

DISS. ETH NO. 22286

**DEFINING THE ROLE OF ANDROGENS IN VASCULAR REMODELING
ASSOCIATED WITH CARDIOVASCULAR DISEASE**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

YULIYA PLUTINO

Master of Science UZH

born on 14.12.1985

citizen of
Belarus

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Sabine Werner, examiner
Prof. Dr. Wilhelm Krek, co-examiner
Prof. Dr. Christian Grimm, co-examiner
Prof. Dr. Raghendra K. Dubey, co-examiner

2014

Summary

Growing evidence suggests a central role of androgens in cardiovascular health of men. In spite of numerous studies conducted to decipher the precise roles of testosterone (T) in cardiovascular disease (CVD), no agreement has been achieved regarding the protective or deleterious effects of T on the cardiovascular system (CVS). Therefore, it is essential to clarify how T affects the CVS in order to identify the potential risks and benefits of testosterone replacement therapy (TRT), increasingly used by elderly men.

We hypothesize that androgens modulate vascular remodeling processes associated with CVD. Because endothelial dysfunction and abnormal smooth muscle cell growth are the main determinants of vascular remodeling processes, we investigated the effects of androgens on these processes. Proper EC function is required for tissue repair and wound healing by building a network of new blood vessels. Interestingly, besides residual ECs, circulating endothelial progenitor cells (EPCs), derived from bone marrow and spleen, have been found to actively participate in vascular repair. Therefore, our main focus was to study the effects of androgens on the function of EPCs. To address this question, we utilized dehydrotestosterone (DHT), a T metabolite, which mimics the effects of T and is not converted to estradiol. Hence, the use of DHT ascertains that the observed effects are solely androgenic and not compromised by conversion to estradiol.

In the present study, we demonstrated that DHT induces capillary formation by EPCs using three *in vitro* angiogenesis assays (two-dimensional matrigel-based assay, co-culture of EPCs on the confluent monolayer of human cardiac fibroblasts (HCF) and bead sprouting assay). Moreover, we demonstrated that the actions of DHT in EPCs were mediated via androgen receptor (AR). Indeed, the stimulatory effects of DHT were abrogated by the AR antagonist flutamide and by AR siRNA. Furthermore, our results provide the evidence that DHT promotes vasculogenesis in EPCs by activating the Akt/mTOR/VEGF pathway. In this regard, the PI3K/Akt inhibitor LY294002, the mTOR inhibitor rapamycin and VEGF neutralizing antibodies abolished the effects of DHT on EPC function. Interestingly, we report that the angiogenic effects of DHT on EPCs are mediated by a cross-talk between AR signaling and the Akt pathway. In this context, inhibition of both signaling pathways reduced vasculogenesis in EPCs. Moreover, AR blockade prevented DHT-induced phosphorylation of Akt and abolished the activation of the Akt/mTOR/VEGF signaling.

Another key finding of this research suggests a protective role of DHT on endothelial cell function. We found that DHT activates TGF β signaling implicated in the regulation of

endothelial function and vascular physiology. DHT induced the phosphorylation of the transcription factors Smad1/5/8 via ALK1 but not ALK5, resulting in the up-regulation of the downstream target Id-1 and also Endoglin. Additionally, the BMP inhibitor Noggin prevented DHT-stimulated Smad1/5/8 phosphorylation, indicating a role of BMP2 and BMP4 in mediating the effects of DHT on the ALK1/Smad1/5/8 signaling. Furthermore, we demonstrated that DHT triggered an increase in intracellular calcium which leads to the activation of Smad1/5/8 signaling. In this regard, DHT stimulated a rapid flux of calcium, measured by loading EPCs with the calcium sensitive agent fluo4. Furthermore, inhibition of calcium signaling with the G protein coupled receptor inhibitor pertussis toxin, the phospholipase C inhibitor U73122 and the calcium chelator BAPTA-AM abrogated Smad1/5/8 phosphorylation by DHT. Surprisingly, our findings suggest that the ALK1/Smad1/5/8 signaling has no effect on vasculogenesis in EPCs, since Smad1 siRNA did not affect DHT-induced capillary formation. More importantly, our results provide evidence that the ALK1/Smad1/5/8 pathway is responsible for DHT-stimulated barrier function in EPCs, which is confirmed by the up-regulation of the tight junction protein occludin. Moreover, DHT abrogated thrombin-induced barrier disruption.

