

VU Research Portal

Alternative splicing in acute leukemia-relevance in treatment response

Wojtuszkiewicz, A.M.

2016

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Wojtuszkiewicz, A. M. (2016). *Alternative splicing in acute leukemia-relevance in treatment response*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

STRESZCZENIE

Wstęp

Nowotwory to grupa ponad 100 różnych schorzeń, charakteryzujących się abnormальnym wzrostem komórek różnych tkanek. Podczas gdy podziały zdrowych komórek w naszym ciele podlegają ścisłej kontroli, w przypadku nowotworów komórkom udaje się uniknąć tego nadzoru, w wyniku czego zaczynają się dzielić w sposób niekontrolowany. Ten nieokiełznany potencjał replikacyjny prowadzi ostatecznie do zajęcia zdrowych tkanek przez komórki nowotworowe, które często posiadają zdolność do rozprzestrzeniania się i atakowania innych tkanek w ciele.

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL – z ang. acute lymphoblastic leukemia) jest nowotworem szpiku kostnego, w którym transformacji nowotworowej podlegają niedojrzałe stadia limfocytów – rodzaju białych krwinek, które stanowią nasz układ immunologiczny. W białaczce limfocyty dzielą się w sposób niekontrolowany i gromadzą się w szpiku kostnym, zaburzając jego prawidłowe funkcjonowanie. ALL stanowi około 25% wszystkich nowotworów diagnozowanych u dzieci poniżej piętnastego roku życia, podczas gdy szczyt zapadalności na ALL przypada na drugi - trzeci rok życia. Wyniki leczenia dzieci z ALL uległy poprawie w ciągu ostatnich paru dekad – prawdopodobieństwo pięcioletniego przeżycia bez powikłań (EFS – z ang. event-free survival) sięga obecnie nawet 85%. Pomimo tego osiągnięcia, wciąż u około 20% dzieci z ALL pojawiają się nawroty, które wiążą się z bardzo niekorzystną prognozą. Oporność komórek nowotworowych na chemioterapię wciąż stanowi jedną z największych przeszkód dla skutecznego leczenia i dlatego też mechanizmy leżące u podłoża tego zjawiska wymagają dalszych badań. Najnowsze odkrycia sugerują, że splicing prekursorowego matrycowego RNA (pre-mRNA – z ang. precursor messenger ribonucleic acid) – jeden z niezbędnych etapów ekspresji genów – może przyczyniać się do patogenezy jak i oporności na terapię nowotworów układu krwionośnego. Jednocześnie splicing pre-mRNA może potencjalnie służyć jako nowy marker prognostyczny w leczeniu tego typu nowotworów. W związku z tym, w obrębie niniejszej pracy doktorskiej postawiliśmy sobie za cel zbadanie istotności splicingu alternatywnego w ostrej białaczce, w tym roli tego procesu w oporności komórek na chemioterapię oraz nowatorskich strategii leczenia opartych na inhibicji spliceosomu – skomplikowanej maszynie składającej się z RNA i białek, która katalizuje proces splicingu pre-mRNA.

Splicing pre-mRNA w nowotworach

W porównaniu do innych etapów ekspresji genów, splicing pre-mRNA jest relatywnie mało poznany zarówno pod względem mechanizmu działania jak i roli jaką odgrywa w nowotworach. Ostatnie lata przyniosły ze sobą rosnącą liczbę publikacji w zakresie obu wyżej wspomnianych zagadnień. W **rozdziale 2** niniejszej pracy doktorskiej omówiliśmy obszernie molekularne mechanizmy leżące u podłoża splicingu oraz bieżące odkrycia na temat aberracji w procesie splicingu związanych z patogenezą nowotworów jak i również strategii terapeutycznych wycelowanych w spliceosom. Wzięliśmy pod uwagę niedawno zidentyfikowane w komórkach nowotworowych mutacje, zlokalizowane w genach kodujących różne komponenty spliceosomu (np. SF3B1 i U2AF1) oraz ich potencjalne użycie w roli markerów prognostycznych w terapii nowotworów, szczególnie układu krwionośnego. Ponadto omówiliśmy wpływ aberracji w splicingu na oporność na chemioterapeutyki, skupiając się na genach związanych z metabolizmem leków oraz regulacją apoptozy (programowej

