



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO FUNCIONAL DE MUTACIONES PUNTUALES
CON SIGNIFICADO CLINICO INCIERTO (VUS) SOBRE
EL *SPLICING* DEL GEN BRCA1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

MANUEL MISAEL COCA GONZALEZ



DIRECTOR DE TESIS:

DR. EDUARDO LOPEZ URRUTIA

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este proyecto fue elaborado en el Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM bajo la dirección del Dr. Eduardo López Urrutia

Este proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con la clave IA201216.

“Las palabras son, en mí no tan humilde opinión, nuestra más inagotable fuente de magia, capaces de infringir daño y de remediarlo.”

Albus Dumbledore

«El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. El no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir y señalar el camino».

Nikola Tesla

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a:

A mis padres quienes con su amor, trabajo, paciencia y esfuerzo me han permitido cumplir una meta más. Gracias por acompañarme durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento. Y en general a toda mi familia porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona.

Agradecimientos:

Al Dr. Eduardo Urrutia. Por ser un excelente tutor y amigo, siempre disponible y abierto a discutir cualquier resultado u opinión por simple que fuera, así como mostrar su apoyo y crítica a todas las ideas planteadas en beneficio del proyecto. Le agradezco haber compartido sus valiosos conocimientos y experiencia, además de brindarme excelentes consejos y charlas muy amenas, divertidas e interesantes. Por lo anterior es que se ha convertido en un ejemplo a seguir y en una de las personas que más admiro y respeto. Sin su guía no hubiera comprendido ni terminado este trabajo.

Al Dr. Carlos P. Por haberme dado la oportunidad de estar en su grupo de investigación y poder aprender lo que es trabajar en un laboratorio top, por permitirme usar sus recursos así como su infraestructura, por siempre mantenernos con los pies en la tierra y compartir su mentalidad ganadora.

A la Dra. Vero por su apoyo, sus conocimientos, sus regaños y sus valiosos consejos a lo largo de mi estadía en el laboratorio, que seguramente me ayudaran a desempeñarme en mi vida profesional.

Al Dr. Luis, a la Dra. Roció y al Mtro. Alejandro por leer y brindar sus valiosos consejos y observaciones a este trabajo.

Al Lic. Juan Esteban (Daniel Mc), por ser tan especial en mi vida, ya que además de servir como ejemplo e inspiración, me apoyo siempre y estuvo conmigo incondicionalmente cada que lo necesite. "Porque este es el primer viaje de muchos que haremos juntos".

A mis amigos: Barri (Edwin), Mayra, Josh (Daniel), Luis, Beto, Saúl, Ángel, Daniel, Yaz, por hacer parte de mi esencia, seguir compartiendo su amistad y siempre aceptar y/u ofrecer unos buenos tragos.

A mis amigos de universidad: Coch, Rosa, las Cebritas (Essika, Marisol, Giovanna, Nigte) Luis, Yael, Oscar y principalmente a la memoria de Kevin quien fue mi primer y mejor amigo de la U.

A mis compañeros, maestros y amigos de laboratorio: Los weritos (David, Luis), Sam, Mical, Jon, Jossimar, LuisMa, Osvaldo, Rebe, Izamari, Carlos, Dra. Gaby, Orco (David) y Héctor. Por apoyarme, escuchar mis problemas, quejas y por tener la paciencia de enseñarme y aconsejarme en cada experimento. Así como también por esos buenos tiempos en "Las clandes".

Contenido

Resumen.....	10
2. Introducción.....	11
2.1. Cáncer.....	11
2.2. Cáncer de mama.....	12
2.3. Cáncer de Mama y BRCA1	12
2.4. <i>Splicing</i>	16
2.5. Mutaciones en BRCA1	22
3. Hipótesis.....	24
4. Objetivos	25
4.1. General.....	25
4.2. Particulares	25
5. Materiales y métodos.....	26
5.1. Análisis <i>in silico</i>	26
5.2. Construcción de minigenes	26
5.3. Evaluación del <i>splicing</i>	31
6. Resultados	32
6.1. Predicciones y análisis <i>in silico</i>	32
6.2. Construcción de minigenes.....	36
6.3. Análisis de <i>splicing</i> por RT-PCR.....	39
7. Discusión.....	41
8. Conclusiones.....	46
9. Perspectivas	46
10. Bibliografía.....	47
11. Anexos.....	53

Lista de figuras.

