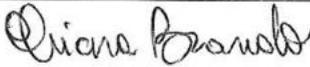


PROGETTO DI RICERCA / RESEARCH PROJECT
(max 5 pagine / max 5 pages)

| | |
|--|---|
| Cognome/Surname | Brando |
| Nome / Name | Chiara |
| Titolo del progetto / Project title | Possibile relazione tra le malattie da accumulo lisosomiale e il cancro. |
| Corso di dottorato / PhD | Oncologia e chirurgia sperimentali |
| Firma del candidato / Applicant's signature |  |

1 - Sommario / Abstract

Le malattie da accumulo lisosomiale (LSD) sono un gruppo di circa 50 malattie metaboliche ereditarie causate da mutazioni in geni che codificano per enzimi, proteine integrali di membrana e proteine di trasporto a localizzazione lisosomiale.

Le mutazioni in questi geni causano un difetto di una o più delle diverse funzioni dei lisosomi che determina un accumulo di metaboliti o sostanze di scarto nei lisosomi stessi, con conseguente perdita di funzionalità cellulare.

Lo scopo di questo progetto è quello di studiare un'eventuale correlazione tra le LSD e il cancro investigando su possibili funzioni alternative dei geni causativi della LSD nella patogenesi del cancro.

Inoltre, considerando le molteplici funzioni dei microRNAs e alla luce delle evidenze sperimentali da cui emerge la presenza nel plasma di pazienti affetti da LSD di microRNAs differenzialmente espressi, un altro obiettivo del progetto è quello di investigare il possibile ruolo di questi microRNAs nella patogenesi del cancro.

L'individuazione di eventuali mutazioni nei geni responsabili delle LSD potrebbe rappresentare un passo avanti nella comprensione dei meccanismi sottesi alla patogenesi delle malattie da accumulo lisosomiale e alla loro eventuale evoluzione verso patologie oncologiche.

2 - Descrizione del progetto / Project

Le malattie da accumulo lisosomiale (LSD) sono un gruppo di circa 50 malattie metaboliche ereditarie causate da mutazioni in geni che codificano per enzimi, proteine integrali di membrana e proteine di trasporto a localizzazione lisosomiale. Le mutazioni in questi geni causano un difetto di una o più delle diverse funzioni dei lisosomi (1).

I geni responsabili dell'insorgenza delle LSD sono per la maggior parte ereditati come tratti autosomici recessivi; altri, invece, sono legati al cromosoma X. Le mutazioni in tali geni influenzano le funzioni della proteina che codificano, causando un malfunzionamento lisosomiale e l'accumulo graduale di substrati all'interno del lisosoma stesso, che porta al danno ed alla successiva morte della cellula. Lo studio di circa 1.300 geni coinvolti nelle funzioni lisosomiali ha permesso di identificare 50 deficienze enzimatiche che possono essere sottoclassificate in base al tipo di materiale immagazzinato (ad esempio sfingolipidosi, mucopolisaccaridosi e glicoproteinosi) in 7 disturbi che coinvolgono proteine integrali di membrana, 12 disturbi degli organelli lisomereletati (LRO) e 14 disturbi che comportano la produzione di lipofuscina (2).

Le LSD hanno fenotipi clinici eterogenei e spesso si presentano come malattie neurodegenerative pediatriche, accompagnate da visceromegalia (ingrossamento degli organi addominali come il fegato e la milza). Tuttavia, a seconda del difetto genetico e della natura biochimica delle macromolecole accumulate, le LSD possono anche causare dimorfismi scheletrici che determinano patologie ossee e possono essere associate a ritardo dello sviluppo o altri deficit del sistema nervoso centrale (SNC), oltre a sintomi che interessano altri sistemi d'organo. I pazienti presentano un continuum di gravità della malattia spesso riconducibile al tipo di mutazione e all'attività residua della proteina mutata, ma sono generalmente classificati, sulla base del tipo di disturbo e dell'età di esordio dei segni clinici, come congeniti o infantili (che di solito hanno manifestazione più severa), tardo-infantili, giovanili o dell'adulto.

La diagnosi delle LSD si basa sui sintomi clinici e sulla valutazione enzimatica e delle alterazioni genetiche utilizzando diversi test diagnostici, tra cui l'analisi dell'attività enzimatica e il sequenziamento di singoli geni. Tuttavia, la diagnosi, in particolare

nelle forme più lievi o atipiche con una sopravvivenza più lunga per il paziente, è spesso ritardata a causa di sintomi clinici sovrapponibili a patologie più comuni.

