

## Titelblatt zum Schlussbericht

**Thema:** Europäisches Netzwerk zum Noonan-Syndrom und verwandten Störungen

<b>Förderkennzeichen</b>	<b>Autoren</b> <i>(hier bitte alle Autorinnen und Autoren nennen, um Plagiatsvorwürfe zu vermeiden)</i>	<b>Zuwendungs-empfänger</b>	<b>Laufzeit</b> <i>(Beginn und Ende)</i>	<b>Hinweis auf Vertraulichkeit</b>
01GM1921B-TP3	Reza Ahmadian	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf	01.4.2019 – 31.12.2023	

**Kontaktperson:**

Prof. Dr. Reza Ahmadian  
Universitätstr. 1, Gebäude 22.03.05  
40225 Düsseldorf  
reza.ahmadian@hhu.de  
0211-81-12384

## I. Kurzdarstellung

### I.1. Aufgabenstellung

Die Ziele dieses Projekt (Teilprojektes 3) sind die strukturelle und biochemische Untersuchung neu identifizierter Mutationen bei RASopathie-Patienten mit Noonan-Syndrom und ähnlichen Erkrankungen, sowie die Identifizierung und Validierung neuartiger krankheitsrelevanter Zielstrukturen und deren Interaktionsflächen. Wir haben verschiedene Varianten von **CDC42**, **KRAS**, **HRAS**, **RRAS1**, **RRAS2**, **MRAS**, **RIT1**, **ARF3**, **RAF1**, und **SOS1** strukturell und funktionell charakterisiert. Diese Studien haben uns neue Erkenntnisse geliefert, auf die wir aufbauen, um unser wissend grundlegend zu erweitern und die damit verbundene Ideen zur Identifizierung von neuartigen Wirkstoffzielstrukturen zu prüfen.

Das Düsseldorfer Teilprojekt 3 beschäftigte sich mit der Frage, wie sich die identifizierten Genmutationen auf die Proteinfunktionen auswirken und damit zur Krankheitsentstehung beitragen.

### I.2. Voraussetzungen

In diesem Teilprojekt wurden die Stärken von zwei verschiedenen Ansätzen in einem einheitlichen Rahmen kombiniert und voll ausgeschöpft:

- a) In einem zellbasierten Ansatz haben wir die in unserem Labor etablierten Methoden genutzt, um RASopathie-Genmutationen zu untersuchen.
- b) In einem zellfreien Ansatz haben wir RASopathie-relevante native Proteinkomplexe präpariert, deren Komponenten identifiziert, um die krankheitsrelevanten Interaktionsnetzwerke zu bestimmen und die Interaktionsflächen als potentielle Zielstrukturen funktionell zu validieren.

### I.3. Planung und Ablauf

In diesem Teilprojekt wurden die Auswirkungen spezifischer RASopathien-assoziiierter Mutationen auf die Signalkaskaden, Kontrollmechanismen patientenspezifischer Kardiomyozyten nach Etablierung innovativer Organoid-Technologien eingehend untersucht und dabei

- a) der Mechanismus der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von iPSC aufgeklärt,
- b) 47 Tage gereifte 3D-Kardiac Bodies in höherer Qualität und Quantität für detaillierte Untersuchungen bereitgestellt,
- c) eine Hyperaktivierung des MAPK-Signalwegs identifiziert und
- d) eine kardiale Hypertrophie durch einen niedermolekularen Inhibitor gegen MEK ein RAF1-Substrat, selektiv wiederhergestellt.

Darüber hinaus wurden die Auswirkungen spezifischer, mit RASopathien assoziierter Mutationen auf die molekulare Struktur und Funktion von RAS-Proteinen und ihren Netzwerken nach Etablierung innovativer biochemisch-biophysikalischer Technologien eingehend untersucht und dabei

- a) die RAS-Lipidmembran-Interaktion bestimmt,
- b) das Aktivierungspotential des RAS-MAPK-Signalwegs bestimmt,
- c) native Proteinkomplexe isoliert und identifiziert und
- d) RAS-Effektor-Interaktionen und Effektoraktivierung charakterisiert.

