

Ejemplo comparación de resultados predictores in silico

Cambio de estudio RBCK1 c.1452+35C>T (chr20:429129 C/T, COSV62293401 o NM_031229.4: c.1452+35C>T)

Exón 11 e intrones adyacentes:

```
ggtggaagggtggagaccacaggaatgaaaggggggttgctggatggagcctggcctggca
gagccacacaggagagactccacagctctagagggtcaaaccttctccctgccaatgggg
aggggccaggctgggtgactgccccagcccgccccagggccagcaacctgcctccactcca
g
GTGATGCTGACAGGCGAGGCCATGCGCTGCCCAAGTGCCAGATCGTGGTACAGAAG
AAGGACGGCTGCGACTGGATCGCTGCACCGTCTGCCACACCGAGATCTGCTGGGTCAAC
AAGGCCCAAGCTGGGGCCCTGGG
gtgagtcctttgctcgtgggtgggtgtggagagggtgccccttgttgggtttgctttagaggag
ggctgggaaaactacagcccatgggccaatcacaacccagcaccatgtattgtacagctc
ccgaggtaagaaatgttttttttttttttttgaacaggagtttcactcttgttgcccaggct
ggagtgaatagcacaaatctcagctcactgcaacctctgccttccgggttcaagcaattc
```

El cambio se encuentra en la primera línea del intrón 11 (la **c** en color granate).

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'
326		0	+	1.00	GGGCCCTGGG	^GTGAGTCTTT	H	
451		1	+	0.61	AGCTCCCAG	^GTAAGAATTT		

Donor splice sites, complement strand

pos	3'→5'	pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
176		390		2	-	0.06	ATCACCTGGA	^GTGGGCGAGG		
171		395		1	-	0.19	CTGGAGTGGG	^GCAGGTGCTG		

Acceptor splice sites, direct strand

pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
158		1	+	0.24	CCCCCCCCAG	^GGCCAGCACC		
164		1	+	0.25	CCAGGGCCAG	^CACCTGCCCC		
181		0	+	0.85	CCCACTCCAG	^GTGATGCTGC		
193		0	+	0.43	GATGCTGCAG	^CAGGGCGAGG		
196		0	+	0.34	GCTGCAGCAG	^GGCGAGGCCA		
202		0	+	0.31	GCAGGGCGAG	^GCCATGCGCT		

Acceptor splice sites, complement strand

pos	3'→5'	pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
337		229		0	-	0.07	CCACCACGAG	^CAAAGACTCA		
332		234		2	-	0.17	ACGAGCAAAG	^ACTCACCCCA		
321		245		1	-	0.19	CTCACCCAG	^GGCCCCAGCG		
313		253		0	-	0.25	AGGGCCCCAG	^CGTGGGCCCT		
292		274		0	-	0.32	GGTGACCCAG	^CAGATCTCGG		
289		277		0	-	0.25	GACCCAGCAG	^ATCTCGGTGT		
274		292		0	-	0.18	GGTGTGGCAG	^ACGGTGCAGC		
265		301		0	-	0.07	GACGGTGCAG	^CGGATCCAGT		
110		456		0	-	0.43	CCCATGGCAG	^GGAGAAGGTG		

Donor splice sites, direct strand

pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
326		0	+	1.00	GGGCCCTGGG	^GTGAGTCTTT	H	
451		1	+	0.61	AGCTCCCAG	^GTAAGAATTT		

Donor splice sites, complement strand

pos	3'→5'	pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
176		390		2	-	0.06	ATCACCTGGA	^GTGGGCGAGG		
171		395		1	-	0.19	CTGGAGTGGG	^GCAGGTGCTG		

Acceptor splice sites, direct strand

pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
158		1	+	0.24	CCCCCCCCAG	^GGCCAGCACC		
164		1	+	0.25	CCAGGGCCAG	^CACCTGCCCC		
181		0	+	0.85	CCCACTCCAG	^GTGATGCTGC		
193		0	+	0.43	GATGCTGCAG	^CAGGGCGAGG		
196		0	+	0.34	GCTGCAGCAG	^GGCGAGGCCA		
202		0	+	0.31	GCAGGGCGAG	^GCCATGCGCT		