Recentemente, il sequenziamento di nuova generazione (NGS), in particolare il sequenziamento dell'intero esoma, sta diventando di routine e potrebbe ridurre il tempo trascorso dalla presentazione dei segni e dei sintomi clinici alla diagnosi.

La comprensione della fisiopatologia delle LSD ha fatto importanti progressi che hanno permesso di identificare molteplici potenziali punti di intervento clinico.

In generale, le LSD hanno un'incidenza stimata di 1 su 5.000 e di 1 su 5.500 per le LSD che coinvolgono, rispettivamente, gli enzimi lisosomiali e i difetti delle proteine integrali di membrana. Tuttavia, le singole LSD sono considerate rare, con incidenze stimate che variano da 1 su 50.000 a 1 su 250.000 nati vivi. Le LSD più comuni sono la malattia di Fabry (FD) fino a 2,5 casi ogni 100.000 maschi, la malattia di Pompe (PD) fino a 2,5 casi ogni 100.000 individui e la malattia di Gaucher (GD) fino a 2 casi ogni 100.000 individui.

La **malattia di Fabry** è una malattia genetica ereditaria, causata dalla mutazione del gene α -galattosidasi A (GLA), situato sul cromosoma X, che codifica per un enzima chiamato α -galattosidasi A. Tale enzima ha un ruolo fondamentale nel processo di scomposizione di uno sfingolipide, noto come globotriosilceramide (Gb3).

I soggetti affetti da malattia di Fabry presentano carenza o deficit dell'enzima α -galattosidasi A; di conseguenza le molecole di Gb3 e globotriaosylsphingosine (lysoGb3) tendono ad accumularsi in modo anomalo all'interno dei lisosomi con grave sofferenza per le cellule interessate. Nei soggetti con malattia di Fabry, le cellule dell'organismo che maggiormente risentono delle mutazioni a carico del gene GLA, con conseguente accumulo dei substrati, sono le cellule che compongono la parete dei vasi sanguigni, le cellule dei reni, del cuore e del sistema nervoso (3,4).

La **malattia di Pompe** è un disordine autosomico recessivo del metabolismo del glicogeno ed è caratterizzata dal mancato smaltimento del glicogeno, la riserva energetica dei muscoli, a causa della mancanza o di un deficit dell'enzima α -1,4-glucosidasi acida (GAA, maltasi acida), deputato allo smaltimento del glicogeno nei lisosomi.

Il gene GAA si trova sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q25.2-q25.3) e contiene 20 esoni, di cui il primo non codificante e gli altri 19 codificano per una proteina di 952 aa con un peso molecolare di 105-kDa. L'accumulo di glicogeno causa una progressiva debolezza muscolare (miopatia) in tutto il corpo e colpisce vari tessuti, in particolare cuore, muscoli scheletrici, fegato e sistema nervoso. I muscoli più severamente interessati dalla debolezza muscolare sono gli addominali (con particolare riferimento al diaframma), i paraspinali, i flessori, gli adduttori e gli abduttori dell'anca (5,6).

La **malattia di Gaucher** è causata da una carenza dell'enzima glucocerebrosidasi (β -glucosidasi acida), un'idrolasi lisosomiale coinvolta nella degradazione degli glicosfingolipidi.

Nella maggior parte dei pazienti la malattia di Gaucher esordisce in età infantile con manifestazioni quali, ecchimosi e tendenza allo sviluppo di emorragie, spassatezza, dolore alle ossa o, più frequentemente, una combinazione di questi sintomi.

La malattia è a trasmissione autosomica recessiva (entrambi i genitori devono essere portatori e trasmettere il gene mutato al figlio). La causa, generalmente, è da ascrivere alla mutazione del gene GBA posto sul braccio lungo del cromosoma 1 che determina la produzione di un enzima deficitario o mal funzionante, ma è noto che la patologia può essere causata anche dalla carenza di una proteina attivatrice, la saposina C, che si lega alla glucocerebrosidasi agevolando l'idrolisi della glucosilceramide (7).