Damit haben wir die RAS-Signalkaskade funktionell charakterisiert, die entsprechenden pathobiochemisch relevanten nativen Proteinkomplexe analysiert und die für die RAS-Pathologie relevanten RAS-Interaktionsnetzwerke mechanistisch untersucht.

### I.4. Wissenschaftlicher/technischer Stand

In diesem Teilprojekt wurden Technologien zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz von iPSCs sowie zur Differenzierung von RAS-pathogen-spezifischen iPSCs in 3D-Herzkörper höherer Qualität und Quantität entwickelt und weiter optimiert, verschiedene Methoden zur Charakterisierung von 3D-Herzkörpern etabliert, die zu einem besseren Verständnis der pathogenetisch-molekularen Mechanismen geführt haben. Zur Aufklärung der Kontrollmechanismen intrazellulärer Signalnetzwerke und zur systemischen Rekonstruktion

therapeutisch relevanter Proteinnetzwerke, vorzugsweise an der Lipidmembran, haben wir verschiedene Methoden entwickelt und weiter optimiert, darunter die fluoreszenzbasierte Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen an synthetischen Liposomen und die Anreicherung von Zellfraktionen zur Identifizierung RAS-pathogener intakter Proteinkomplexe, die für die Charakterisierung RAS-pathogener therapeutischer Targets von zentraler Bedeutung sind.

### **I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Dieses Teilprojekt hat sehr erfolgreich mit anderen Verbundpartnern, u.a. Marco Tartaglia (Rom; TP1), Martin Zenker (Magdeburg; TP2), und Bruce Gelb (New York; assoziierter Partner) zusammengearbeitet, wie es aus der Publikationsliste unter II.6. deutlich wird.

## II. Eingehende Darstellung

Das Noonan-Syndrom, die häufigste und klinisch variabelste der RASopathien, wird überwiegend dominant vererbt und ist genetisch heterogen mit Mutationen in mehr als 10 Genen, die für Proteine kodieren, die in der RAS-MAPK-Signalkaskade eine Rolle spielen (PTPN11, SOS1, SOS2, NRAS, KRAS, RRAS2, MRAS, RAF1, BRAF, LZTR1, RIT1 und MAP2K1), die mit der Erkrankung assoziiert sind. Zu den Hauptmerkmalen von NS gehören Gesichtsdysmorphien, Kleinwuchs, verschiedene kognitive Defizite, angeborene Herzfehler (AHF) und hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), ektodermale/muskulo-skelettale Defekte, hämatologische/lymphatische Anomalien und ein unterschiedliches Risiko für bestimmte maligne Erkrankungen. Die Lebenserwartung bei NS ist normal, wenn keine schweren Herzfehler vorliegen. Es wurde jedoch über eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung berichtet, wobei die Hälfte der Todesfälle im Kindesalter auftritt.

Die meisten dieser Proteine sind Signaltransduktoren, die die RAS-MAPK-Kaskade positiv modulieren und komplexe autoinhibitorische Mechanismen besitzen, die durch Mutationen beeinträchtigt werden. In den meisten Fällen ähneln die molekularen Mechanismen, die zur funktionellen Dysregulation dieser Signaltransduktoren führen, denen, die für das onkogene Verhalten dieser Proteine verantwortlich sind. Im Allgemeinen sind die NS-verursachenden Mutationen in diesen Proto-Onkogenen weniger aktivierend als die entsprechenden krebsassoziierten Läsionen. Screeningbemühungen und Studien zur Untersuchung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen haben gezeigt, dass eine erhebliche klinische Variation, die für NS charakteristisch ist, dem mutierten Gen und sogar der spezifischen molekularen Läsion zugeordnet werden kann. Trotz der großen Anzahl beteiligter Gene weisen jedoch bis zu 20 % der klinisch diagnostizierten NS-Patienten keine Mutationen in bekannten RASopathie-Genen auf, was darauf hindeutet, dass Mutationen in zusätzlichen, noch nicht identifizierten Genen an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sind.

