

Ejemplo comparación de resultados predictores in silico

Cambio de estudio CACNA1B c.2093-3C>A (chr 9:138010007 C/A o NM_000718.4: c.2093-3C>A)

Exón 17 e intrones adyacentes:

```
acagtcagcccgaaagagctgggttgggggaagaggctcaggtggcattagggggaggct
gggtgatgggaggctgagcaaaggaggattggcagagaggctggaggtaggatggaac
aggggctggagggcctagtggctgggctggagtggtgtctgggatggggccttggggag
ctggtaggtgccaagggaaggaggctggaggctgggtgggatctggggagatgggggaag
ctgcagtgtagctggggccatgtgggacagaggttcccttcctcagctggacccaacag
ACACTCTGCTGAATGCTTTCTGGCCATCGCTGTGGACAACCTGGCCAACGCCCAAGAGC
TGACCAAG
gtaggtggcgadagggaagggaacgggtgtcagcccatgtcacctgaatgtggcgcagcca
ggaagagctctgggtcctgggttagggcctcggtgtccaggagcggtgcttgggtcctggc
gggcagaggctggtctgtcactcaggggctggaggctggagctgaggatgcagggagagc
caaagccdcgaaggcagatggacaggcaggctctcagggaagcagcacagggaagaaag
gctgtaaaggcagggtgtgttgggagcaggaggggcttagcaggaggagcagctggtg
```

El cambio se encuentra en la tercera posición justo antes del exón 17 (la **c** en color verde).

Se va a obtener los resultados que produce analizar esta variable con los diferente predictores y ver cuál de ellos es más preciso.

NetGene2

Donor splice sites, direct strand

pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
108		1	+	0.47	GAGGCTGGAG	^	GTGAGGATGG	
184		0	+	0.45	TGGGGAGCTG	^	GAGGTGCCA	
369		0	+	1.00	GCTGACCAAG	^	GAGGTGGCG	H
373		1	+	0.19	ACCAAGGTAG	^	GTGGCGACAG	
376		1	+	0.06	AAGGTAGGTG	^	GCGACAGGGA	

Donor splice sites, complement strand

No donor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, direct strand

pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
270		1	+	0.20	TGTGGGGCAG	^	AGGTTCCCTT	
272		0	+	0.25	TGGGGCAGAG	^	GTTCCCTTCC	
286		2	+	0.76	CCTTCCTCAG	^	CTGGACCCAA	
300		1	+	0.45	ACCCAACCAG	^	ACACTCTGCT	
565		0	+	0.07	CCGAAGGCAG	^	ATGGACAGGC	
573		2	+	0.18	AGATGGACAG	^	GCAGGCTCTC	

Acceptor splice sites, complement strand

pos	3'→5'	pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
360		309		0	-	0.17	CCTTGGTCAG	^	CTCTGGGCG	
223		446		0	-	0.56	ATCTCCCCAG	^	ATCCCAACCA	

Donor splice sites, direct strand

pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
108		1	+	0.47	GAGGCTGGAG	^	GTGAGGATGG	
184		0	+	0.45	TGGGGAGCTG	^	GAGGTGCCA	
369		0	+	1.00	GCTGACCAAG	^	GAGGTGGCG	H
373		1	+	0.19	ACCAAGGTAG	^	GTGGCGACAG	
376		1	+	0.06	AAGGTAGGTG	^	GCGACAGGGA	

Donor splice sites, complement strand

No donor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, direct strand

pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
270		1	+	0.20	TGTGGGGCAG	^	AGGTTCCCTT	
272		0	+	0.31	TGGGGCAGAG	^	GTTCCCTTCC	
286		2	+	0.76	CCTTCCTCAG	^	CTGGACCCAA	
300		1	+	0.44	ACCCAACAAG	^	ACACTCTGCT	
565		0	+	0.07	CCGAAGGCAG	^	ATGGACAGGC	
573		2	+	0.18	AGATGGACAG	^	GCAGGCTCTC	

Acceptor splice sites, complement strand

pos	3'→5'	pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
360		309		0	-	0.17	CCTTGGTCAG	^	CTCTGGGCG	
223		446		0	-	0.56	ATCTCCCCAG	^	ATCCCAACCA	

El único cambio que hay entre las predicciones para la secuencia *wild type* frente a la secuencia mutante es que la predicción (en rojo) que corresponde con el sitio *acceptor* del exón cambia en la posición correspondiente a la mutación de interés, pero el sitio *acceptor* se sigue detectando por lo tanto no habrá cambios en el *splicing*.