1

2

3

4

5

6

7

8

9

&

śmierci komórki). Choć rola splicingu w regulacji apoptozy jest dość dobrze udokumentowana, jak się to dokładnie przekłada na oporność białaczek na chemioterapię pozostaje niejasne. Co więcej, aberracje w splicingu pewnej liczby genów zaangażowanych w metabolizm leków przeciwko ALL oraz innemu rodzajowi białaczki – ostrej białaczce mieloblastycznej (AML – z ang. acute myeloid leukemia) – mogą prowadzić do obniżonej aktywności anty-nowotworowej chemioterapeutyków. W tym względzie zostało udowodnione, że aberracje w splicingu syntetazy foliopoliglutaminianowej (FPGS z ang. folylpolyglutamate synthetase) mogą być powodem oporności na metotreksat (MTX) u dorosłych z ALL. MTX – antagonistą kwasu foliowego – nieprzerwanie stanowi niezbędny filar leczenia ALL, stosowany w profilaktyce nawrotów w obrębie ośrodkowego układu nerwowego oraz w trakcie leczenia podtrzymującego. Efektywność metotreksatu jest wysoce zależna od aktywności enzymu FPGS, który katalizuje przekształcenie MTX w jego pochodne poliglutaminowe (stopniową addycję reszt glutaminowych), przez co promuje retencję tego antymetabolitu w przestrzeni wewnątrzkomórkowej oraz potęguje jego potencjał w kierunku inhibicji docelowych enzymów. Ponieważ MTX okazał się bardzo istotnym elementem leczenia ALL, dalsze badania nad mechanizmami oporności na ten lek mogą pomóc udoskonalić wyniki leczenia pacjentów z ALL.

Oporność na MTX i aberracje w splicing mRNA genu FPGS

Podczas gdy wiele molekularnych mechanizmów oporności na MTX zostało obszernie scharakteryzowanych *in vitro*, ich znaczenie w leczeniu klinicznym pozostaje niejasne. W **rozdziale 3** rozpatrzyliśmy podstawę oporności na MTX w grupie 235 dzieci z ALL, dla których były dostępne dane kliniczne z długoterminową kontrolą zdrowia pacjentów. Analizowane próbki, pobrane na etapie diagnozy pacjentów, były również obszernie scharakteryzowane pod względem parametrów związanych z opornością na MTX; w tym poziom poliglutaminowych pochodnych MTX w komórkach białaczkowych, wrażliwość na MTX opartą na poziomie inhibicji jednego z enzymów docelowych tego leku – syntazy tymidylanowej (TS – z ang. thymidylate synthase) oraz analiza aktywności enzymatycznej FPGS. Dodatkowo zmierzaliśmy poziom ekspresji mRNA genów zaangażowanych w metabolizm (FPGS, TS, FPGH – hydrolaza foliopoliglutaminianowa, DHFR – reduktaza dihydrofolianowa) oraz transport do wnętrza komórki (RFC – przenośnik zredukowanych folianów) kwasu foliowego oraz MTX. Poszerzając dotychczasowe obserwacje, nasza analiza wykazała, że wysoki poziom akumulacji długo-łańcuchowych poliglutaminowych pochodnych MTXu w komórkach białaczkowych był silnie związany z dłuższym przeżyciem pacjentów z ALL. Podobny związek zaobserwowaliśmy dla ogólnego stężenia wszystkich poliglutaminowych pochodnych MTXu oraz aktywności katalitycznej enzymu FPGS. Co więcej, w naszej analizie aktywność enzymu FPGS okazała się najlepszym wyznacznikiem oporności na MTX (opartej na analizie inhibicji enzymu TS – TSIA – z ang. thymidylate synthase inhibition assay), podkreślając jej istotność w kontekście klinicznym.