Weitere Anstrengungen sind jedoch erforderlich, um die molekularen Ursachen von NS und anderen RASopathien aufzuklären. Obwohl die hochregulierte Signaltransduktion durch den RAS-MAPK-Signalweg als Hauptursache für die meisten RASopathien bekannt ist, hat die Verwendung hypothesenfreier Ansätze, die auf der Sequenzierung des gesamten Exoms bzw. Genoms basieren, in letzter Zeit zur Entdeckung neuer RASopathie-Gene geführt (z.B. CDC42, RRAS2, LZTR1, FBXW11, RIT1), die für Signaltransduktoren oder Modulatoren kodieren, die nicht zum "klassischen" RAS-MAPK-Signalnetzwerk gehören und deren Funktion in der RAS-Signaltransduktion noch unzureichend charakterisiert ist. Die funktionelle Dysregulation dieser Proteine könnte die RAS-Signaltransduktion direkt oder indirekt über neue Schaltkreise, die die RAS- und MAPK-Funktion kontrollieren, beeinflussen. Diese Ergebnisse legen jedoch nahe, dass auch andere zelluläre Signalwege (z.B. Signale, die die Restrukturierung und Dynamik des Zytoskeletts kontrollieren) zur Pathogenese von RAS-Erkrankungen beitragen können und unterstreichen die Notwendigkeit, die Bedeutung von Überlappungen mit anderen Signalwegen, inhibitorischen Rückkopplungsmechanismen und nicht-autonomen Effekten in der Krankheitspathogenese zu verstehen. Angesichts der zunehmenden Verfügbarkeit von Molekülen, die auf die beiden wichtigsten intrazellulären Signalwege abzielen, die bei RASopathien eine Rolle spielen, ist ein tieferes und genaueres Verständnis der molekularen Mechanismen, durch die einzelne Mutationen die Proteinfunktion und die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflussen, ein wichtiger Schritt zur Entwicklung wirksamer Therapien. Ebenso wurden erste Erkenntnisse über die Pathophysiologie gewonnen, wenngleich wir noch weit von einem umfassenden Verständnis der zellulären und systemischen Prozesse entfernt sind, die die evolutionären Komplikationen dieser Erkrankungen auslösen.

### II.1. Ergebnisse

Folgende Resultate wurden innerhalb des Berichtsraums erarbeitet:

**II.1.1. Pathophysiologie der evolutionären Komplikationen bei RASopathien.** In Zusammenarbeit mit P1, P2 und assoziierten Partnern in den USA haben wir uns zum Ziel gesetzt, den molekularen Mechanismus der NS-assoziierten HCM in Form von RAF1(S257L)

aufzuklären. Dazu haben wir induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) von RAF1(S257L)-Patienten generiert und diese in zwei verschiedene dreidimensionale zellbasierte Modelle des menschlichen Herzens differenziert, nämlich Herzkörper (CBs) und bioartifizielles Herzgewebe (BCTs) (**Nakhaei-Rad et al., 2023**). Unsere Ergebnisse in dieser Studie sind wie folgt

- a) Patientenspezifische iPSC-Kardiomyozyten mit hochregulierter RAF1-Funktion rekapitulieren verschiedene Krankheitsmerkmale der kardialen Hypertrophie (**Bazgir et al., 2023**).
- b) RAF1S257L erhöht die MAPK-, p38- und YAP-Signaltransduktion in Kardiomyozyten.
- c) RAF1S257L moduliert die wichtigsten Regulatoren der Kalzium-Signaltransduktion negativ.
- d) Die Verkürzung des sarkomerischen I-Bandes ist mit einer abnormalen Herzfunktion verbunden.
- e) Es ist wichtig, dass die kritischen strukturellen Befunde der In-vitro-Modelle mit den Ergebnissen von Myokardbiopsien des menschlichen Herzmuskels übereinstimmen.

