

Van QN, Klose JR, Lucas DA, Prieto DA, Luke B, Collins J, Burt SK, Chmurny GN, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD, Keay SK. The use of urine proteomic and metabonomic patterns for the diagnosis of interstitial cystitis and bacterial cystitis. *Dis Markers* 2003; 19: 169-83.

Vercellini P, Somigliana E, Vigano P, Abbiati A, Barbara G, Fedele L. Chronic pelvic pain in women: etiology, pathogenesis and diagnostic approach. *Gynecol Endocrinol* 2009; 25: 149-58.

Von Mering C, Jensen LJ, Kuhn M, Chaffron S, Doerks T, Kruger B, Snel B, Bork P. STRING 7--recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: D358-62.

Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, Szyf M. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci* 2005; 25: 11045-54.

Wei DC, Politano VA, Selzer MG, Lokeshwar VB. The association of elevated urinary total to sulfated glycosaminoglycan ratio and high molecular mass hyaluronic acid with interstitial cystitis. *J Urol* 2000; 163: 1577-83.

Weiss RE, Liu BC, Ahlering T, Dubeau L, Droller MJ. Mechanisms of human bladder tumor invasion: role of protease cathepsin B. *J Urol* 1990; 144: 798-804.

Westropp JL, Buffington CA. In vivo models of interstitial cystitis. *J Urol* 2002; 167: 694-702.

Westropp JL, Welk KA, Buffington CA. Small adrenal glands in cats with feline

interstitial cystitis. *J Urol* 2003; 170: 2494-7.

Westropp JL, Buffington CA, Chew DJ (2005) Feline lower urinary tract disease. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7th edn. Elsevier Inc., St. Louis. 1828-50

Westropp JL, Kass PH, Buffington CA. Evaluation of the effects of stress in cats with idiopathic cystitis. *Am J Vet Res* 2006; 67: 731-6.

Westropp JL, Kass PH, Buffington CA. In vivo evaluation of alpha(2)-adrenoceptors in cats with idiopathic cystitis. *Am J Vet Res* 2007; 68: 203-7.

Whitmore KE. Self-care regimens for patients with interstitial cystitis. *Urol Clin North Am* 1994; 21: 121-30.

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 1996a; 14: 61-5.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996b; 13: 19-50.

Wong WM, Poulson R, Wright NA. Trefoil peptides. *Gut* 1999; 44: 890-5.

Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 1997; 278: 866-9.

Wright EJ, McCaffrey TA, Robertson AP, Vaughan ED, Jr., Felsen D. Chronic unilateral ureteral obstruction is associated with interstitial fibrosis and tubular

expression of transforming growth factor-beta. *Lab Invest* 1996; 74: 528-37.

Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, Rio MC, Thim L. Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett* 1997; 408: 121-3.

Yamada KM, Kennedy DW. Fibroblast cellular and plasma fibronectins are similar but not identical. *J Cell Biol* 1979; 80: 492-8.

Yamamoto M, Yang G, Hong C, Liu J, Holle E, Yu X, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J. Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 2003; 112: 1395-406.

Yang W, Kim Y, Kim TK, Keay SK, Kim KP, Steen H, Freeman MR, Hwang D, Kim J. Integration analysis of quantitative proteomics and transcriptomics data identifies potential targets of frizzled-8 protein-related antiproliferative factor in vivo. *BJU Int* 2012; 110: E1138-46.

Yoshida T, Oka S, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J. The role of thioredoxin in the aging process: involvement of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5: 563-70.

Yoshioka J, Schreiter ER, Lee RT. Role of thioredoxin in cell growth through interactions with signaling molecules. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 2143-51.

Zeza L, Reusch CE, Gerber B. Intravesical application of lidocaine and sodium bicarbonate in the treatment of obstructive idiopathic lower urinary tract disease in cats. *J Vet Intern Med* 2012; 26: 526-31.

