

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein sezerniertes Polypeptid mit einer spezifischen Wirkung auf Endothelzellwachstum, Endothelzellfenestrierung und der Regulation der Gefäßpermeabilität. VEGF ist während der Entwicklung wachsender Säugetiere und in der Tumorgenese der wichtigste Faktor zur Induktion der Angiogenese. Er bindet an zwei Endothelzell-Thyrosin-Kinase-Rezeptoren, VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1/ Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1). Es ist bisher wenig über die Angiogenese im männlichen Geschlechtstrakt bekannt. Die Rolle von VEGF bei der Kontrolle der reproduktiven Physiologie in postnatalen, "normalen" adulten und seneszenten Geweben ist noch nicht erforscht. Zur Erhaltung der Hodenfunktion ist eine funktionierende Blutversorgung unabdingbar. Einige Studien konnten nachweisen, daß eine Behandlung, die die Durchblutung des Hodens verändert, deutliche Konsequenzen für die Testosteronproduktion und für den Serumtestosteronspiegel nach sich zieht. Es wird angenommen, daß diese Konsequenzen aus einem verminderten Transport an LH, Nährstoffen und anderen Chemikalien, die essentiell für die Leydigzellen sind, entstehen. Ein komplexer Mechanismus zur Kontrolle der Mikrozirkulation, Permeabilität und somit der gesamten Flüssigkeitsbewegung im Hoden bzw. in den Leydigzellen kann als zentraler Regulator der Hodenfunktion angenommen werden. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit zu analysieren, ob die Expression des VEGF-Systems entwicklungs- oder alterungsabhängig in den Hoden von Wistar-Ratten reguliert wird. Zusätzlich wurden auch andere Gewebe, die nicht in direktem Zusammenhang mit dem Reproduktionstrakt stehen untersucht, um den Effekt, wenn einer festgestellt werden kann, im männlichen Reproduktionstrakt mit gleich alten anderen Geweben vergleichen zu können.

Die Expression der Transkripte, die für die VEGF-Isoformen und deren Rezeptoren im Hoden während der postnatalen Entwicklung bei adulten und seneszenten Wistar-Ratten kodieren, wurden durch RT-PCR analysiert.

Die Menge amplifizierter cDNA-Fragmente wurde durch Fluoreszenzphotometrie gemessen und auf die gemessenen Mengen des amplifizierten "housekeeping"-Gens GAPDH normalisiert.

Die mRNA-Expression von VEGF und dessen Rezeptoren wurde während der postnatalen Entwicklung, bei adulten und seneszenten Wistar-Ratten im Hoden und zur Kontrolle in Lungengewebe detektiert. Keine Veränderung der Expression der VEGF Isoformen des Hodengewebes konnte vor oder nach der Pubertät, bei adulten oder seneszenten Ratten detektiert werden. Die Genexpression des VEGF -Rezeptors Flt-1 steigt postnatal auf ein Maximum, das am 40sten Tag post natum erreicht wird an und bleibt für den Rest des Lebens auf diesem Niveau stehen. Der Rezeptor Flk-1, der für die Signaltransduktion des mitogenen Effekts von VEGF verantwortlich gemacht wird, fällt stetig bis zum Ende des Lebens. Eine Ausnahme stellt hier der 40`ste Tag post natum dar, an welchem die Expression um 30% höher als am 20`sten Tag post natum ausfällt. In dieser Zeit befindet sich die männliche Ratte in der Pubertät, in der das Hodenparenchym starken morphologischen und funktionellen Veränderungen unterworfen ist.

In nicht-reproduktiven Organen wie der Lunge treten im Gegensatz zu dem, was im Hoden festgestellt werden konnte, isoformspezifische Unterschiede in der VEGF-Expression der verschiedenen Altersstufen auf. Die Expression von VEGF188 liegt bei Ratten bis zum Alter von 20 Tagen etwa 40% unterhalb des Niveaus älterer Tiere. VEGF164 verändert sich nicht signifikant in seiner mRNA Expression im Laufe der getesteten Entwicklungsstadien. Die mRNA-Expression von VEGF120 fällt nach Tag 10 post natum um etwa 20% und bleibt dann auf diesem niedrigen Niveau bestehen. Es gibt keine signifikanten Veränderungen der Expression der Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 im Laufe des Lebens einer Wistar-Ratte von Tag 1 nach der Geburt bis zum 24 Monate alten Tier.