### **II.1.2. Die komplexe Rolle von SHOC2, MRAS und PPP1CB in der MAPK-Funktion.**

Erhebliche Fortschritte wurden beim Verständnis der räumlich-zeitlichen Eigenschaften der einzelnen Mitglieder des RAS-MAPK-Signalwegs erzielt, die durch eine Vielzahl von akzessorischen Proteinen, einschließlich SHOC2, miteinander verknüpft und moduliert werden. Obwohl die meisten dieser akzessorischen Proteine inzwischen als attraktive therapeutische Zielmoleküle gelten, sind nur sehr wenige von ihnen funktionell charakterisiert (**Pudewell et al., 2021**). SHOC2 zum Beispiel bildet einen Komplex mit MRAS und aktiviert PP1, das wiederum RAF1 an Ser259 dephosphoryliert, ein Prozess, der dazu führt, dass RAF1 aus seiner Selbsthemmung befreit und anschließend im Komplex mit KRAS an der Plasmamembran aktiviert wird. In Zusammenarbeit mit P1 untersuchen wir die strukturellen Kontaktstellen zwischen SHOC2 und seinen Bindungspartnern wie RAF1 und MRAS. Es ist uns gelungen, gereinigte Proteine wie die regulatorischen Regionen von RAF1 (ARAF und BRAF dienten als Kontrollen) und verschiedene Varianten von MRAS zu erhalten. Die Aufreinigung von SHOC2-Varianten aus heterologen bakteriellen Systemen war nicht ganz erfolgreich. Neue Expressionssysteme wie das Baculovirus-Insektenzellsystem und weitere Modifikationen der SHOC2-Domänen sind in Arbeit. In ähnlicher Weise wird derzeit an der Etablierung eines Expressionssystems für die Aufreinigung von PP1-Proteinen gearbeitet. Dies und die Aufreinigung von SHOC2 wird es uns nicht nur ermöglichen, die Interaktion dieser Proteine mit MRAS bzw. RAF1 zu analysieren, sondern auch ein Fenster für die Charakterisierung der jeweiligen RAS-pathologischen Varianten dieser Gene zu öffnen.

**II.1.3. Posttranslationale Prozessierung von RAS-Proteinen.** Ein Modulationsmechanismus, der die Funktion von HRAS durch reversible Phosphorylierung von Tyr32 kontrolliert, scheint die Bindung von HRAS an RAF signifikant zu reduzieren, die Bindung an GAPs zu erhöhen und dadurch HRAS zu inaktivieren. HRAS wird durch SRC an Tyr32 phosphoryliert und durch SHP2 dephosphoryliert. Obwohl man annimmt, dass diese Aminosäure eine entscheidende Rolle bei der Konformationsänderung von RAS spielt, die für die Bindung an Effektoren notwendig ist, wurde eine Mutation dieses Restes bisher nicht bei menschlichen Krebserkrankungen oder RAS-Opathien gefunden. In Zusammenarbeit mit P1 haben wir mehrere HRAS Varianten (Tyr32Asp, Tyr32Phe, Tyr32Asp/Gly13Glu und Gly13Glu) charakterisiert. Diese Arbeit wird demnächst zur Veröffentlichung eingereicht (**Flex, Bazgir, et al., in Vorbereitung**).

**II.1.4. Funktionelle Charakterisierung der CDC42-Varianten.** Die bei Patienten mit Entwicklungsstörungen identifizierten CDC42-Mutationen (Lys16Arg, Tyr23His, Pro34Leu, Asp118Gly, Gly164Arg und Asp170Asn) wurden in Zusammenarbeit mit P1 strukturell und funktionell eingehend untersucht (**Coppola, Mosaddeghzadeh, et al., in Vorbereitung**). Die Varianten Lys16Arg, Pro34Leu und Gly164Arg heben insbesondere die GAP-vermittelte Inaktivierung von CDC42 auf und beeinträchtigen die Interaktion von CDC42 mit seinen Effektoren WASP, PAK1 und IQGAP1.

