Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive vascular disease characterized by increased pulmonary arterial pressure (PAP) and pulmonary vascular resistance (PVR). Pulmonary vascular remodeling is a hallmark of PAH pathophysiology and is largely driven by enhanced proliferation / migration and apoptosis resistance of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) and endothelial cells (ECs). In response to the increased afterload, the right ventricle (RV) initially undergoes adaptive remodeling characterized by enhanced contractility and hypertrophy. However, disease progression frequently leads to RV–pulmonary arterial uncoupling and consecutive right heart failure.

Phosphoinositide 3-kinase γ (PI3Kγ) represents a potential key regulator in PAH, as it is abundantly expressed in PASMCs, ECs, cardiomyocytes, fibroblasts, and particularly in leukocytes. Therefore, PI3Kγ may contribute to both pulmonary vascular remodeling and RV (mal)adaptation.

The aims of this study were to investigate (1) the roles of the catalytic and non-catalytic functions of PI3Kγ in pulmonary vascular remodeling, (2) their respective contributions to RV adaptation, and (3) the therapeutic potential of catalytic PI3Kγ inhibition. To address these aims, genetically modified PI3Kγ knockout (PI3Kγ$^{-/-}$) and PI3Kγ kinase dead (PI3Kγ$^{KD/KD}$) mice as well as pharmacologically treated mice and rats were examined, using hypoxia- and Sugen/hypoxia-induced pulmonary hypertension models, complemented by *in vitro* and *ex vivo* analyses.

While inactivation of either PI3Kγ catalytic or non-catalytic function had limited effects on pulmonary vascular cell proliferation and migration *in vitro*, both PI3Kγ mutant strains exhibited significantly increased PAP following hypoxia *in vivo*. Notably, simultaneous inactivation of both PI3Kγ functions led to a moderate increase in PAP even under baseline conditions. In contrast, therapeutic inhibition of catalytic PI3Kγ signaling did not significantly alter disease progression. *Ex vivo* experiments suggest that enhanced pulmonary vasoconstriction rather than altered vascular remodeling was causative for this phenotype. Interestingly, distinct effects on RV remodeling were observed. Selective inactivation of the catalytic PI3Kγ function was associated with abundant RV hypertrophy, whereas combined loss of catalytic and non-catalytic PI3Kγ signaling

resulted in features of maladaptive remodeling and RV–pulmonary arterial uncoupling. Proteomic and phosphoproteomic PI3Kγ$^{-/-}$ RV analyses further revealed alterations in mitochondrial pathways and structural myocardial remodeling. Consistently, echocardiographic assessment demonstrated impaired RV function in PI3Kγ$^{-/-}$ mice upon hypoxia.

In summary, PI3Kγ appears to play a limited role in pulmonary vascular remodeling but contributes substantially to the regulation of RV adaptation during pulmonary hypertension. Moreover, catalytic PI3Kγ inhibition alone does not provide therapeutic benefit in established disease.

Zusammenfassung

Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) ist eine progressive vaskuläre Erkrankung, die durch einen Anstieg des pulmonal arteriellen Drucks (PAP) und des pulmonal vaskulären Widerstands (PVR) charakterisiert ist. Ein zentrales Merkmal der Pathophysiologie stellt das vaskuläre Remodeling dar, welches insbesondere durch die gesteigerte Proliferation / Migration und Apoptose-Resistenz pulmonal arterieller glatter Gefäßmuskelzellen (PASMCs) und Endothelzellen (EC) vermittelt wird. Der rechte Ventrikel (RV) passt sich zunächst adaptiv an die gesteigerte Nachlast mit einer erhöhten Kontraktilität, sowie Hypertrophie an. Im Verlauf der Erkrankung kann es jedoch zu einer RV-pulmonal arteriellen Entkopplung und einem konsekutiven RV-Versagen kommen.

Ein zentrales Signaltransduktionsmolekül könnte PI3Kinase γ (PI3Kγ) sein, da sie sowohl in PASMCs und ECs exprimiert wird, als auch in Kardiomyozyten, Fibroblasten, sowie sehr stark in Leukozyten. Damit könnte PI3Kγ eine entscheidende Rolle bei vaskulärem Remodeling, als auch bei der Anpassung des RV auf den erhöhten PAP spielen.

Hauptziele dieser Arbeit waren 1) die Rolle der katalytischen, sowie nicht-katalytischen Funktion der PI3Kγ auf das pulmonal vaskuläre Remodeling zu untersuchen, 2) die jeweiligen Rollen im Kontext der RV Adaption zu analysieren und 3) therapeutische Effekte der katalytischen Inaktivierung zu ermitteln.

Dazu wurden verschiedene genetisch veränderte Mauslinien, sowie therapeutisch behandelte Mäuse und Ratten im Hypoxie- bzw. Sugen/Hypoxie-Modell der pulmonalen Hypertonie untersucht und durch in vitro und ex vivo Experimente weiter charakterisiert.

Obwohl die Inaktivierung beider PI3Kγ Funktionen keinen entscheidenden Einfluss auf das pulmonal vaskuläre Remodeling hatte, wurde ein signifikant erhöhter PAP nach Hypoxie gemessen. Dieser Effekt könnte auf eine gesteigerte Vasokonstriktion zurückzuführen sein. Im RV scheinen die beiden PI3Kγ Funktionen hingegen unterschiedliche Auswirkungen auf adaptives versus maladaptives Remodeling zu haben. Während die Inaktivierung der katalytischen Funktion mit Anzeichen einer ausgeprägten adaptiven RV- Hypertrophie einher ging, könnte die zusätzliche Inaktivierung der nicht-katalytischen Funktion bereits eine beginnende Entkopplung des PAP und der RV Funktion mit einer maladaptiven Hypertrophie aufzeigen. Untersuchungen des RV-Proteoms und -Phosphoproteoms weisen zudem auf eine

veränderte mitochondriale Aktivität, sowie eine veränderte strukturelle Reorganisation des Myokards hin. Zudem zeigte sich echokardiographisch eine eingeschränkte RV-Funktion. Eine therapeutische Inaktivierung der katalytischen PI3Kγ Funktion zeigte hingegen keine Veränderungen bei bereits etablierter Erkrankung.