Wyniki niedawnych badań wykazały, że nieprawidłowy splicing mRNA genu FPGS może przyczyniać się do oporności na MTX u dorosłych pacjentów z ALL. W **rozdziale 4** scharakteryzowaliśmy aberracje zachodzące w splicingu mRNA genu FPGS w próbkach pobranych zarówno od dorosłych pacjentów jak i dzieci z ALL, oraz rozważyliśmy ich konsekwencje dla funkcji enzymu FPGS oraz oporności na MTX u linii komórkowych. Występowanie aberracji w splicingu mRNA genu FPGS było najpierw zbadane we wstępnej grupie pacjentów z ALL z użyciem analizy opartej na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR z ang. polymerase chain reaction), obejmującej całą długość

sekwencji mRNA genu FPGS. Ten kompleksowy screening w poszukiwaniu różnych wariantów splicingowych wykazał istnienie bogactwa aberracji w splicingu genu FPGS w próbkach pobranych od dzieci z ALL, wykraczającego poza początkowe oczekiwania. Wpływ wykrytych aberracji na strukturę i funkcjonowanie enzymu FPGS został zbadany przy użyciu trójwymiarowego modelowania struktury białka FPGS oraz analizy aktywności tego białka *in vitro*. Ponadto, opisaliśmy zmiany w splicingu genu FPGS wywołane działaniem MTX oraz innych chemioterapeutyków. Badania te wykazały, że transkrypty genu FPGS zawierające aberracje splicingowe skutkują zaburzeniami w funkcji tego genu. Najistotniejszym wariantem splicingowym okazała się częściowa retencja intronu 8 (8PR), występująca we wszystkich badanych próbkach. Poziom tego wariantu mRNA genu FPGS był szczególnie modulowany pod wpływem działania MTX w linii komórkowej ludzkiej białaczki (CCRF-CEM/R30dm), charakteryzującej się opornością na MTX w powiązaniu z obniżoną aktywnością enzymu FPGS. Efekt ten nie występował w linii komórkowej CCRF-CEM wrażliwej na MTX. Obserwacja ta sugeruje, że dynamiczne zmiany w splicingu mRNA genu FPGS mogą ułatwiać komórkom białaczki przeżycie pod presją wywołaną działaniem anty-folanów.

W celu weryfikacji naszych obserwacji *in vivo*, zbadaliśmy następnie występowanie aberracji w splicingu mRNA genu FPGS w większej grupie dzieci z ALL (91 pacjentów), a następnie przeanalizowaliśmy relacje pomiędzy tym zjawiskiem a opornością na MTX oraz długoterminowymi wynikami leczenia. Poziom aberracji w splicingu mRNA genu FPGS został zmierzony w sposób ilościowy przy użyciu PCRu w połączeniu z analizą fragmentów DNA (**rozdział 5**). Dodatkowo, dla badanych próbek dostępne były dane odnośnie oporności na chemioterapeutyki i niżej MTX (w oparciu o test cytotoksyczności – MTT assay). Ponieważ splicing mRNA wielu genów w komórce regulowany jest przez te same białka splicingowe, zadaliśmy dodatkowo pytanie czy aberracje w splicingu mRNA genu FPGS mogą odzwierciedlać szeroko pojęty defekt w samej maszynerii katalizującej splicing, potencjalnie powodując oporność wielolekową. Potwierdzając nasze obserwacje *in vitro*, wariant 8PR okazał się najbardziej istotnym wariantem splicingowym genu FPGS wykrytym w naszym screeningu u dzieci z ALL. W podgrupie pacjentów z suboptymalnym poziomem akumulacji długo-łańcuchowych postaci MTXu wysoki poziom wariantu splicingowego 8PR genu FPGS był wyznacznikiem gorszej przeżywalności. Relacja pomiędzy wariantem splicingowym 8PR genu FPGS i przeżywalnością była istotna statystycznie również w analizie wieloczynnikowej, w której uwzględnione były znane czynniki prognostyczne takie jak liczba białych krwinek, linia, z której wywodzą się komórki białaczkowe oraz wiek w momencie diagnozy. Co ciekawe, w tej podgrupie pacjentów, wysoki poziom wariantu splicingowego 8PR genu FPGS korelował z podwyższoną opornością na MTX, w oparciu o analizę poziomu inhibicji TS, oraz obniżoną akumulację długo-łańcuchowych postaci MTXu. Zaskakująco, wysoki poziom wariantu splicingowego 8PR był także związany z opornością na glukokortykoidy. Co ważne odkryliśmy, że linia komórkowa ludzkiej białaczki oporna na MTX w powiązaniu z obniżoną aktywnością enzymu FPGS (CCRF-CEM/R30dm), charakteryzuje się wysokim poziomem wariantu splicingowego 8PR oraz, jednocześnie, znacząco wysoką opornością krzyżową na deksametazon (Dex - lek z rodziny glukokortykoidów stosowany w leczeniu ALL). Powyższe obserwacje sugerują, że aberracje w splicingu mRNA genu FPGS mogą stanowić odzwierciedlenie szerszego pojętego zjawiska wynikającego z defektu w maszynerii katalizującej splicing, wpływającego na wiele genów. Ta hipoteza wymaga dalszych badań oraz sugeruje, że pacjenci, wykazujący oporność lekową opartą na aberracjach w splicingu, mogą potencjalnie skorzystać na strategiach terapeutycznych modulujących splicing.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