In queste malattie, a causa di un difetto genetico che altera specifici enzimi, i lisosomi non svolgono il compito di neutralizzare le sostanze di scarto che si accumulano nelle cellule, danneggiandole irreversibilmente. Studiando il funzionamento dei lisosomi è stato scoperto che questi organelli sono dei fini regolatori del metabolismo. Infatti, è stato descritto un nuovo meccanismo secondo cui i lisosomi possono fornire alla cellula l'energia necessaria a crescere e proliferare adattandosi alle condizioni ambientali.

Recentemente è stato anche scoperto che questa funzione lisosomiale è regolata da una rete di geni, detti CLEAR (Espressione e Regolazione Lisosomiale Coordinata), attivati da uno specifico fattore di trascrizione, il TFEB.

Il TFEB fa parte di un complesso proteico, il LYNUS (LYsosome NUtrient Sensing), che comprende anche mTORC1 (bersaglio della rapamicina nei mammiferi) ed è legato alla membrana lisosomiale. Questo complesso è in grado di rilevare il contenuto di nutrienti nei lisosomi e inviare segnali al nucleo: in presenza di nutrienti, mTORC1 fosforila TFEB che diventa inattivo nel citoplasma. Di conseguenza, questa via metabolica viene inibita.

Quando invece ci sono poche risorse nutritive a disposizione (digiuno o prolungato esercizio fisico), il TFEB viene defosforilato dalla calcineurina, trasloca nel nucleo e regola l'espressione di vari geni correlati all'autofagia, alla β -ossidazione degli acidi grassi ed alla biogenesi lisosomiale.

Nelle cellule tumorali non c'è alternanza tra queste due fasi e ciò consente alle cellule tumorali di crescere e proliferare a dismisura.

Se il sistema di regolazione TFEB rimane sempre acceso, le cellule iniziano a proliferare in modo indiscriminato. In particolare, diversi tipi di cellule tumorali (melanoma, tumore del rene e del pancreas) sono in grado di replicarsi proprio perché questo sistema di regolazione "anti-spreco" è sempre attivo.

In aggiunta, si è visto che bloccando l'azione di TFEB in modelli di laboratorio si riesce a bloccare la crescita tumorale. L'attivazione del TFEB sembra essere una risposta allo stress lisosomiale; questa segnalazione dal lisosoma al nucleo consente ai lisosomi di adattarsi a diverse condizioni fisiologiche e patologiche (8).

Nelle LSD, ad esempio, la carenza di α -L-iduronidasi nella mucopolisaccaridosi di tipo I destabilizza l'omeostasi lisosomiale di Ca^{2+} e H^+ , portando alla permeabilizzazione della membrana lisosomiale che innesca diverse cascate patogeniche.

Inoltre, in molte LSD è stato descritto un blocco dell'autofagia, poiché la fusione lisosoma-autofagosoma è compromessa a causa della disfunzione lisosomiale.

L'insieme di queste alterazioni lisosomiali nelle LSD può essere considerato come uno stress lisosomiale cronico, probabilmente associato a cambiamenti nella segnalazione del TFEB e nella regolazione dei geni della rete CLEAR.

L'espressione di ciascun gene CLEAR può essere regolata da diversi microRNAs e/o da altri RNAs non codificanti (ncRNAs), aumentando la complessità del sistema.

I microRNAs (miRs) sono piccole molecole di RNA non codificante (ncRNA) formate da 22-24 nucleotidi che legandosi al 3'UTR di un gene target ne inibiscono l'espressione. Numerosi dati presenti in letteratura dimostrano le molteplici funzioni dei miRs sia in condizioni fisiologiche che patologiche (9).

Per l'espressione dei geni CLEAR è richiesto il legame diretto del TFEB ad un sito regolativo di 10 basi trovato nei promotori di diversi geni che codificano per enzimi lisosomiali. L'espressione di TFEB viene inibita da un microRNA (*miR-128*), sottolineando l'importanza di queste molecole per la regolazione dell'espressione dei geni CLEAR e, di conseguenza, della funzione lisosomiale.

Pertanto, poiché la funzione lisosomiale dipende da questa rete genica, sembra molto probabile che *miR-128* svolga un ruolo importante nell'espressione dei geni lisosomiali, modulando l'insorgenza della malattia, la gravità e la progressione.

Obiettivi

I: Lo scopo di questo progetto è quello di studiare un'eventuale correlazione tra le LSD e il cancro investigando su possibili funzioni alternative dei geni causativi della LSD nella patogenesi del cancro, poiché l'analisi Gene Ontology (GO) ha mostrato che sono coinvolti in numerosi altri processi biologici.