**II.1.5. Funktionelle Charakterisierung der ARF3-Varianten.** ARF3-Varianten (Leu12Val/Asp67Val, Thr32Asn, Pro47Ser, Asp93Asn und Lys127Glu) wurden hinsichtlich ihrer Nukleotidbindung und des ARFGEF BIG2-vermittelten Nukleotidaustausches, der GTP-Hydrolyse und der Interaktion mit dem ARF-Effektor GGA3 funktionell charakterisiert (Fasano, et al. 2022). Unsere bisherigen Daten zeigen, dass die K127E- und D93N-Varianten eine deutlich erhöhte intrinsische Nukleotidaustauschrate aufweisen (bis zu 40-fach im Vergleich zu ARF3 WT), was darauf hindeutet, dass diese schnell zyklischen Varianten höchstwahrscheinlich im GTP-gebundenen Zustand in den Zellen vorliegen. Um die Effektorbindungsaktivitäten von ARF3-Varianten mit GGA3 zu evaluieren, wurde ein Pull-Down-Assay mit GST-GGA3-GAT und Zelllysaten mit überexprimierten ARF3-Varianten durchgeführt. Unsere Daten zeigten eine beeinträchtigte Effektorinteraktion für Leu12Val/Asp67Val und Thr32Asn.

**II.1.6. Molekulare Basis der SIRT4-C-RAF Interaktion.** Unsere Studie liefert neue mechanistische Erkenntnisse über die Regulation des MAPK-Signalwegs durch SIRT4, ein Sirtuin-Protein und Tumorsuppressor, als negativer Regulator und Interaktor der (proto)onkogenen Kinase C-RAF (**Mehrabipour et al., 2024**). Wir kartieren die SIRT4-C-RAF-Interaktion auf molekularer Ebene und zeigen, dass SIRT4 spezifisch an die inaktive Form von C-RAF bindet, was zu einer signifikanten Reduktion der ERK-Phosphorylierung führt. Unsere Daten weisen somit auf eine neuartige extra-mitochondriale Rolle des Tumorsuppressors SIRT4 hin.

## II.2. Positionen:

Personal: Zwei Doktoranden (TVL E13/65%) sind im Rahmen dieses Projekt eingestellt.

Geräte: Keine

## II.3. Notwendigkeit:

Die anvisierten Hauptziele dieses Projekt wurden innerhalb der angesetzten Zeit erreicht. Dazu zählen u.a. (a) Verständnis der molekularen Ursache der Kardiomyopathie durch Untersuchung der RAF1-Netzwerke und -Signalwege sowohl in induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC)-abgeleiteten Kardiomyozyten von primären Fibroblasten von RASopathie-Patienten, sowie (b) Einsatz eines niedermolekularen Inhibitors gegen MEK, ein RAF1-Substrat, der eine selektive Reversion der kardialen Hypertrophie bei 3D-*Cardiac Bodies* mit einer RAF1<sup>S257L</sup>-Mutation bewirkt haben.

## II.4. Nutzen:

Mit dem Abschluss dieses Teilprojekts haben wir in enger Zusammenarbeit mit NSEuroNet-Verbundpartner, v.a. **TP1** und **TP2**, die molekulare Details einiger fehlregulierter RASopathie-spezifische Signalwege aufgeklärt und dabei neuer funktionale Kontrollmechanismen postuliert, welche von großer Bedeutung für die Definition neuer Zielstrukturen sind und zukünftig essentiell für die rationale Entwicklung hochselektiver Pharmaka (z.B. Inhibitoren des RAS-MAPK-Signalweges) sein können.

Aus iPSCs, die von RASopathie-Patienten stammen, differenzierte Herzkranzgefäße stellen ein wertvolles menschliches in vitro 3D-Modellsystem nicht nur für pathomechanistische Studien, sondern auch für pharmakologische Untersuchungen dar. Die funktionelle Analyse einzelner Mutationen, die funktionelle Charakterisierung von RASopathie-Proteinen über die RAS-Paraloge hinaus und die Identifizierung von RASopathie-relevanten Protein-Interaktionsnetzwerken eröffnen neue Möglichkeiten zur weiteren Erforschung der molekularen und zellulären Pathomechanismen von RASopathien. Um über das derzeitige Verständnis der RAS-Signaltransduktion und das Paradigma der Arzneimittelentdeckung hinauszugehen, ist ein viel tieferes Verständnis des RAS-Interaktionsnetzwerks an der Plasmamembran erforderlich. Zu diesem Zweck kombiniert dieses interdisziplinäre Teilprojekt mehrere innovative und

vielversprechende Instrumente und Strategien, um die mechanismusbasierte Identifizierung neuer Targets mit selektiven RASopathie-Medikamenten zu verbinden.