Splice Site Prediction by Neural Network (NNSplice)

Donor site predictions for 10.42.3.123.415097.0 :

Start	End	Score	Exon	Intron
101	115	0.88	gctggag	gtgaggat
177	191	0.82	ggagctg	gtaggtgc
362	376	0.98	gaccaag	gtaggtgg

Donor site predictions for 10.42.0.139.415343.0 :

Start	End	Score	Exon	Intron
101	115	0.88	gctggag	gtgaggat
177	191	0.82	ggagctg	gtaggtgc
362	376	0.98	gaccaag	gtaggtgg

Acceptor site predictions for 10.42.3.123.415097.0 :

Start	End	Score	Intron	Exon
266	306	0.72	ggcagagggttccttcctc	agctggacccaaccagacactc


Acceptor site predictions for 10.42.0.139.415343.0 :

Start	End	Score	Intron	Exon
266	306	0.67	ggcagagggttccttcctc	agctggacccaacaagacactc

Spliceman

Point mutation	Wildtype (wt)	Mutation (mt)	L1 distance	Ranking (L1)
ccaac(c/a)agaca	ccagac	caagac	24974	42%

Human Splicing Finder

Type	Interpretation
 No significant impact on splicing signals.	No significant impact on splicing signals.

SVM-BPfinder

seq_id	agez	ss_dist	bp_seq	bp_scr	y_cont	ppt_off	ppt_len	ppt_scr	svm_scr		
wt	39	55	tcctcagct		0.742156096913	0.58	17	9	13	-0.075275426	
wt	39	28	tgctgaatg		1.50750334342	0.652173913043	2	19	26	1.3182851	
mut	38	54	tcctcagct		0.742156096913	0.571428571429	17	9	13	-0.078043732	
mut	38	27	tgctgaatg		1.50750334342	0.681818181818	2	19	26	1.3278593	

Variant Effect Predictor tool

ENST00000371363.5:c.2093-3C>A	9:138010007-138010007	A	splice_region_variant, intron_variant	CACNA1B	ENSG00000148408	Transcript	ENST00000277549.9	protein_coding	-	-	-	-	-	-	-
ENST00000371363.5:c.2093-3C>A	9:138010007-138010007	A	splice_region_variant, intron_variant	CACNA1B	ENSG00000148408	Transcript	ENST00000277551.6	protein_coding	-	-	-	-	-	-	-
ENST00000371363.5:c.2093-3C>A	9:138010007-138010007	A	splice_region_variant, intron_variant	CACNA1B	ENSG00000148408	Transcript	ENST00000371355.8	protein_coding	-	-	-	-	-	-	-
ENST00000371363.5:c.2093-3C>A	9:138010007-138010007	A	splice_region_variant, intron_variant	CACNA1B	ENSG00000148408	Transcript	ENST00000371357.5	protein_coding	-	-	-	-	-	-	-
ENST00000371363.5:c.2093-3C>A	9:138010007-138010007	A	splice_region_variant, intron_variant	CACNA1B	ENSG00000148408	Transcript	ENST00000371363.5	protein_coding	-	-	-	-	-	-	-
ENST00000371363.5:c.2093-3C>A	9:138010007-138010007	A	splice_region_variant, intron_variant	CACNA1B	ENSG00000148408	Transcript	ENST00000371372.6	protein_coding	-	-	-	-	-	-	-

ESEfinder

Se encuentran 3 predicciones con puntuaciones positivas para las matrices 3':

272 (-397)	ggttcoccttcctcagctggaccaaccagA	-6.14740	272 (-397)	ggttcoccttcctcagctggaccaaccagA	9.81710	272 (-397)	ggttcoccttcctcagctggaccaaccagA	-6.72550	272 (-397)	ggttcoccttcctcagctggaccaaccagA	9.78970
275 (-394)	tcoccttcctcagctggaccaaccagACAC	-17.39420	275 (-394)	tcoccttcctcagctggaccaaccagACAC	0.49940	275 (-394)	tcoccttcctcagctggaccaaccagACAC	-13.65550	275 (-394)	tcoccttcctcagctggaccaaccagACAC	-0.47290
286 (-383)	gctggaccaaccagACACTCTGCTGAATG	-11.54090	286 (-383)	gctggaccaaccagACACTCTGCTGAATG	0.89010	286 (-383)	gctggaccaaccagACACTCTGCTGAATG	-12.19690	286 (-383)	gctggaccaaccagACACTCTGCTGAATG	0.70600

Cuando se comparan con las predicciones equivalentes para la secuencia mutante, se observa que en todos los casos bajan, siendo el más destacado 286 qué pasa de una puntuación positiva a una negativa:

272 (-397)	ggttcccttctctcagctggaccaacaagA	-6.56750	272 (-397)	ggttcccttctctcagctggaccaacaagA	9.63360	272 (-397)	ggttcccttctctcagctggaccaacaagA	-7.26750	272 (-397)	ggttcccttctctcagctggaccaacaagA	9.59590
275 (-394)	tcccttctctcagctggaccaacaagACAC	-17.89230	275 (-394)	tcccttctctcagctggaccaacaagACAC	0.24150	275 (-394)	tcccttctctcagctggaccaacaagACAC	-14.34770	275 (-394)	tcccttctctcagctggaccaacaagACAC	-0.68700
286 (-383)	gctggaccaacaagACACTCTGCTGAATG	-12.04620	286 (-383)	gctggaccaacaagACACTCTGCTGAATG	-2.97830	286 (-383)	gctggaccaacaagACACTCTGCTGAATG	-12.63110	286 (-383)	gctggaccaacaagACACTCTGCTGAATG	-3.23440

Por lo tanto lo más probable es que se esté perdiendo un sitio *acceptor*, que puede tener efecto en el *splicing*.