Zhang CO, Li ZL, Kong CZ. APF, HB-EGF, and EGF biomarkers in patients with ulcerative vs. non-ulcerative interstitial cystitis. *BMC Urol* 2005a; 5: 7.

Zhang CO, Wang JY, Koch KR, Keay S. Regulation of tight junction proteins and

---

bladder epithelial paracellular permeability by an antiproliferative factor from patients with interstitial cystitis. *J Urol* 2005b; 174: 2382-7.

Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 1994; 145: 114-25.

Zhou W. The new face of anaphylatoxins in immune regulation. *Immunobiology* 2012; 217: 225-34.

## VIII. ANHANG

Tab. 1: Patientendaten

*FIC = Feline idiopathische Zystitis, EKH = Europäische Kurzhaarkatze, BKH = Britische Kurzhaarkatze, MC = Maine Coon, RB = Russisch Blau, w = weiblich, wk = weiblich kastriert, m = männlich, mk = männlich kastriert, Z = Zystozenteseurin, K = Katheterurin*

| Gruppe | Patient Nr. | Rasse | Alter (Jahre) | Geschlecht | Urinentnahme | FIC-Episode |
|--------|-------------|-------|---------------|------------|--------------|-------------|
| FIC    | 1           | EKH   | 5             | mk         | Z            | I           |
|        | 2           | EKH   | 9             | mk         | Z            | III         |
|        | 3           | EKH   | 4             | mk         | K            | I           |
|        | 4           | EKH   | 6             | mk         | Z            | I           |
|        | 5           | EKH   | 5             | mk         | K            | III         |
|        | 6           | EKH   | 4             | mk         | Z            | I           |
|        | 7           | MC    | 4             | mk         | Z            | I           |
|        | 8           | EKH   | 3             | mk         | Z            | I           |
|        | 9           | EKH   | 4             | mk         | K            | I           |
|        | 10          | EKH   | 3             | mk         | Z            | I           |
|        | 11          | EKH   | 5             | mk         | Z            | III         |
|        | 12          | EKH   | 5             | mk         | Z            | II          |
|        | 13          | EKH   | 8             | mk         | K            | > III       |
|        | 14          | EKH   | 3             | mk         | K            | I           |
|        | 15          | EKH   | 2             | mk         | Z            | I           |
|        | 16          | EKH   | 4             | mk         | Z            | I           |
|        | 17          | EKH   | 7             | mk         | Z            | I           |
|        | 18          | EKH   | 3             | mk         | Z            | II          |
|        | 19          | EKH   | 9             | mk         | Z            | I           |
|        | 20          | EKH   | 10            | mk         | Z            | I           |
|        | 21          | EKH   | 6             | mk         | Z            | I           |
|        | 22          | EKH   | 5             | mk         | Z            | II          |
|        | 23          | EKH   | 10            | mk         | Z            | I           |
|        | 24          | EKH   | 4             | mk         | Z            | I           |
|        | 25          | EKH   | 4             | mk         | Z            | II          |
|        | 26          | EKH   | 4             | mk         | Z            | I           |
| Gesund | 1           | MC    | 3             | mk         | Z            | 0           |
|        | 2           | EKH   | 10            | mk         | Z            | 0           |
|        | 3           | BKH   | 11            | wk         | Z            | 0           |
|        | 4           | BKH   | 2             | wk         | Z            | 0           |
|        | 5           | RB    | 2             | wk         | Z            | 0           |
|        | 6           | EKH   | 6             | w          | Z            | 0           |
|        | 7           | EKH   | 9             | mk         | Z            | 0           |
|        | 8           | MC    | 8             | w          | Z            | 0           |
|        | 9           | MC    | 13            | w          | Z            | 0           |
|        | 10          | MC    | 11            | mk         | Z            | 0           |
|        | 11          | MC    | 12            | mk         | Z            | 0           |
|        | 12          | MC    | 11            | wk         | Z            | 0           |
|        | 13          | MC    | 7             | w          | Z            | 0           |
|        | 14          | EKH   | 4             | mk         | Z            | 0           |
|        | 15          | EKH   | 12            | wk         | Z            | 0           |
|        | 16          | EKH   | 11            | mk         | Z            | 0           |
|        | 17          | EKH   | 6             | wk         | Z            | 0           |
|        | 18          | EKH   | 4             | mk         | Z            | 0           |
|        | 19          | EKH   | 4             | wk         | Z            | 0           |
|        | 20          | EKH   | 4             | mk         | Z            | 0           |

