

Regulation of endothelial progenitor cell growth by estradiol role of estrogen receptors and intracellular mechanisms

Doctoral Thesis

Author(s):

Baruscotti, Isabella

Publication date:

2009

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005981863>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS ETH NO. 18713

**Regulation of Endothelial Progenitor Cell Growth by Estradiol:
Role of Estrogen Receptors and Intracellular Mechanisms**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

For the degree of
Doctor of Sciences ETH Zurich

Presented by

ISABELLA BARUSCOTTI

Dipl. Sc. Nat. ETH

Born July 14, 1981

Citizen of Monte Carasso (TI)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Sabine Werner, examiner

Prof. Dr. Hans Hengartner, co-examiner

Prof. Dr. Raghvendra K. Dubey, co-examiner

2009

SUMMARY

Cardiovascular disease is the leading cause for mortality in both men and women in the world. Atherosclerosis is a chronic vaso-occlusive inflammatory disease which is, in part, due to accumulation of cholesterol and macrophage within the vessel wall (atherosclerotic plaque), as well as overproliferation of arterial smooth muscle cells (neointima). The pathophysiological consequences of these insults result in occlusion of the blood vessels and the eventual rupture of the plaque and infarction due to the thrombus formed. Endothelial dysfunction and damage is a major primary step in the initiation of atherosclerosis. Indeed if endothelial cells are old and injured, in presence of one or more risk factors, the damages to the endothelium cannot be repaired and this would initiate an inflammatory process leading to vaso-occlusion and vascular remodeling. Epidemiological studies provide evidence that estradiol protects against cardiovascular disease, though the exact mechanisms remain unclear. Among the beneficial effects of estradiol on the cardiovascular system, it is known to induce mitogenic effects on endothelial cells, which help maintaining the health of the endothelium. Moreover, in the last decade, a new cell type, the so called endothelial progenitor cells (EPCs), has been discovered, which is able to initiate as well as participate in processes like angiogenesis and neovasculogenesis. EPCs are bone marrow-derived cells that will finally differentiate into endothelial cells. Based on these observations, we hypothesized that, besides acting as a mitogen on endothelial cells, estradiol may induce its protective effects on the cardiovascular system by promoting growth of EPCs. In support of this hypothesis we provide evidence that estradiol activates mobilization of EPCs from the bone marrow, and stimulates their proliferation, adhesion, capillary formation as well as the nitric oxide production. The biological effects of estradiol are mainly mediated by estrogen receptors (ER) α and β . In the present study we demonstrated that the growth stimulatory effects of estradiol on EPCs are ER α mediated. We also investigated the intracellular mechanisms that may be involved in mediating the mitogenic effects of estradiol on EPCs. We demonstrated that in EPCs estradiol activates the key mitogenic signal transduction pathways MAPK (ERK 1/2) and Akt, upregulates the expression of cell cycle regulatory proteins, i.e. cyclins D1, A, E and B, promotes hyperphosphorylation of retinoblastoma protein, and downregulates the expression of p21, a cell cycle protein, which negatively regulates growth. Additionally, we also demonstrate that estradiol promotes microvessel formation via activation of Akt signal pathway and by increasing the expression of the heme oxygenase-1 protein. Moreover, since in the human body estradiol is ubiquitously metabolized to 2-hydroxy- and 2-metohyxestradiol, we also investigated the effects of this metabolism on EPC growth and functions. An alternative mechanism via which estradiol mediates its protective effects on the cardiovascular system, is by inhibiting the growth of smooth muscle cells and neointima formation, processes which contribute to vascular remodeling and vaso-occlusion. In conclusion, here we demonstrate that, in contrast to EPCs, estradiol inhibits mobilization and growth of bone marrow-derived smooth muscle progenitor cells via ER α . Moreover, it inhibits Akt pathway, downregulates cyclin expression and retinoblastoma hyperphosphorylation and upregulates the expression of p21, thus further promoting cardiovascular health.

These findings provide evidence that estradiol may induce its anti vaso-occlusive and vasoprotective actions by promoting EPC growth and inhibiting SM-like progenitor cells. Finally, the findings provide potential support for the hypothesis of progenitor cell-based therapy for cardiovascular disease treatment and prevention.