Auch wenn eine wirtschaftliche Verwertung der Ergebnisse des Vorhabens derzeit nicht absehbar ist, steht im Vordergrund die Suche und folglich mechanismus-basierte Identifizierung von RASopathie-relevanten Proteinkomplexen, die uns entscheidende Einblicke in die für die RASopathie-abhängigen Signalkaskaden wichtiger Proteininteraktionsoberflächen liefern. Wohldefinierte Grenzflächen von Protein-Komplexen werden folglich der Wirkstoffentdeckung in der RASopathie-Forschung dienen.

## II.5. Fortschritt:

Die Forschungsansätze dieses Teilprojekts sind hochkompetitiv, so dass uns andere Gruppen bei einer Patentanmeldung zuvorkommen könnten. Es ist jedoch zu erwähnen, dass unsere Arbeitsmethoden fachspezifische Expertise und hohe Reproduzierbarkeit voraussetzen, die in dieser Qualität nicht häufig vorzufinden ist.

## II.6. Veröffentlichungen (ausschließlich aus dem Vorhaben entstandene Veröffentlichungen mit Angabe des Förderkennzeichens):

- Motta M, Sagi-Dain L, Krumbach OHF, Hahn A, Peleg A, German A, Lissewski C, Coppola S, Pantaleoni F, Kocherscheid L, Altmüller F, Schanze D, Logeswaran T, Chahrokh-Zadeh S, Munzig A, Nakhaei-Rad S, Cavé H, **Ahmadian MR**, **Tartaglia M**, **Zenker M**. Activating MRAS mutations cause Noonan syndrome associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics* 2020; 29(11): 1772-1783. doi: 10.1093/hmg/ddz108.
- Rezaei Adariani S, Kazemian Jasemi NS, Bazgir F, Wittich C, Amin E, Seidel CAM, Dvorsky R, **Ahmadian MR**. A comprehensive analysis of RAS-effector interactions reveals interaction hotspots and new binding partners. *J. Biol. Chem.* 2021 Apr 27;100626. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100626.
- Taha MS, Haghghi F, Stefanski A, Nakhaei-Rad S, Jasemi NSK, Al Kabbani MA, Görg B, Fujii M, Lang PA, Häussinger D, Piekorz R, Stuhler K, **Ahmadian MR**. Novel FMRP interaction networks linked to cellular stress. *FEBS Journal* 2021; 288(3): 837-860. doi: 10.1111/febs.15443. Epub 2020 Jun 23.
- Mosaddeghzadeh N, Nouri K, Krumbach OHF, Amin E, Dvorsky R, **Ahmadian MR**. Selectivity Determinants of RHO GTPase Binding to IQGAPs. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(22): 12596. doi: 10.3390/ijms222212596.
- Mosaddeghzadeh N, Kazemian Jasemi NS, Majolée J, Zhang SC, Hordijk PL, Dvorsky R, **Ahmadian MR**. Electrostatic Forces Mediate the Specificity of RHO GTPase-GDI Interactions. *Int J Mol Sci* 2021;22:12493. doi: 10.3390/ijms222212493.
- Saliani M, Mirzaiebadizi A, Mosaddeghzadeh N, **Ahmadian MR**. RHO GTPase-Related Long Noncoding RNAs in Human Cancers. *Cancers* 2021; 13(21): 5386. doi: 10.3390/cancers13215386.
- Hegde S, Gasilina A, Wunderlich M, Lin Y, Buchholzer M, Krumbach OHF, Akbarzadeh M, **Ahmadian MR**, Seibel W, Zheng Y, Perentesis JP, Mizukawa BE, Vinnedge LP, Cancelas JA, Nassar NN. Inhibition of the RacGEF VAV3 by the small molecule IODVA1 impedes RAC signaling and overcomes resistance to tyrosine kinase inhibition in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2021; 36(3):637-647. doi: 10.1038/s41375-021-01455-3.
- Saliani M, Mirzaiebadizi A, Javadmanesh A, Siavoshi A, **Ahmadian MR**. KRAS-related long noncoding RNAs in human cancers. *Cancer Gene Therapy* 2021 Sep 6. doi: 10.1038/s41417-021-00381-x.
- Pudewell S, Wittich C, Jasemi NSK, Bazgir F, **Ahmadian MR**. Accessory proteins of the RAS-MAPK pathway: moving from the side line to the front line. *Communications Biology* 2021; 4(1): 696. doi: 10.1038/s42003-021-02149-3.
- Mosaddeghzadeh N, **Ahmadian MR**. The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling. *Cells* 2021; 10(7): 1831. doi: 10.3390/cells10071831.
- Kazemian Jasemi NS, Herrmann C, Estirado EM, Gremer L, Willbold D, Brunsveld L, Dvorsky R, **Ahmadian MR**. The intramolecular allostery of GRB2 governing its interaction with SOS1