Since the biological actions of androgens are mediated by AR, we investigated how DHT regulates AR expression in EPCs. Here, we demonstrated that DHT increased AR expression in EPCs by promoting its stability upon ligand binding and by modulating its translation, but not transcription. We speculate that these findings might be of importance for developing therapeutic approaches targeting AR signaling. For example, priming EPCs with DHT may enhance its therapeutic potential in men receiving stem cell therapy following MI or cardiovascular events.

To fully examine the action of DHT on vascular remodeling, we also studied its effects on proliferation of aortic smooth muscle cells, which contribute to intima-media formation and vaso-occlusion. In this regard, we found that DHT induced the proliferation of AoSMCs and up-regulated the expression of CyclinA and CyclinD1 and down-regulated the cell cycle inhibitors p21 and p27. Surprisingly, these results suggest a deleterious role of androgens in vascular remodeling processes. However, it is possible that the mitogenic actions only occur in the absence of ECs.

Taken together, our findings support a protective role of DHT on EPC function by stimulating vasculogenesis, a key process in tissue regeneration, and by promoting barrier function, essential for preserving vascular integrity in CVD. However, the mitogenic effect of DHT on AoSMCs indicates a potential risk of androgen application for the cardiovascular system.

Based on these findings, we hypothesize that androgens would induce their protective actions by improving endothelial function and repair. However, under pathological conditions with severe vascular damage or remodeling associated with CVD, androgens may promote the deleterious effects by stimulating SMC growth and vaso-occlusion. The exact mechanisms and factors, which determine the outcome of androgen treatment and regulate the balance between the beneficial and deleterious effects of androgens have to be further investigated.

Zusammenfassung

Wachsende Hinweise deuten auf eine zentrale Rolle von Androgenen im männlichen Herz-Kreislauf System hin. Trotz zahlreicher Studien, die durchgeführt wurden um die genaue Rolle von Testosteron (T) bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen (HKE) zu entdecken, ist diese noch unklar. Daher ist es wichtig herauszufinden, wie T auf HKS wirkt, um mögliche Risiken und Nutzen der Testosteron-Ersatz-Therapie (TET) zu identifizieren.

Wir vermuten, dass Androgene zu Prozessen der Gefäßveränderung, verbunden mit HKS, führen. Da die Hauptdeterminanten der Gefäßveränderungsprozesse endotheliale Dysfunktion und abnormes Wachstum der glatten Muskelzellen sind, untersuchten wir die Wirkungen von Androgenen auf diese Prozesse. Die Funktion der endothelialen Zellen (EZ) ist für die Gewebereparatur und Wundheilung durch den Bau von neuen Blutgefäßen erforderlich. Es wurde festgestellt, dass neben Gewebe EZ, auch zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (EVZ), die aus Knochenmark und Milz stammen, aktiv an der vaskulären Reparatur beteiligt sind. Deswegen unser Fokus war, die Wirkungen von Androgenen auf die Funktion der EVZ zu untersuchen. In unserer Arbeit benutzten wir Dehydrotestosteron (DHT), ein T-Metabolit, der die Auswirkungen von T nachahmt und im Gegensatz zum endogen produzierten T nicht zu Östradiol umgewandelt wird.