Tab. 2: Urin- und Proteinanalyse

USG = Urinspezifisches Gewicht, HPF = High power field, Einteilung der Erythrozyten: zahlreich = 50 – 100/HPF, massenhaft = > 100/HPF, Einteilung der Leukozyten: zahlreich = 5 – 12/HPF, massenhaft = > 12/HPF

| Gruppe | Patient Nr. | Protein (mg/ml) | USG  | Erythrozyten (/HPF) | Leukozyten (/HPF) |
|--------|-------------|-----------------|------|---------------------|-------------------|
| FIC    | 1           | 0,21            | 1037 | massenhaft          | 0-3               |
|        | 2           | 1,43            | 1042 | zahlreich           | 1-4               |
|        | 3           | 3,55            | 1043 | massenhaft          | 0-2               |
|        | 4           | 4,29            | 1035 | zahlreich           | 0-3               |
|        | 5           | 0,61            | 1049 | massenhaft          | 2-6               |
|        | 6           | 4,3             | 1019 | massenhaft          | zahlreich         |
|        | 7           | 5,16            | 1038 | massenhaft          | 0-4               |
|        | 8           | 1,83            | 1025 | massenhaft          | zahlreich         |
|        | 9           | 9,19            | 1040 | massenhaft          | zahlreich         |
|        | 10          | 0,41            | 1050 | massenhaft          | 0-3               |
|        | 11          | 4,99            | 1017 | massenhaft          | 0                 |
|        | 12          | 1,46            | 1042 | massenhaft          | 3-7               |
|        | 13          | 1,3             | 1032 | massenhaft          | zahlreich         |
|        | 14          | 2,98            | 1042 | massenhaft          | 0                 |
|        | 15          | 1,27            | 1035 | zahlreich           | zahlreich         |
|        | 16          | 1,35            | 1048 | 0-2                 | 0-1               |
|        | 17          | 1,89            | 1046 | massenhaft          | 0-4               |
|        | 18          | 13,9            | 1030 | massenhaft          | 5-6               |
|        | 19          | 0,61            | 1045 | massenhaft          | 0-4               |
|        | 20          | 1,74            | 1046 | zahlreich           | 0-2               |
|        | 21          | 1,66            | 1060 | zahlreich           | 0-4               |
|        | 22          | 8,85            | 1043 | massenhaft          | 4-9               |
|        | 23          | 1,03            | 1060 | 0-3                 | 0-2               |
|        | 24          | 0,45            | 1024 | zahlreich           | 0-1               |
|        | 25          | 0,64            | 1045 | 1-8                 | 0-2               |
|        | 26          | 1,91            | 1030 | zahlreich           | 0-4               |
| Gesund | 1           | 0,6             | 1060 | zahlreich           | 0-2               |
|        | 2           | 0,42            | 1035 | 0                   | 0                 |
|        | 3           | 0,63            | 1037 | 0-2                 | 0-1               |
|        | 4           | 0,54            | 1029 | 0-3                 | 0                 |
|        | 5           | 1,69            | 1046 | 0-2                 | 0-2               |
|        | 6           | 0,99            | 1034 | zahlreich           | 0-6               |
|        | 7           | 0,62            | 1045 | 5-8                 | 0-3               |
|        | 8           | 0,95            | 1060 | zahlreich           | 0-1               |
|        | 9           | 0,63            | 1060 | 0-1                 | 0-1               |
|        | 10          | 0,89            | 1060 | 0-2                 | 0-1               |
|        | 11          | 1,44            | 1035 | zahlreich           | 0-1               |
|        | 12          | 0,65            | 1060 | zahlreich           | 0-3               |
|        | 13          | 0,61            | 1060 | 2-10                | 0-2               |
|        | 14          | 0,54            | 1060 | zahlreich           | 0-5               |
|        | 15          | 0,19            | 1060 | 0-1                 | 0-1               |
|        | 16          | 0,62            | 1060 | 2-6                 | 0-1               |
|        | 17          | 0,35            | 1043 | 0-1                 | 0-3               |
|        | 18          | 1,1             | 1040 | zahlreich           | 0-2               |
|        | 19          | 0,26            | 1045 | 0-3                 | 0-2               |
|        | 20          | 0,3             | 1050 | 0-1                 | 0-2               |