1. BRCA1.....	13
2. Reparación de daño a DNA por recombinación homóloga.....	14
3. BRCA1 y su papel en la transcripción.....	15
4. Secuencias de reconocimiento para <i>splicing</i>	16
5. Bioquímica del <i>splicing</i>	17
6. <i>Splicing</i> y ensamble del spliceosoma.....	18
7. <i>Splicing</i> alternativo.....	19
8. Variantes de <i>splicing</i> alternativo.....	20
9. Regulación del <i>splicing</i> alternativo.....	21
10. Diseño y construcción de minigen.....	27
11. Overlap-Extension PCR.....	27
12. Condiciones de PCR de Extensión.....	29
13. Condiciones de PCR de ensamblaje.....	30
14. Esquema de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange (Agilent).....	31
15. PspI3+M. Esquema de plásmido con la construcción del minigen.....	32
16. Validación de secuencias canónicas de minigen c.19T>C con tres diferentes programas: SSP FLY, netgene2 y ASSP.....	34
17. Validación de secuencias canónicas de minigen c.4485-64C>G con tres diferentes programas: SSP FLY, netgene2 y ASSP.....	35
18. Reconocimiento y modificación de secuencias reguladoras de <i>splicing</i>	36
19. Geles de agarosa al 1% para verificar la amplificación y ensamblaje.....	37
20. Geles de agarosa al .8% para verificar las construcciones en pBluescript.....	37
21. Geles de agarosa al .8% para verificar las construcciones en pSPL3.....	38
22. Alineamiento de secuencias. Wild Type y Mutantes.....	39

23. Gel de agarosa al 1% con productos de RT-PCR de minigen c.-19T>C.....40

24. Gel de agarosa al 1% con productos de RT-PCR de minigen c.4485 C>G.....41

Lista de tablas.

1. Clasificación molecular del cáncer de mama.....12

2. Mutaciones de BRCA1.....26

3. Primers; secuencia y especificaciones.....28-29

Resumen.

Entre todos los tipos de cáncer, el cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad entre las mujeres de entre 25 y 60 años de edad en México. Alrededor del 10% de los casos de cáncer de mama comienzan con mutaciones en la línea germinal en los genes BRCA1 y BRCA2, que codifican proteínas que tienen papel clave en la reparación del daño del DNA. Estas mutaciones pueden ser perjudiciales como las de desplazamiento de marco de lectura o generación codones de paro prematuros. Sin embargo, también hay mutaciones cuyo efecto no es tan evidente o no se conoce -conocidas como variantes de significado clínico incierto, VUS- que aparentemente no alteran la función y estructura de la proteína, pero posiblemente pueden afectar procesos co-transcripcionales como el *splicing*. Este proceso depende del reconocimiento de secuencias por el spliceosoma y sus factores auxiliares para eliminar intrones y producir un mRNA maduro que se pueda traducir a una proteína funcional. En 2012, nuestro grupo realizó un estudio en 39 pacientes mexicanas para identificar mutaciones en BRCA1 y se encontraron 5 VUS, aquí analizamos *in silico* e *in vitro* el efecto en el *splicing* de dos mutaciones: c.-19 T>C y c.4485-64 C>G. Los análisis bioinformáticos mostraron que ninguna de ellas tiene repercusiones en el *splicing*; por lo tanto, construimos minigenes para obtener la validación funcional y comprobar si estas mutaciones tienen un efecto aberrante o nulo en el *splicing*. Finalmente, la mutación c.-19 T>C tubo un potencial efecto patogénico ya que indujo la transcripción de tres transcritos alternativos al propiciar el uso de tres sitios aceptores diferentes. Dos de estos transcritos conducen a la eliminación de 13 y 17 nucleótidos del transcrito original. Lo que podría tener efectos en la regulación de la traducción debido a que la pérdida de estos nucleótidos compromete la región 5'UTR. En el caso de la mutación c.4484-64 C>G no se notó cambio alguno por lo que la mutación no compromete el *splicing* y puede catalogarse como una mutación benigna.