Die aufgeführten Daten zeigen, daß es im Hoden eine altersabhängige Expression der VEGF-Rezeptoren ohne Veränderung der Liganden gibt, während sich in der Lunge die Liganden-Expression und nicht die Expression der Rezeptoren mit den unterschiedlichen Altersstufen verändert. Somit wird die Aktivität von VEGF in den zwei unterschiedlichen Geweben auf anderen Ebenen reguliert. Ob dabei der physiologische Effekt gleich ist oder nicht kann bisher nicht gesagt werden.

Weiterhin sollte in dieser Arbeit gezeigt werden, ob VEGF und seine Rezeptoren in verschiedenen Geweben altersabhängig exprimiert wird. Im Herzen und in der Leber wird ein gleiches Verteilungsmuster der VEGF Isoformen aufgezeigt. VEGF188 wird am stärksten (60%), gefolgt von VEGF164 (30%) und VEGF120 (10%), exprimiert. Im Vergleich zu anderen Organen zeigen diese beiden eine sehr hohe Stoffwechselleistung. VEGF188 scheint ein wichtiger Faktor zur Regulation des Stoffwechsels zu sein und somit den Stoffaustausch zwischen intra-und extraluminalen Bereich der Organe zu bestimmen.

Interessanterweise ist die Expression von VEGF und die von dessen Rezeptoren im Herzen alter im Vergleich zu jungen Ratten erniedrigt. Es ist bisher nicht bekannt, ob dies zu einer verminderten Perfusion des Herzens alter Ratten führt.

Nebenniere und Prostata zeigen in der Expression von Flk-1 alter Tiere eine Reduktion von etwa 30%, während Flt-1 unverändert bleibt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß sich die Expression der verschiedenen Isoformen von VEGF sowie von dessen Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 häufig altersabhängig verändert. Die Veränderungen finden auf verschiedenen Ebenen statt. Zum einen verändert sich gewebespezifisch die Expressionsstärke der Isoformen des Liganden, zum anderen die der Rezeptoren. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß Flt-1 zusammen mit VEGF188 in den Geweben unterschiedlicher Altersstufen dafür verantwortlich zu sein scheint, daß die Permeabilität der Blutgefäße und somit ein optimaler Blutaustausch erhalten bleibt. In Geweben alter Tiere, in denen die Flk-1 Expression erniedrigt ist, ist auch die durch Flk-1 vermittelte mitogene Antwort der Endothelzellen auf den Liganden (VEGF120, VEGF164) vermindert. Das ist eine mögliche Erklärung dafür, daß die Wundheilung und der schützende Mechanismus gegen Neoangiogenese in der Tumorentwicklung alter Tiere gestört ist.

Als Alterungsmarker kann VEGF auf Grund der sensiblen Einstellung auf äußere Einflüsse nicht benutzt werden.