Acceptor splice sites, complement strand

pos	3'→5'	pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
337		229		0	-	0.07	CCACCACGAG	^CAAAGACTCA		
332		234		2	-	0.17	ACGAGCAAAG	^ACTCACCCCA		
321		245		1	-	0.19	CTCACCCAG	^GGCCCCAGCG		
313		253		0	-	0.25	AGGGCCCCAG	^CGTGGGCCCT		
292		274		0	-	0.31	GGTGACCCAG	^CAGATCTCGG		
289		277		0	-	0.20	GACCCAGCAG	^ATCTCGGTGT		
274		292		0	-	0.18	GGTGTGGCAG	^ACGGTGCAGC		
265		301		0	-	0.07	GACGGTGCAG	^CGGATCCAGT		
110		456		0	-	0.43	CCCATGGCAG	^GGAGAAGGTG		

Splice Site Prediction by Neural Network (NNSplice)

Donor site predictions for WT :

Start	End	Score	Exon	Intron
175	189	0.80	actccag	gtgatgct
319	333	0.98	ccctggg	gtgagtct
444	458	1.00	tcccgag	gt aagaat

Donor site predictions for MUT :

Start	End	Score	Exon	Intron
175	189	0.80	actccag	gtgatgct
319	333	0.98	ccctggg	gtgagtct
444	458	1.00	tcccgag	gt aagaat

Acceptor site predictions for WT :

Start	End	Score	Intron	Exon
161	201	0.87	ccagcacctgccccactcc	aggtgatgctgcagcagggcga
360	400	0.75	cccttggtgggctttgcctt	agaggagggtgggaaaactac
482	522	0.75	agtttcactcttggtgccc	aggtggagtgcaatagcacia

Acceptor site predictions for MUT :


Start	End	Score	Intron	Exon
161	201	0.87	ccagcacctgccccactcc	aggtgatgctgcagcagggcga
360	400	0.68	tccttggtgggctttgcctt	agaggagggtgggaaaactac
482	522	0.75	agtttcactcttggtgccc	aggtggagtgcaatagcacia

El sitio *acceptor* se ve alterado por la presencia de la mutación. Esto hace que el *score* se reduzca, lo que hace menos probable que vaya a ser usado. Sin embargo, este sitio se encuentra dentro del intrón y no se emplea en el *splicing* normal, por lo que es probable que con la mutación tenga menos probabilidad de ser usado.

Spliceman

Point mutation	Wildtype (wt)	Mutation (mt)	L1 distance	Ranking (L1)
gggtg(c/t)ccttg	ggtgcc	ggtgtc	25672	47%

Human Splicing Finder

 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	13	70	gggtgagtc		-0.392748689262	0.446153846154	2	11	20	0.45181308					
WT	13	20	gccttagag		-2.06157661977	0.133333333333	15	0	0	-1.3118388					
MUT	13	70	gggtgagtc		-0.392748689262	0.446153846154	2	11	20	0.45181308					
MUT	13	20	gccttagag		-2.06157661977	0.133333333333	15	0	0	-1.3118388					