Inoltre, considerando le molteplici funzioni dei miRs e alla luce delle evidenze sperimentali che indicano che nel plasma di pazienti affetti da LSD sono presenti miRs differenzialmente espressi rispetto ai controlli, un altro obiettivo del progetto è quello di investigare il possibile ruolo di questi miRs nella patogenesi del cancro.

Nell'era della medicina di precisione assume un ruolo rilevante la biopsia liquida, per cui il nostro scopo è anche quello di individuare, possibilmente nelle vescicole extracellulari (EVs), miRs selezionati che potrebbero essere utilizzati come marcatori precoci di insorgenza di tumori nei pazienti affetti da LSD.

Le EVs sono state scoperte circa 30 anni fa come dispositivi per eliminare il recettore della transferrina nella maturazione degli eritrociti (10). Nell'ultimo ventennio hanno suscitato l'interesse della comunità scientifica per il loro ruolo pleiotropico sia in processi fisiologici che patologici (11). Nel campo oncologico, lo studio delle EVs ha permesso di individuare nuovi pathways molecolari che hanno contribuito alla conoscenza dei diversi processi coinvolti nella progressione tumorale (12,13).

Ad oggi pochi sono gli studi che dimostrano il ruolo delle vescicole nell'ambito delle LSD, ma è un campo in continua crescita. L'utilizzo delle EVs permette di testare i miRs che vengono rilasciati nel plasma dalle cellule grazie ad un processo di secrezione selettivo e non aspecifico. In più, la presenza nelle EVs della membrana plasmatica favorisce l'integrità dei miRs nel torrente circolatorio. Questo permette di rilevare anche miRs presenti in piccole quantità.

II: I nostri dati preliminari hanno mostrato che una piccola percentuale di pazienti affetti da malattia di Fabry, con mutazioni nel gene *GLA*, hanno sviluppato carcinoma del colon.

E' stato anche descritto che i pazienti affetti da malattia di Fabry, che hanno mutazioni patogenetiche nel gene *GLA*, sono caratterizzati da un profilo specifico di 10 miRs che li differenzia da soggetti sani indipendentemente dal tipo di mutazione, sesso ed età. E' stato visto che 4 miRs (*miR-126-3p*, *miR-199a-5p*, *miR-451a* e *miR-423a-5p*) sono differenzialmente espressi in maniera significativa nei pazienti FD e in particolare *miR-126-3p* e *miR-199a-5p* sono presenti in livelli superiori in FD rispetto ai controlli negativi (14). Numerose evidenze sperimentali indicano il ruolo di questi 2 miRs nell'infiammazione e nel cancro. Alti livelli di questi due miRs permettono un'accurata identificazione dei pazienti FD e, allo stesso tempo, possono essere utili per monitorare la risposta alla terapia.

Il nostro obiettivo è quello di studiare le eventuali alterazioni del gene *GLA* in pazienti affetti da tumori e i miRs eventualmente contenuti nelle EVs rilasciate nel plasma dei pazienti, già descritti come differenzialmente espressi nei soggetti affetti dalla malattia di Fabry, allo scopo di valutare un loro possibile ruolo anche nell'evoluzione in patologie oncologiche e il loro eventuale valore predittivo.

Un unico studio presente in letteratura propone anche i miRs circolanti come potenziali marcatori della gravità della malattia di Pompe e della risposta alla terapia. Sono stati analizzati per NGS i miRs presenti nel plasma di pazienti affetti dalla malattia di Pompe, con lo scopo di individuare nuovi biomarcatori per il monitoraggio delle condizioni cliniche dei pazienti e della risposta alla terapia (15).

Un'analisi preliminare ha mostrato che nel plasma di 6 pazienti erano presenti 55 miRs differenzialmente espressi, tutti coinvolti nella modulazione dell'espressione di geni coinvolti in pathways rilevanti nella malattia di Pompe. Tra questi miRs il *miR-133-a* ha mostrato alti livelli di espressione nel plasma di 52 pazienti affetti dalla malattia.

Il nostro obiettivo è quello di studiare la possibile correlazione di questi miRs e il cancro.