7 Summary

Age-dependend expression of VEGF in the testis and other tissues of the rat

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a secreted polypeptide with specific effects on endothelial cell growth, induction of endothelial fenestration and on the regulation of vascular permeability. VEGF is a major inducer of angiogenesis during development and tumourogenesis. It binds to two endothelial tyrosine kinase receptors, VEGF receptor-1 (VEGFR-1 / Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1). Little is known about angiogenesis in the male reproductive tract. The role of VEGF in controlling reproductive tract physiology in postnatal, "normal" adult and senescent tissues is not well understood. For the maintenance of testicular function blood supply is essential. Numerous studies have established that treatments that alter testicular blood flow have serious consequences for testosterone production and serum testosterone levels. These consequences are presumed to be due to restriction of the transport of LH, nutrients and other chemical agents essential for Leydig cell function. Thus a complex mechanism for controlling the microcirculation, permeability and fluid dynamics within the testis and the Leydig cells can be considered central to the regulation of testicular function. Therefore, the aim of this study was to analyse whether the expression of the VEGF system could be developmentally or ageing- dependently regulated in the testes of Wistar rats. In addition we have also used other tissues unrelated to reproduction, like to compare the effects, if any, seen in the male reproductive tissues with another tissue of rats at identical age. The expression of transcripts coding VEGF isoforms and its receptors in testes during postnatal development, adult and in the senescence of Wistar rats was analysed by RT-PCR. The intensity of amplified cDNA fragments stained with a fluorescent dye was measured and normalized to amounts of amplified transcripts coding housekeeping gene GAPDH. VEGF and VEGF receptors mRNA were detected throughout the postnatal development and senescence in testes and in a control tissue such as the lung, which is unrelated to the reproductive system. No change in the expression of any of the isoforms of VEGF in the testes of either pre-pubertal, pubertal, adult or senescent rats was detected. However, the level of VEGF receptor Flt-1 gene expression increases postnatally till a maximum is reached at postnatal day 40 and remains at about this level for the rest of the life. Flk-1-receptor, which is responsible for the signal transduction with mitogenic effects, continuously decreases postnatally throughout the life. An exception is day 40 postnatal, where about 30% higher levels of its expression in comparison to day 20 after birth is observed. This is the time of puberty of the Wistar rat with a high rate of remodeling of the parenchyma and changes in the testicular function.

In non reproductive tissues, such as lung, the expression of VEGF is altered in an isoform specific manner at different ages in contrast to what was observed in testes. The expression of VEGF188 remains about 40% lower in the first 20 days of life in comparison to older rats. However, the expression of VEGF164 does not alter significantly. VEGF120 expression remain high immediately after birth up to day 10 postnatal, but then drops about 20% afterwards and remains at this low level till 24 months of age. There are no significant changes in the expression of the receptors Flt-1 and Flk-1 in lung tissue from birth to 24 months of age.

The data obtained show that in testes there was an age-dependent alteration in the expression of VEGF receptors without a change in the expression of the ligand, whereas in the lungs an age-related change in the ligand expression was recorded in the absence of a change in the receptor expression. It shows, in these two different tissues the regulation of the action of

VEGF is exerted at two different levels. Whether physiologically the final effects are the same or not can not be confirmed yet.

Furthermore, this study was extended to other tissues as well to examine the extent of age-related variation in the expression of VEGF and its receptors. Both in heart and liver, a similar distribution of the VEGF-isoforms was observed. VEGF₁₈₈ expression level was the highest (60% of the total) followed by VEGF₁₆₄ (30%) and VEGF₁₂₀ (10%). These organs show a very high level of metabolism in comparison to others. VEGF₁₈₈ seems to be an important factor for metabolism and has function in the regulation of the exchange of substances between the luminal and the extra-luminal compartments of the organs.

Interestingly, the levels of expression of both VEGF and its receptors are depressed in the heart of older rats in comparison to young ones and it is not known if this may result in a poor perfusion of heart in old rats.

In the adrenals and in the prostate, a reduction to the extent of 30% in the expression of Flk-1 is observed in old rats, while Flt-1 remains unchanged.

Taken together, it appears that age-dependent changes in the expression of VEGF and its receptors are quite wide spread in different tissues. However, the alterations are effected at different levels. This is observed in some tissues at the level of specific isoforms of the ligand or at the level of specific types of VEGF-receptors in others. In those tissues, where Flt-1 remains unchanged at different ages, it may indicate that the permeability of vessels allowing the exchange of substances optimally can be continued. In aged tissues where Flk-1 expression is depressed, there is a loss of mitogenic response of endothelial cells mediated by Flk-1. This is possibly an explanation for a depressed wound repair in old animals or a protective mechanism against neo-angiogenesis associated with tumour development.

A loss of the VEGF response seems to be age dependent. But the VEGF mRNA-expression can't be used as a marker for aging tissues because it is regulated in the protein as well as in the receptor expression.