Variant Effect Predictor tool

ENST00000356286.9:c.1452+35C>T	20:429129-429129	T	intron_variant	RBCK1	ENSG00000125826	Transcript	ENST00000353660.7	protein_coding	-	-	-	-	-	-	COSV62293401
ENST00000356286.9:c.1452+35C>T	20:429129-429129	T	intron_variant	RBCK1	ENSG00000125826	Transcript	ENST00000356286.10	protein_coding	-	-	-	-	-	-	COSV62293401
ENST00000356286.9:c.1452+35C>T	20:429129-429129	T	intron_variant	RBCK1	ENSG00000125826	Transcript	ENST00000382181.2	protein_coding	-	-	-	-	-	-	COSV62293401
ENST00000356286.9:c.1452+35C>T	20:429129-429129	T	intron_variant, NMD_transcript_variant	RBCK1	ENSG00000125826	Transcript	ENST00000382214.7	nonsense_mediated_decay	-	-	-	-	-	-	COSV62293401
ENST00000356286.9:c.1452+35C>T	20:429129-429129	T	intron_variant, NMD_transcript_variant	RBCK1	ENSG00000125826	Transcript	ENST00000415942.5	nonsense_mediated_decay	-	-	-	-	-	-	COSV62293401
ENST00000356286.9:c.1452+35C>T	20:429129-429129	T	intron_variant, non_coding_transcript_variant	RBCK1	ENSG00000125826	Transcript	ENST00000468272.1	retained_intron	-	-	-	-	-	-	COSV62293401
ENST00000356286.9:c.1452+35C>T	20:429129-429129	T	downstream_gene_variant	RBCK1	ENSG00000125826	Transcript	ENST00000621487.1	retained_intron	-	-	-	-	-	-	COSV62293401
ENST00000356286.9:c.1452+35C>T	20:429129-429129	T	intron_variant	RBCK1	ENSG00000125826	Transcript	ENST00000640614.1	protein_coding	-	-	-	-	-	-	COSV62293401
ENST00000356286.9:c.1452+35C>T	20:429129-429129	T	regulatory_region_variant	-	-	RegulatoryFeature	ENSR000000642939	CTCF_binding_site	-	-	-	-	-	-	COSV62293401

ESEfinder

Se encuentran 3 predicciones con puntuaciones positivas en la secuencia WT para las matrices 5’Ss:

331 (-235)	tctttgctcgtggtggtggagaggggtgc	4.85610	331 (-235)	tctttgctcgtggtggtggagaggggtgc	-8.62450	331 (-235)	tctttgctcgtggtggtggagaggggtgc	5.03130	331 (-235)	tctttgctcgtggtggtggagaggggtgc	-10.30150
342 (-224)	ggtggtgtggagaggggtgcccttgtgggct	2.04110	342 (-224)	ggtggtgtggagaggggtgcccttgtgggct	-19.62930	342 (-224)	ggtggtgtggagaggggtgcccttgtgggct	2.14520	342 (-224)	ggtggtgtggagaggggtgcccttgtgggct	-17.91670
350 (-216)	ggagaggggtgcccttgtgggctttgcctta	3.67380	350 (-216)	ggagaggggtgcccttgtgggctttgcctta	-26.50810	350 (-216)	ggagaggggtgcccttgtgggctttgcctta	3.31750	350 (-216)	ggagaggggtgcccttgtgggctttgcctta	-28.40980

Si se comparan las puntuaciones con las equivalentes en la secuencia mutante, se observa que suben para las dos primeras y bajan para la última:

331 (-235)	tctttgctcgtggtggtggagaggggtgt	4.73140	331 (-235)	tctttgctcgtggtggtggagaggggtgt	-9.22540	331 (-235)	tctttgctcgtggtggtggagaggggtgt	4.76060	331 (-235)	tctttgctcgtggtggtggagaggggtgt	-10.88910
342 (-224)	ggtggtgtggagaggggtgtccttgtgggct	2.24470	342 (-224)	ggtggtgtggagaggggtgtccttgtgggct	-20.09340	342 (-224)	ggtggtgtggagaggggtgtccttgtgggct	2.26430	342 (-224)	ggtggtgtggagaggggtgtccttgtgggct	-18.36510
350 (-216)	ggagaggggtgtccttgtgggctttgcctta	3.25440	350 (-216)	ggagaggggtgtccttgtgggctttgcctta	-26.07910	350 (-216)	ggagaggggtgtccttgtgggctttgcctta	2.98660	350 (-216)	ggagaggggtgtccttgtgggctttgcctta	-28.01560

Esas variaciones de puntuaciones son muy pequeñas y tenemos resultados contradictorios, por lo que no podemos concluir nada, pero lo más probable es que la mutación no tenga efecto.