- is modulated by phosphotyrosine ligands. *Biochemical Journal* 2021; 478(14): 2793-2809. doi: 10.1042/BCJ20210105.
- Pudewell S, **Ahmadian MR**. Spotlight on Accessory Proteins: RTK-RAS-MAPK Modulators as New Therapeutic Targets. *Biomolecules*. 2021; 11:895. doi: 10.3390/biom11060895.
- Rahmani F, Hashemzahi M, Avan A, Barneh F, Asgharzadeh F, Marjaneh RM, Soleimani A, Parizadeh M, Ferns GA, Mobarhan MG, Ryzhikov M, Afshari AR, **Ahmadian MR**, Giovannetti E, Jafari M, Khazaei M, Hassanian SM. Rigosertib elicits potent anti-tumor responses in colorectal cancer by inhibiting Ras signaling pathway. *Cellular Signalling* 2021; 85: 110069. doi: 10.1016/j.cellsig.2021.110069.
- Pudewell S, Lissy J, Nakhaeizadeh H, Taha MS, Akbarzadeh M, Rezaei Adariani S, Nakhaei-Rad S, Li J, Kordes C, Häussinger D, Piekorz RP, Cortese-Krott MM, **Ahmadian MR**. Physical Interaction between Embryonic Stem Cell-Expressed Ras (ERas) and Arginase-1 in Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Cells*. 2022 Feb 1;11:508. doi: 10.3390/cells11030508.
- Akbarzadeh M, Flegel J, Patil S, Shang E, Narayan R, Buchholzer M, Jasemi NSK, Grigalunas M, Krzyzanowski A, Abegg D, Shuster A, Potowski M, Karatas H, Karageorgis G, Mosaddeghzadeh N, Zischinsky ML, Merten C, Golz C, Brieger L, Strohmam C, Antonchick AP, Janning P, Adibekian A, Goody RS, **Ahmadian MR**, Ziegler S, Waldmann H. The Pseudo-Natural Product Rhonin Targets RHOGDI. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2022 Feb 16. doi: 10.1002/anie.202115193.
- Fasano G, Muto V, Radio FC, Venditti M, Mosaddeghzadeh N, Coppola S, Paradisi G, Zara E, Bazgir F, Ziegler A, Chillemi G, Bertuccini L, Tinari A, Vetro A, Pantaleoni F, Pizzi S, Conti LA, Petrini S, Bruselles A, Prandi IG, Mancini C, Chandramouli B, Barth M, Bris C, Milani D, Selicorni A, Macchiaiolo M, Gonfiantini MV, Bartuli A, Mariani R, Curry CJ, Guerrini R, Slavotinek A, Iascone M, Dallapiccola B, **Ahmadian MR**, Lauri A, **Tartaglia M**. Dominant ARF3 variants disrupt Golgi integrity and cause a neurodevelopmental disorder recapitulated in zebrafish. *Nat Commun*. 2022 Nov 11;13(1):6841. doi: 10.1038/s41467-022-34354-x.
- Nakhaei-Rad S, Haghighi F, Bazgir F, Dahlmann J, Busley AV, Buchholzer M, Kleemann K, Schänzer A, Borchart A, Hahn A, Kötter S, Schanze D, Anand R, Funk F, Kronenbitter AV, Scheller J, Piekorz RP, Reichert AS, Volleth M, Wolf MJ, Cirstea IC, **Gelb BD**, **Tartaglia M**, Schmitt JP, Krüger M, Kutschka I, Cyganek L, **Zenker M**, Kensah G, **Ahmadian MR**. Molecular and cellular evidence for the impact of a hypertrophic cardiomyopathy-associated RAF1 variant on the structure and function of contractile machinery in bioartificial cardiac tissues. *Commun Biol*. 2023;6(1):657. doi: 10.1038/s42003-023-05013-8.
- Bazgir F, Nau J, Nakhaei-Rad S, Amin E, Wolf MJ, Saucerman JJ, Lorenz K, **Ahmadian MR**. The Microenvironment of the Pathogenesis of Cardiac Hypertrophy. *Cells*. 2023;12(13):1780. doi: 10.3390/cells12131780.
- Mehrabipour M, Nakhaei-Rad S, Dvorsky R, Lang A, Verhülsdonk P, **Ahmadian MR**, Piekorz RP. SIRT4 as a novel interactor and candidate suppressor of C-RAF kinase in MAPK signaling. *Life Sci Alliance*. 2024;7(6):e202302507. doi: 10.26508/lsa.202302507.