Durch die Verwendung von drei *in vitro*-Angiogenese Methoden – zweidimensionaler Matrigel-basierender Assay, Co-Kultur von EPCs auf einem konfluenten Monolayer von menschlichen kardialen Fibroblasten und Beads Sprouting Assay – zeigte sich, dass DHT die Kapillarbildung in EVZ induzierte. Zusätzlich konnten wir nachweisen, dass die Wirkungen von DHT durch Androgen-Rezeptor (AR) vermittelt wurden, da die stimulierende Wirkung von DHT durch AR-Antagonist Flutamid und AR siRNA vermindert wurde. Außerdem zeigten wir, dass DHT die Vaskulogenese in EVZ durch die Aktivierung des Akt/mTOR/VEGF-Signalwegs fördert. In der Tat, bei der Verwendung von PI3K/Akt Inhibitor LY294002, mTOR Inhibitor Rapamycin und VEGF neutralisierenden Antikörpern wurden die positiven Effekte von DHT auf die Kapillarbildung gehemmt. Weiter zeigte sich, dass DHT die Phosphorylierung von Akt und mTOR spezifisch induziert. Unsere Resultate deuten also darauf hin, dass die Effekte von DHT auf EVZ durch einen cross-talk zwischen AR-Signalisierung und Akt-Weg vermittelt werden, da die Hemmung der beiden Signalwege die Vaskulogenese von EVZ reduziert. Die Blockierung von AR verhinderte außerdem die DHT-abhängige Phosphorylierung von Akt und führte zur Hemmung von Akt/mTOR/VEGF-Signalisierung.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Forschung unterstützt eine schützende Rolle von DHT auf die Endothelfunktion. DHT aktivierte die TGF-Signalisierung, die an der Regulation der endothelialen Funktion und an Gefäßstörungen beteiligt ist. Zudem wurde gezeigt, dass DHT die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren Smad1/5/8 durch ALK1, aber nicht durch ALK5, induzierte und so zur Erhöhung von Id-1 und Endoglin führte. Zusätzlich hemmte der BMP Inhibitor Noggin die DHT-stimulierte Phosphorylierung von Smad1/5/8. Dies lässt auf eine Rolle von BMP-2 und BMP-4 bei der Vermittlung der Effekte von DHT auf ALK1/Smad1/5/8 Signalisierung schließen. Weiterhin zeigten wir, dass DHT einen intrazellulären Calciumanstieg, gemessen über calciumsensitives Fluo4, auslöste. Das führte zur Aktivierung der Smad1/5/8 Signalisierung, welche durch G-Protein Inhibitor Pertussis Toxin, Phospholipase Inhibitor U73122 und Calcium Chelator Bapta-AM gehemmt wird. Außerdem zeigte sich, dass ALK1/Smad1/5/8 Signalisierung keinen Einfluss auf die Vaskulogenese in EVZs hat, da Smad1 siRNA DHT-stimulierte Kapillarbildung nicht beeinflusste. Schließlich belegen unsere Ergebnisse, dass der ALK1/Smad1/5/8 Signalweg für die DHT-stimulierte Barrierefunktion in EVZ verantwortlich ist, indem er reguliert das Tight Junction Proteins Occludin, welches ein Schlüsselregulator der endothelialen Integrität ist.

Da die biologischen Wirkungen von Androgenen durch AR vermittelt werden, untersuchten wir, wie DHT AR-Expression in EVZ reguliert. Hier zeigten wir, dass DHT die AR-Expression in EVZ durch Stabilisierung des AR-Proteins bei Ligandenbindung und durch Modulieren von Translation erhöht, ohne jedoch die Transkription von AR zu beeinflussen. Diese Ergebnisse könnten von Bedeutung für die Entwicklung von therapeutischen Ansätzen sein, die die AR-Signalisierung als Ziel haben.

Um ein vollständigeres Bild der Wirkungen von DHT auf die vaskulären Veränderungen zu erhalten, untersuchten wir auch die Auswirkungen von DHT auf das Wachstum von glatten Muskelzellen. Diese sind für die Neointima-Bildung und die Vaso-Okklusion verantwortlich. Unsere Resultate deuten darauf hin, dass DHT die Proliferation der glatten Muskelzellen der Aorta induziert und die Expression von Cyclin A und Cyclin D1 erhöht und die der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 vermindert. Diese Ergebnisse sprechen für eine schädliche Rolle von Androgenen bei Gefäßveränderungsprozessen.

Zusammenfassend weisen unsere Resultate auf eine schützende Rolle von DHT auf EVZ-Funktion hin: die Behandlung mit DHT führt zur Stimulierung der Vaskulogenese, einem Schlüsselprozess bei der Gewebe-Regeneration, und zur Förderung der Barrierefunktion, die eine zentrale Rolle in der endothelialen Integrität spielt. Der proliferative Effekt von DHT auf glatte Muskelzellen deutet jedoch auf ein potenzielles Risiko der Anwendung von

Androgenen für das Herz-Kreislauf-System hin. Auf Basis dieser Erkenntnisse vermuten wir, dass Androgene ihre schützende Wirkungen durch eine Verbesserung der Endothelfunktion und Reparatur induzieren würden, aber unter pathologischen Bedingungen mit schwerer Gefäßschädigung oder vaskulärer Veränderung verbundener HKE, könnten sie nachteilige Wirkungen haben, wie die Stimulierung der Teilung von glatten Muskelzellen und Vaso-Okklusion. Die genauen Mechanismen und Faktoren, die die Effekte einer Behandlung mit Androgenen bestimmen sowie die Balance zwischen nützlichen und schädlichen Wirkungen von Androgenen regulieren, müssen weiter untersucht werden.