Tab. 3: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten des Komplement C4a im Western Blot

*FIC* = *Feline idiopathische Zystitis*, *MW* = *Mittelwert*, *SD* = *Standardabweichung*, *k.A.* = *keine Angabe*

|               | <b>FIC</b>   | <b>Gesund</b> |
|---------------|--------------|---------------|
|               | 8202         | 2817          |
|               | 29478        | 9406          |
|               | 11799        | 12177         |
|               | 5250         | 6495          |
|               | 10003        | 2228          |
|               | 39023        | 464           |
|               | 13530        | 1296          |
|               | 4553         | 5548          |
|               | 15269        | 279           |
|               | 5513         | 397           |
|               | k.A.         | 1380          |
|               | k.A.         | 2426          |
|               | k.A.         | 731           |
| <b>MW</b>     | <b>14262</b> | <b>3511</b>   |
| <b>SD</b>     | <b>10766</b> | <b>3646</b>   |
| <b>Median</b> | <b>10901</b> | <b>2228</b>   |

Tab. 4: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten des Galektin-7 im Western Blot

*FIC* = *Feline idiopathische Zystitis*, *MW* = *Mittelwert*, *SD* = *Standardabweichung*, *k.A.* = *keine Angabe*

|               | <b>FIC</b>   | <b>Gesund</b> |
|---------------|--------------|---------------|
|               | 54657        | 1275          |
|               | 732          | 1335          |
|               | 1016         | 492           |
|               | 500          | 2484          |
|               | 177648       | 860           |
|               | 665          | 279           |
|               | 77507        | 1200          |
|               | 492          | 2089          |
|               | 3022         | 300           |
|               | 336888       | 1357          |
|               | 3284         | 1500          |
|               | 8971         | 1547          |
|               | 1579         | 1435          |
|               | 523          | 503           |
|               | 375          | k.A.          |
|               | 625          | k.A.          |
| <b>MW</b>     | <b>41780</b> | <b>1190</b>   |
| <b>SD</b>     | <b>88820</b> | <b>627</b>    |
| <b>Median</b> | <b>1298</b>  | <b>1305</b>   |

Tab. 5: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten des Intestinalen Fettsäure-bindenden Proteins im Western Blot

FIC = Feline idiopathische Zystitis, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, k.A. = keine Angabe

|               | <b>FIC</b>    | <b>Gesund</b> |
|---------------|---------------|---------------|
|               | 46454         | 3690          |
|               | 115           | 180707        |
|               | 1481          | 313           |
|               | 222           | 101922        |
|               | 2951          | 222           |
|               | 121           | 663951        |
|               | 1149677       | 537316        |
|               | 4150          | 49900         |
|               | 2532          | 144           |
|               | 409           | 539           |
|               | 345           | 6498          |
|               | 260           | 1160640       |
|               | 226           | 1386          |
|               | 801           | 3763          |
|               | 400           | 5949          |
|               | k.A.          | 1155          |
|               | k.A.          | 3862          |
|               | k.A.          | 102533        |
|               | k.A.          | 216           |
|               | k.A.          | 7172          |
| <b>MW</b>     | <b>80676</b>  | <b>141594</b> |
| <b>SD</b>     | <b>285928</b> | <b>294268</b> |
| <b>Median</b> | <b>409</b>    | <b>4906</b>   |