&

Potencjał terapii ukierunkowanych na splicing

Obecnie istnieje już kilka terapii ukierunkowanych na splicing, w tym strategię mierzącą w konkretny cel (wariant splicingowy) oparte na użyciu oligonukleotydów oraz ogólna inhibicja spliceosomu przy zastosowaniu związków małocząsteczkowych. Te ostatnie czynniki terapeutyczne są obecnie głównie wycelowane w białko SF3B1 (z ang. splicing factor 3 subunit 1), stanowiące jedną z podstawowych podjednostek wchodzących w skład spliceosomu, i wykazały obiecujące wyniki w testach na guzach litych oraz przewlekłej białaczce limfatycznej (CLL – z ang. chronic lymphocytic leukemia).^{9–12} Bazując na powyższych obserwacjach, w ramach **rodziału 6** zbadaliśmy najpierw, przy użyciu dwóch inhibitorów spliceosomu – pladienolidu B (PB – z ang. pladienolide B) oraz meajamycyny B (MAMB – z ang. meayamycin B), czy splicing pre-mRNA stanowi użyteczny cel terapii również w ostrych białaczkach dziecięcych. Odpowiedź linii komórkowych białaczki na działanie obu leków była oszacowana na podstawie testu cytotoksyczności (MTT assay). Co ciekawe, linie komórkowe wywodzące się zarówno z ALL jak i AML były bardzo wrażliwe na działanie PB oraz MAMB już w bardzo niskich (nanomolarnych) stężeniach. Obserwowane zahamowanie wzrostu komórek było związane z zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazach G₁ i G₂/M oraz stymulacją apoptozy z jednoczesnymi zmianami w splicingu kilku genów regulujących apoptozę, w tym MCL-1 i BCL-X. Nawet linie komórkowe odporne na konwencjonalne chemioterapeutyki, w tym MTX, Dex, bortezomib oraz imatinib, pozostały wrażliwe na inhibitory podjednostki SF3B1. Zgodnie z naszymi modelami linii komórkowych białaczki *in vitro*, próbki pierwotne pobrane od dzieci zarówno z ALL jak i AML wykazały niebywala wrażliwość na PB oraz MAMB w teście cytotoksyczności, podczas gdy komórki (nienowotworowe) szpiku kostnego pobranego od zdrowych dzieci były istotnie mniej wrażliwe (choć nadal na nanomolarnie stężenia obu leków). Te odkrycia sugerują, że inhibitory podjednostki SF3B1 mogą być poddane dalszym badaniom jako nowa opcja terapeutyczna dla pacjentów charakteryzujących się oporną na leczenie chorobą. Nasze wyniki sugerują, że inhibicja spliceosomu może potencjalnie uwrażliwiać komórki białaczkowe pacjentów z ALL, charakteryzujące się opornością na Dex zależną od nadekspresji genu MCL-1L, na co wskazuje synergia pomiędzy oboma lekami w liniach komórkowych opornych na Dex. Te odkrycia *in vitro* powinny być potwierdzone w modelach mysich, przy uważnej ocenie potencjalnego toksycznego wpływu na zdrowe tkanki. Ponadto modulacja splicingu czynników regulujących apoptozę zachodząca pod wpływem inhibitorów podjednostki SF3B1 *in vivo* powinna być szczegółowo scharakteryzowana, jako że zarówno ekspresja jak i splicing czynników zaangażowanych w apoptozę zależy również od wpływu mikrośrodowiska.