**III. Berichtsblatt und Document Control Sheet**

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht	
3. Titel NSEuroNet-Verbund TP3: Europäisches Netzwerk zum Noonan-Syndrom und verwandten Störungen		
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Ahmadian, Reza	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2023	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation	
	8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf	
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Europäisches Gemeinsames Programm für seltene Krankheiten (EJP RD)	9. Ber. Nr. Durchführende Institution	
	10. Förderkennzeichen 01GM1921B	
	11. Seitenzahl	
13. Literaturangaben		14. Tabellen
15. Abbildungen		16. Zusätzliche Angaben
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)		
18. Kurzfassung  Die RASopathien bilden eine Familie seltener Krankheiten, die die Entwicklung beeinträchtigen. Dazu gehören das Noonan-Syndrom und eine wachsende Zahl von Erkrankungen mit gemeinsamen Merkmalen wie Wachstumsretardierung, angeborene Herzfehler, hypertrophe Kardiomyopathie, kognitive Defizite, Gesichtsdysmorphien, Skelett- und hämatologische Anomalien sowie eine variable Prädisposition für bestimmte maligne Erkrankungen. Den RASopathien ist die Hochregulierung der RAS-Signaltransduktion über die MAPK- und/oder PI3K-AKT-mTOR-Signalwege als pathogenetischer Mechanismus gemeinsam. Die bisherigen Arbeiten der Verbundpartner haben wesentlich zum Verständnis der molekularen Ursachen dieser Erkrankungen und zu ihrer klinischen Charakterisierung beigetragen. Dennoch bleiben grundlegende Fragen zu den Krankheitsmechanismen unbeantwortet, und eine beträchtliche Anzahl von Patienten bleibt auf molekularer Ebene ungeklärt. Ziel der vorgeschlagenen Forschungsarbeiten war die Erforschung der molekularen Grundlagen dieser Krankheiten. Die Forschungsarbeiten zielten darauf ab, die funktionellen Konsequenzen einer großen Gruppe von nicht charakterisierten RAS-Pathologie verursachenden Mutationen aufzuklären, in vitro und in vivo Gen/Mutation-spezifische Modelle zu entwickeln, neue Schaltkreise zu charakterisieren, die die RAS-Signaltransduktion modulieren, die Pathophysiologie der wichtigsten Komplikationen dieser Krankheiten zu untersuchen und neue Krankheitsgene zu identifizieren.		
19. Schlagwörter CDC42; hypertrophe Kardiomyopathie; HRAS, KRAS; MAP-Kinase; MRAS; Noonan-Syndrom; RAF1; RASopathie; RIT1; RRAS2; SOS1.		
20. Verlag	21. Preis	