RIASSUNTO

Le malattie cardiovascolari sono tra le principali cause di morte di uomini e donne nel mondo. L'arteriosclerosi è una malattia infiammatoria cronica in parte dovuta ad un accumulo di colesterolo e macrofagi nelle pareti vascolari (placca aterosclerotica) e ad una proliferazione eccessiva delle cellule muscolari lisce che compongono le arterie (neointima). Questi fenomeni portano alla restrizione del lume vasale e, in caso di rottura della placca, il trombo che ne deriva provoca un infarto. Tra gli eventi che promuovono l'insorgere e lo sviluppo dell'arteriosclerosi vi sono la disfunzione e il danneggiamento dell'endotelio. Infatti, se le cellule endoteliali non riescono più a riparare i danni a causa dell'età o della presenza di uno o più fattori di rischio, inizia un processo infiammatorio. Studi epidemiologici evidenziano che l'estradiolo protegge dalle malattie cardiovascolari, sebbene i meccanismi esatti non siano stati ancora chiariti del tutto. Alcuni degli effetti benefici dell'estradiolo sul sistema cardiovascolare si possono ricondurre alla promozione della proliferazione delle cellule endoteliali, le quali sono responsabili della buona condizione dell'endotelio. Inoltre, nell'ultimo decennio, è stato scoperto un nuovo tipo di cellule, chiamate cellule endoteliali progenitrici (EPC), in grado di iniziare e partecipare a processi di angiogenesi e vascolarizzazione. Le EPC derivano dal midollo spinale e maturano differenziandosi in cellule endoteliali. Per questo motivo abbiamo ipotizzato che un meccanismo coinvolto nella protezione del sistema cardiovascolare da parte dell'estradiolo, oltre all'azione mito genica sulle cellule endoteliali, sia dovuto alla promozione della crescita delle EPC. A supporto di questa ipotesi abbiamo fornito le prove che l'estradiolo promuove la mobilitazione delle EPC dal midollo osseo, la loro proliferazione, adesione, la capacità di formare capillari e di aumentare la produzione da parte delle cellule di monossido d'azoto. Gli effetti biologici dell'estradiolo sono mediati per la maggior parte dai recettori dell'estrogeno (ER) α e β . Con questo studio abbiamo dimostrato che gli effetti mitogeni dell'estradiolo nelle EPC sono mediati in particolare dall'ER α . Inoltre, abbiamo studiato i meccanismi intracellulari che potrebbero essere coinvolti nella promozione della crescita delle EPC da parte dell'estradiolo. A riguardo, abbiamo dimostrato che, nelle EPC, l'estradiolo attiva le vie di trasmissione del segnale cellulare MAPK (ERK 1/2) e Akt, aumenta l'espressione delle cicline che controllano il ciclo cellulare (ciclina D1, A, E e B), promuove l'iper-fosforilazione della proteina del retino blastoma e diminuisce l'espressione della proteina p21, inibitrice del ciclo cellulare. Sempre a livello molecolare abbiamo dimostrato che l'estradiolo promuove la formazione di micro capillari attraverso la via di trasmissione del segnale Akt aumentando l'espressione della proteina emossigenasi-1. Inoltre, poiché l'estradiolo è metabolizzato ovunque nel corpo umano in 2-idrossi e 2-metossiestradilo, abbiamo anche indagato gli effetti di questi metaboliti sulla crescita e sulle funzioni delle EPC. Un ulteriore meccanismo attraverso il quale l'estradiolo protegge il sistema cardiovascolare è l'inibizione della crescita delle cellule muscolari lisce, e quindi di neointima, impedendo così la vaso-occlusione. Col nostro lavoro abbiamo potuto dimostrare che l'estradiolo, al contrario di quanto accade per le EPC inibisce, attraverso l'ER α , la mobilitazione e la crescita di cellule muscolari lisce progenitrici derivate dal midollo osseo. Infatti, inibisce la via di trasmissione del segnale cellulare dell'Akt, l'iper-fosforilazione della proteina del retino blastoma, diminuisce l'espressione delle cicline e aumenta l'espressione della proteina p21, promuovendo così ulteriormente la salute del sistema cardiovascolare.

Questi risultati dimostrano che l'estradiolo può indurre i suoi effetti anti-occlusivi e vaso protettivi promovendo la crescita delle EPC e inibendo le cellule progenitrici muscolari. In conclusione, questi risultati possono offrire supporto all'ipotesi di una terapia basata sulle cellule progenitrici per la cura e la prevenzione delle malattie cardiovascolari.