Splicing alternatywny w komunikacji pomiędzy komórkami

Liczne badania wykazały, że oporność komórek białaczkowych na apoptozę w momencie diagnozy jest związana z wolnym od objawów chorobowych przeżyciem pacjentów z AML oraz jest zależna od czynników mikrośrodowiskowych, w tym obecności cytokin. W tym względzie, w **rozdziale 7** pokazaliśmy, że ekspresja białek regulujących apoptozę, w tym czynników anty-apoptotycznych BCL-2, MCL-1L, BCL-XL oraz pro-apoptotycznego białka BAX, w komórkach białaczkowych koreluje z ich ekspresją w normalnych limfocytach pobranych od pacjentów z AML. Ponadto hodowla komórek wrażliwych na apoptozę w bezpośrednim kontakcie z komórkami opornymi na apoptozę skutkowałą podwyższeniem ekspresji anty-apoptotycznego białka BCL-2 we wrażliwych komórkach. By uzyskać wgląd w czynniki potencjalnie pośredniczące w przekazywaniu oporności na

apoptozę pomiędzy komórkami, wykonaliśmy obszerną charakterystykę profilu białkowego całego sekretomu (całość czynników wydzielanych przez komórki) oraz oczyszczonych pęcherzyków lipidowych macierzy pozakomórkowej wydzielanych przez komórki białaczkowe odporne oraz wrażliwe na apoptozę. Co zaskakujące nasze wyniki wykazały, że pośród białek wydzielanych różnicowo przez komórki białaczkowe odporne na apoptozę, przeważają czynniki zaangażowane w splicing pre-mRNA, w przeciwieństwie do białek wydzielanych przez komórki wrażliwe na apoptozę. Co ciekawe, białka biorące udział w splicingu pre-mRNA znajdowały się również pośród czynników, które przeważały w egzozomach (rodzaj pęcherzyków lipidowych) wydzielanych przez komórki białaczkowe odporne na apoptozę w porównaniu do egzozomów komórek wrażliwych na apoptozę. Te obserwacje sugerują, iż komórki białaczkowe odporne na apoptozę wydzielają egzozomy niosące białka zaangażowane między innymi w splicing pre-mRNA i które mogą być odpowiedzialne za transfer profilu oporności do sąsiadujących wrażliwych komórek. Ten pogląd ma oparcie w analizie obrazów konfokalnych, demonstrujących pobór przez komórki wrażliwe na apoptozę pęcherzyków wydzielonych przez komórki odporne na apoptozę. Wpływ jaki ten proces wywiera na oporność na apoptozę w komórkach biorcach wymaga jednak dalszych badań. Transfer sieci białek zaangażowanych w globalną modulację ekspresji genów w pęcherzykach lipidowych, indukujący w komórkach biorcach profil oporności na leki to intrygujący koncept. Ostatecznie mógłby dostarczyć nowych biomarkerów oporności na leki/apoptozę, które mogłyby być wykrywane we krwi pacjentów z AML.

Wnioski

Całościowo, nasze wyniki wskazują, że aberacje w splicingu pre-mRNA są zjawiskiem bardzo istotnym dla różnych aspektów leczenia białaczki. Splicing alternatywny, w tym warianty splicingowe genu FPGS, mają wpływ na oporność na leki oraz odpowiedź komórek białaczkowych na leczenie kliniczne. Szerokie spektrum profili splicingowych wskazujących na oporność na leki wymaga dalszej charakterystyki w komórkach białaczek ALL i AML, w celu zastosowania uzyskanych informacji do klinicznego monitoringu reakcji komórek białaczkowych na leki. Głębszy wgląd w powyższe procesy może przyczynić się do opracowania nowatorskich terapii ukierunkowanych na defekty w splicingu lub na modulację tych defektów w celu uwrażliwienia opornych na leczenie komórek.