Anche per la malattia di Gaucher, una LSD relativamente frequente causata dalla carenza di glucocerebrosidasi lisosomiale (*Gba*), un enzima codificato da *GBA1*, è stato effettuato uno screening dei miRs coinvolti nella modulazione del *Gba*. Sono stati individuati 2 miRs che inibiscono fortemente l'espressione *GBA1* e 3 miRs (*miR-127-5p*, *miR19a-5p* e *miR-1262*) che inibiscono l'espressione di *SCARB2*, un importante recettore di membrana coinvolto nell'attività del *Gba* (16).

Poiché dati di letteratura indicano una correlazione tra la malattia di Gaucher ed il mieloma multiplo (17), l'obiettivo del progetto è anche quello di valutare il ruolo di questi miRs nell'insorgenza del mieloma.

Materiali e metodi

Lo studio dei geni GLA, GAA e GBA causativi rispettivamente della malattia di Fabry, Pompe e Gaucher, verrà effettuato su 3 gruppi di individui:

- 1) 50 controlli sani;
- 2) 50 pazienti affetti da LSD;
- 3) 50 pazienti affetti da tumore.

Quest'ultimi verranno reclutati grazie alla collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Antonio Russo del Dipartimento DICHIRONS dell'Università di Palermo. I pazienti affetti da LSD, invece, verranno reclutati tra i soggetti che arrivano all'attenzione del gruppo di ricerca del Prof. Duro del centro di ricerca e diagnosi dell'IRIB, CNR di Palermo.

Sui campioni appartenenti ai 3 gruppi verrà effettuato un sequenziamento Sanger dei geni GLA, GAA e GBA e l'analisi delle sequenze per l'individuazione delle mutazioni.

Inoltre, con la tecnologia NGS, verrà studiato un pannello di geni implicati sia nelle LSD sia nei pazienti affetti da LSD che in quelli affetti da cancro, in modo da individuare eventuali mutazioni presenti in entrambe le coorti di pazienti che permetterebbero di far luce sul contributo di queste specifiche mutazioni nella correlazione tra LSD e cancro.

Per quanto riguarda l'analisi dei miRs presenti nelle vescicole extracellulari rilasciate nel plasma, lo studio verrà effettuato sui 3 gruppi di individui. Le vescicole verranno isolate dal plasma con kits commerciali che permettono di lavorare con piccoli volumi di sangue. Dalle vescicole verranno purificati i miRs e analizzati mediante l'utilizzo di *cards* con cui è possibile testare un pannello di miRs selezionati, allo scopo di comprendere se i miRs già descritti come differenzialmente espressi nei pazienti LSD rispetto ai controlli possono essere riscontrati anche nei pazienti affetti da tumore.

Risultati attesi

Lo scopo del progetto è quello di comprendere se le mutazioni riscontrate nei gene causativi di LSD si ritrovano anche nei soggetti affetti da cancro.

L'individuazione di eventuali mutazioni nei gene GLA, GAA, GBA responsabili delle 3 LSD prese in considerazione potrebbe rappresentare un passo avanti nella comprensione dei meccanismi sottesi alla patogenesi delle 3 malattie da accumulo lisosomiale e alla loro eventuale evoluzione verso patologie oncologiche. Con l'ausilio di specifici *tools* informatici verranno effettuati studi di correlazione tra le mutazioni e il loro possibile coinvolgimento nel cancro, allo scopo di individuare un ruolo di tali geni nell'insorgenza dei tumori.

Inoltre, individuare nelle EVs di pazienti con LSD dei miRs predittivi dello sviluppo di un tumore potrebbe essere di grande aiuto per seguire la storia clinica dei pazienti affetti da LSD che, essendo malattie degenerative, portano sicuramente ad una prognosi infausta per i pazienti.