2. Introducción

2.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la división, desdiferenciación y crecimiento descontrolado de las células. Los tumores cancerosos pueden desprender células que viajan por el sistema circulatorio y formar nuevos tumores (Bray *et al.*, 2018).

Durante el desarrollo del cáncer ocurren múltiples cambios a nivel genómico producto de factores genéticos y ambientales. Los cambios genéticos son mutaciones, que pueden ser adquiridas o heredadas, es decir somáticas y/o germinales, que afectan diversos procesos celulares; como la regulación genética y epigenética, mantenimiento de los telómeros (a través de la expresión de la telomerasa) y la alteración de diversas vías metabólicas, entre otros. Estas, a su vez, refuerzan el mantenimiento del genotipo y fenotipo tumoral (Hahn & Weinberg, 2002; Stratton, Campbell, & Futreal, 2009) el cual consiste de ciertas características comunes en las diferentes neoplasias tales como: inestabilidad genómica, autosuficiencia en señales de crecimiento, potencial replicativo ilimitado, evasión de apoptosis, evasión del sistema inmune e invasión y metástasis. Estas características aparecen gradualmente y pueden ser compartidas por varios tipos de células tumorales o bien, ser características de algún tipo de cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011)

Existen diversos factores ambientales y factores de riesgo asociados a la probabilidad de desarrollar cáncer tales como la exposición a productos químicos, sustancias nocivas o a la exposición de radiación, así como la ingesta de alcohol, tabaco, dietas inadecuadas, obesidad y algunos gérmenes infecciosos. (Danaei *et al.*, 2005). Al respecto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que hay más muertes por cáncer que por enfermedades cardiovasculares, para el 2018, 14.1 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes a nivel mundial; además, identifica que a nivel mundial, los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los más comunes entre los varones, mientras que en las mujeres son los de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y

estómago. En cuanto al cáncer de mama (CaMa), en México es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en mujeres de 25 a 60 años (Bray et al., 2018).

2.2. Cáncer de mama

El CaMa se desarrolla en los epitelios de los conductos y glándulas mamarias. De acuerdo con los perfiles de expresión de muestras de tumores, se han clasificado molecularmente el tipo y subtipo de cáncer y con ello su posible tratamiento. La clasificación toma en cuenta principalmente la localización del inicio del tumor así como la expresión de los receptores HER2, receptor de estrógeno y receptor de progesterona, además de otros marcadores (Perou et al., 2000), dividiendo en dos principales tipos, basados en la presencia del receptor de estrógeno (RE): RE+: Luminal A, Luminal B y RE-: HER2 +, Basal-Like (triple negativo) y Normal breast (Yersal & Barutca, 2014; Zepeda-Castilla et al., 2008. Tabla 1.)

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama (Yersal & Barutca, 2014; Zepeda-Castilla et al., 2008. Tabla 1.).

Tipo	Subtipo molecular	Receptor de progesterona	HER2
RE+	Luminal A	+	-
	Luminal B		
	HER2- HER2+	+ +	- +
RE-	HER2 +	-	+
	Basal-like	-	-

2.3. Cáncer de Mama y BRCA1

La identificación de estos subtipos ha ayudado al tratamiento del cáncer, ya que se han implementado inhibidores para los receptores expresados en cada subtipo. Por ejemplo el tamoxifeno, un fármaco que bloquea los receptores de estrógeno, por lo que se ocupa como terapia convencional del cáncer de mama tipo RE+ (Osborne, 1998). Particularmente para el subtipo triple negativo existen otros tratamientos, algunos dirigidos a dañar el DNA de las células o a impedir la

reparación de estos daños como los inhibidores de PARP, debido a sus deficiencias en sistemas de reparación, asociados a defectos en las principales proteínas encargadas de estos procesos (Dizdar, Arslan, & Altundag, 2015). Por ejemplo la proteína BRCA1, donde al menos en el 20% de los casos de cáncer de mama tiene mutaciones de línea germinal (Larsen et al., 2013; Wong-Brown et al., 2015).