Kluczowe punkty

- Aberacje w splicingu pre-mRNA przyczyniają się do patogenezy oraz oporności na leki nowotworów krwi, w tym ostrych białaczek.
- Podwyższone stężenie wewnątrzkomórkowe długo-łańcuchowych pochodnych metotreksatu (MTX) oraz wysoka aktywność enzymu syntetazy foliopoliglutaminianowej (FPGS z ang. folylpolyglutamate synthetase) są kluczowymi czynnikami w wynikach długoterminowego leczenia dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL – z ang. acute lymphoblastic leukemia).
- Aberracje w splicingu mRNA genu FPGS występują powszechnie w ALL oraz skutkują nieproduktywnymi transkryptami lub białkami pozbawionymi aktywności enzymatycznej.
- Częściowa retencja intronu 8 genu FPGS jest związana z gorszymi wynikami leczenia u dzieci z ALL, charakteryzujących się obniżoną akumulacją poliglutaminowych pochodnych MTXu, oraz z opornością na deksametazon, co sugeruje szeroko pojęty defekt w splicingu.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

&

- Inhibitory spliceosomu posiadają potencjał jako nowe terapeutyki w leczeniu (lekoopornej) ALL oraz ostrej białaczki mieloblastycznej (AML), lecz możliwy wpływ toksyczny na zdrowe komórki szpiku kostnego wymaga dalszych badań.
- Oporne na apoptozę komórki białaczkowe pobrane od pacjentów z AML wydzielają egzozomy zawierające sieci białek regulatorowych, w tym czynniki splicingowe, które mogą być pobrane przez wrażliwe komórki oraz potencjalnie powodować oporność na apoptozę.

BIBLIOGRAFIA

1. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **2006**;354:166–78.
2. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* **2012**;120:1165–74.
3. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, Fangazio M, Vaisitti T, Monti S, Chiaretti S, Guarini A, Del Giudice I, Cerri M, Cresta S, Deambroggi C, Gargiulo E, Gattei V, Forconi F, Bertoni F, Deaglio S, Rabadan R, Pasqualucci L, Foà R, Dalla-Favera R, Gaidano G. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* **2011**;118:6904–8.
4. Hou H, Liu C, Kuo Y, Chou W. Splicing factor mutations predict poor prognosis in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **2016**; Published online Jan 24.
5. Wojtuszkiewicz A, Assaraf YG, Maas MJ, Kaspers GJL, Jansen G, Cloos J. Pre-mRNA splicing in cancer: the relevance in oncogenesis, treatment and drug resistance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2015**;11:673–89.
6. Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* **2011**;286:3177–84.
7. Stark M, Bram EE, Akerman M, Mandel-Gutfreund Y, Assaraf YG. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1/H2-dependent unsplicing of thymidine phosphorylase results in anticancer drug resistance. *J Biol Chem* **2011**;286:3741–54.
8. Stark M, Wichman C, Avivi I, Assaraf YG. Aberrant splicing of polyglutamate synthetase as a novel mechanism of antifolate resistance in leukemia. *Blood* **2009**;113:4362–9.
9. Larrayoz M, Blakemore SJ, Dobson RC, Blunt MD, Rose-Zerilli MJ, Walewska R, Duncombe A, Oscier D, Koide K, Forconi F, Packham G, Yoshida M, Cragg MS, Strefford JC, Steele AJ. The SF3B1 inhibitor spliceostatin A (SSA) elicits apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia cells through downregulation of Mcl-1. *Leukemia* **2016**;30:351–360.
10. Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Rosich L, Monraveta A, Roldan J, Rodriguez V, Villamor N, Aymerich M, Lagisetti C, Webb TR, Lopez-Otin C, Campo E, Colomer D. The splicing modulator sudemycin induces a specific antitumor response and cooperates with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **2015**;6:22734–49.
11. Gao Y, Koide K. Chemical perturbation of Mcl-1 pre-mRNA splicing to induce apoptosis in cancer cells. *ACS Chem Biol* **2013**;8:895–900.
12. Gao Y, Trivedi S, Ferris RL, Koide K. Regulation of HPV16 E6 and MCL1 by SF3B1 inhibitor in head and neck cancer cells. *Sci Rep* **2014**;4:6098.