Tab. 6: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten des Thioredoxins im Western Blot

FIC = Feline idiopathische Zystitis, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, k.A. = keine Angabe

|               | <b>FIC</b>    | <b>Gesund</b> |
|---------------|---------------|---------------|
|               | 183368        | 5472          |
|               | 20265         | 6467          |
|               | 106530        | 4867          |
|               | 37347         | 55999         |
|               | 197268        | 28208         |
|               | 304260        | 24063         |
|               | 48771         | 5648          |
|               | 6358          | 6186          |
|               | 121778        | 90992         |
|               | 61162         | 45618         |
|               | 107919        | 8109          |
|               | 12873         | 4597          |
|               | k.A.          | 29657         |
|               | k.A.          | 56585         |
|               | k.A.          | 24408         |
|               | k.A.          | 23281         |
| <b>MW</b>     | <b>100658</b> | <b>26260</b>  |
| <b>SD</b>     | <b>86354</b>  | <b>24122</b>  |
| <b>Median</b> | <b>83846</b>  | <b>23672</b>  |

Tab. 7: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten des Nuclear factor-kappa B p65 im Western Blot

FIC = Feline idiopathische Zystitis, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, k.A. = keine Angabe

|               | <b>FIC</b>    | <b>Gesund</b> |
|---------------|---------------|---------------|
|               | 91104         | 36977         |
|               | 97567         | 2658          |
|               | 64627         | 1999          |
|               | 92984         | 32918         |
|               | 191610        | 88007         |
|               | 67143         | 10997         |
|               | 91252         | 7107          |
|               | 119658        | 33986         |
|               | k.A.          | 12275         |
|               | k.A.          | 2498          |
| <b>MW</b>     | <b>101993</b> | <b>22942</b>  |
| <b>SD</b>     | <b>37564</b>  | <b>25352</b>  |
| <b>Median</b> | <b>92118</b>  | <b>11636</b>  |

Tab. 8: Originalwerte der Quantifizierung der Signalintensitäten der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase im Western Blot

FIC = Feline idiopathische Zystitis, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, k.A. = keine Angabe

|               | <b>FIC</b>   | <b>Gesund</b> |
|---------------|--------------|---------------|
|               | 10716        | 1588          |
|               | 36715        | 2610          |
|               | 8228         | 1379          |
|               | 0            | 747           |
|               | 294          | 700           |
|               | 13003        | 892           |
|               | 9624         | 8138          |
|               | 13175        | 1317          |
|               | 4117         | 2717          |
|               | 50677        | 248           |
|               | 636          | 266           |
|               | 2218         | 2510          |
|               | k.A.         | 329           |
|               | k.A.         | 1895          |
|               | k.A.         | 1143          |
| <b>MW</b>     | <b>12450</b> | <b>1765</b>   |
| <b>SD</b>     | <b>14989</b> | <b>1882</b>   |
| <b>Median</b> | <b>8926</b>  | <b>1317</b>   |

## IX. DANKSAGUNG

Bei Frau **Prof. Dr. Katrin Hartmann** möchte ich mich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die damit verbundene Möglichkeit, an ihrem Lehrstuhl meine Doktorarbeit anfertigen zu können, danken. Außerdem möchte ich mich für ihren fachlichen Rat und die Bereitstellung des notwendigen Arbeitsmaterials für meine Doktorarbeit bedanken.

Frau **Dr. Roswitha Dorsch** möchte ich ganz besonders für die herzliche Aufnahme ins FLUTD-Team, die Überlassung dieses tollen Wunsch-Themas und die tolle Betreuung meiner spannenden Arbeit bedanken. Sie hat maßgeblich zu meiner fachlichen und wissenschaftlichen Entwicklung beigetragen und mir immer, auch in frustrierenden Phasen meiner Arbeit, zur Seite gestanden.