3 - Bibliografia / References

1. Boustany RM. *Lysosomal storage diseases--the horizon expands*. Nat Rev Neurol. 2013 Oct;9(10):583-98. doi: 10.1038/nrneuro.2013.163.
2. Schneider JL, Cuervo AM. *Autophagy and human disease: emerging themes*. Curr Opin Genet Dev. 2014.
3. Duro G, Zizzo C, Cammarata G, Burlina A, Burlina A, Polo G, Oliveri R, Sciarrino S, Francofonte D, Alessandro R, Pisani A, Palladino G, Napoletano R, Tenuta M, Masarone D, Limongelli G, Riccio E, Frustaci A, Chimenti C, Ferri C, Pieruzzi F, Pieroni M, Spada M, Castana C, Caserta M, Monte I, Rodolico MS, Feriozzi S, Battaglia Y, Amico L, Losi MA, Autore C, Lombardi M, Zoccali C, Testa A, Postorino M, Mignani R, Zachara E, Giordano A, Colomba P. *Mutations in the GLA Gene and LysoGb3: Is It Really Anderson-Fabry Disease?* Int J Mol Sci. 2018 Nov 23;19(12). pii: E3726. doi: 10.3390/ijms19123726.
4. Mahmud HM. *Fabry's disease a comprehensive review on pathogenesis, diagnosis and treatment*. J Pak Med Assoc. 2014 Feb;64(2):189-94.
5. Kohler L, Puertollano R, Raben N. *Pompe Disease: From Basic Science to Therapy*. Neurotherapeutics. 2018 Oct;15(4):928-942. doi: 10.1007/s13311-018-0655-y.
6. Chan J, Desai AK, Kazi ZB, Corey K, Austin S, Hobson-Webb LD, Case LE, Jones HN, Kishnani PS. *The emerging phenotype of late-onset Pompe disease: A systematic literature review*. Mol Genet Metab. 2017 Mar;120(3):163-172.
7. Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, Levade T, Astudillo L, Serratrice J, Brassier A, Rose C, Billette de Villemeur T, Berger MG. *A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments*. Int J Mol Sci. 2017 Feb 17;18(2). pii: E441. doi: 10.3390/ijms18020441.
8. Di Malta C, Siciliano D, Calcagni A, Monfregola J, Punzi S, Pastore N, Eastes AN, Davis O, De Cegli R, Zampelli A, Di Giovannantonio LG, Nusco E, Platt N, Guida A, Ogmundsdottir MH, Lanfrancone L, Perera RM, Zoncu R, Pelicci PG, Settembre C, Ballabio. *A Transcriptional activation of RagD GTPase controls mTORC1 and promotes cancer growth*. 2017.
9. Queiroz MT, Pereira VG, do Nascimento CC, D'Almeida V. *The Underexploited Role of Non-Coding RNAs in Lysosomal Storage Diseases*. 2016.
10. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. *Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)*. J Biol Chem. 1987;262(19):9412-20.

11. Tkach M, They C. *Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go*. Cell. 2016;164(6):1226–32.
12. Pucci M, Reclusa Asiáin P, Duréndez Sáez E, Jantus-Lewintre E, Malarani M, Khan S, Fontana S, Naing A, Passiglia F, Rolfo C, Taverna S. *Exosomes as miRNA nano-shuttles: dual role in tumor progression*. Targeted Oncology (2018).
13. Reclusa P., Taverna S, Pucci M., Durendez E, Calabuig S, Manca P, Serrano MJ, Sober L, Pauwels P, Russo P., Rolfo C. *Exosomes as diagnostic and predictive biomarkers in lung cancer*. Journal of Thoracic Disease (2017).
14. Cammarata G, Scalia S, Colomba P, Zizzo C, Pisani A, Riccio E, Montalbano M, Alessandro R, Giordano A, Duro G. *A pilot study of circulating microRNAs as potential biomarkers of Fabry disease*. Oncotarget. 2018 Jun 8;9(44):27333-27345.
15. Tarallo A, Carissimo A, Gatto F, Nusco E, Toscano A, Musumeci O, Coletta M, Karali M, Acampora E, Damiano C, Minopoli N, Fecarotta S, Della Casa R, Mongini T, Vercelli L, Santoro L, Ruggiero L, Deodato F, Taurisano R, Bembi B, Dardis A, Banfi S, Pijnappel WWP, van der Ploeg AT, Parenti G. *MicroRNAs as biomarkers in Pompe disease*. Genet Med. 2019 Mar;21(3):591-600. doi: 10.1038/s41436-018-0103-8. Epub 2018 Jul 12.
16. Siebert M, Westbroek W, Chen YC, Moaven N, Li Y, Velayati A, Saraiva-Pereira ML, Martin SE, Sidransky E. *Identification of miRNAs that modulate glucocerebrosidase activity in Gaucher disease cells*. RNA Biol. 2014;11(10):1291-300.
17. Costello R1, O'Callaghan T, Sébahoun G. *Gaucher disease and multiple myeloma*. 2006.