Frau **PD Dr. Cornelia A. Deeg** bin ich unglaublich dankbar, für die exzellente fachliche Betreuung meiner Arbeit. Sie hat mir mit ihrem persönlichen Engagement, trotz eines vollen Terminkalenders, zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich immer wieder aufs Neue motiviert. Ihr verdanke ich eine tolle Publikation und all das Wissen auf dem Gebiet der Proteomik und die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Frau **Dr. Stefanie Hauck und ihrem Team** aus dem Helmholtz Zentrum München für das Ermöglichen der dort durchgeführten massenspektrometrischen Analysen und die Unterstützung beim Verfassen der Publikation.

Dem **internistischen Team der Medizinischen Kleintierklinik** möchte ich ganz besonders danken für die freundliche Hilfe in allen Lebenslagen und die große Lehrbereitschaft, die mir eine tolle tierärztliche Ausbildung ermöglicht hat. Vielen Dank für die schöne Zeit, das tolle Arbeitsklima, die neuen Erfahrungen und die neuen Freundschaften.

Ein ganz großer Dank geht an die **Mitarbeiter der AG Deeg**, die mir tolle Stunden im Labor bereitet haben, mich vorbehaltlos in ihr Team aufgenommen haben und mich tatkräftig und mit ihrem Wissen bei den Experimenten unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank geht an Frau **Maggie Swadzba**, die mir die Tage in

der Physio durch ihre lustige und unterhaltsame Art zu einem unvergesslichen Erlebnis gemacht hat und damit unter anderem zu meiner Freude am wissenschaftlichen Arbeiten beigetragen hat. Sie hat wie kein Anderer meine Probleme verstanden und mir durch ihre Ratschläge und aufbauenden Worte sehr geholfen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau **Bärbl Amann** für ihr unendliches Laborwissen, die jahrzehntelange Erfahrung und die immer wieder erheiternde und hilfsbereite Art, mit der sie maßgeblich am Gelingen der Arbeit beteiligt war. Insbesondere für die wunderschönen und für die Publikation so wichtigen immunhistochemischen Aufnahmen bin ich ihr sehr dankbar.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch Frau **Dr. Hanna Zipplies**, Herrn **Konstantin Lutz** und Frau **Sieglinde Hirmer** für die Einführung und Hilfe bei den Experimenten und die geduldige Beantwortung aller Fragen.

Ich möchte mich bei meinen zahlreichen **Schwestern und Brüdern** bedanken. Es ist toll zu wissen, dass ihr immer hinter einem steht und es ist jedes Mal aufs Neue eine große Freude, euch wiederzusehen. Ich möchte mich außerdem ganz besonders bei meiner Schwester **Bärbel** bedanken für die tolle Zeit in München, das endlose und nicht einfache Korrekturlesen meiner Publikation und die Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen, ohne die diese Arbeit und insbesondere die Publikation nicht so gelungen wäre.

Unendlich dankbar bin ich meinen geliebten **Eltern**, die mich immer unterstützt haben und mir mit all ihren Möglichkeiten den Weg bereitet haben, meinem Studium und dieser Doktorarbeit nachzugehen. Ich danke euch für all diese bedingungslose Liebe, die Kraft, den Mut und die Zuversicht, die ihr mir auf den Weg mitgegeben habt.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Freund **Schosch** bedanken, der mich immer unterstützt und immer für mich da ist. Seiner unendlichen Liebe, seiner Zuversicht und seinem Vertrauen in mich verdanke ich das Gelingen der Arbeit. Er hat mir während der anstrengenden Zeit im Studium und in München immer Beistand geleistet und mich immer wieder motiviert. Und dabei hat er mich stets gelehrt nie den Blick auf das Wesentliche im Leben zu verlieren.