2.3.1. BRCA1: estructura y función.

BRCA1 es un gen situado en el brazo corto del cromosoma 17, formado de 24 exones, que codifican para la proteína del mismo nombre, la cual en su versión completa cuenta con un dominio RING, un dominio SCD, dos dominios BRCT, así como dos señales de localización nuclear (Roy, Chun, & Powell, 2011. Fig. 1). Con ayuda de estos dominios BRCA1 interactúa con diferentes proteínas y participa en la reparación de daño a DNA de doble cadena resultado de las actividades metabólicas de la célula, errores en la replicación por la polimerasa, exposición a radiación y a compuestos químicos mutagénicos. Estos daños son reparados por diferentes mecanismos, como la recombinación homóloga.

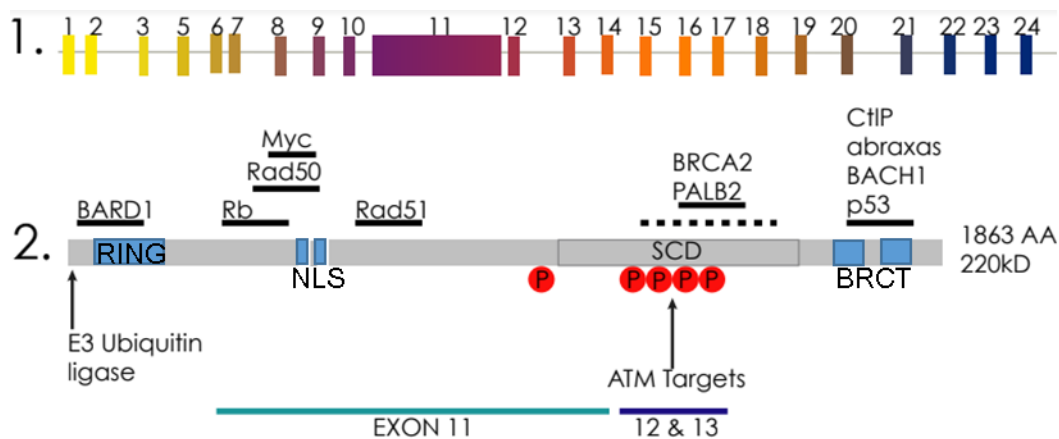


Fig.1. BRCA1. 1. Exones de BRCA1 del 1 al 24, destacando el gran tamaño del exón 11 (>300pb). 2. Dominios de la proteína: RING, NLS, SCD, BRCT y su interacción con diversas proteínas (Clark, Rodríguez, Snyder, Hankins, & Boehning, 2012).

La recombinación homóloga (RH) se lleva a cabo ante rupturas de doble cadena, es un proceso de reparación que se lleva cabo en tres pasos: iniciación, mediación y reparación. Durante la iniciación se reconoce el daño al DNA por el complejo MRN (RAD50, Mre11 y NBS1), regulado por el complejo mediador CtIP/BRCA1. MRN

recluta a ATM y ATR que fosforilan a la histona H2AX, enseguida se recluta el complejo de resección, formado de una helicasa BLM y las endonucleasas DNA2-RPA-EXO1. La mediación se lleva a cabo por el complejo mediador BRCA1-PALB2-BRCA2, que son previamente fosforiladas por CHK2; este complejo recluta a las proteínas RAD51/RecA que buscan la cadena homologa y que, por medio de una reacción dependiente de ATP, intercambian cadenas que finalmente se completan por la polimerasa (PARP) y la DNA ligase IV (Kowalczykowski, 2015; Roy, Chun, & Powell, 2011b; Sung & Klein, 2006. Fig.2)

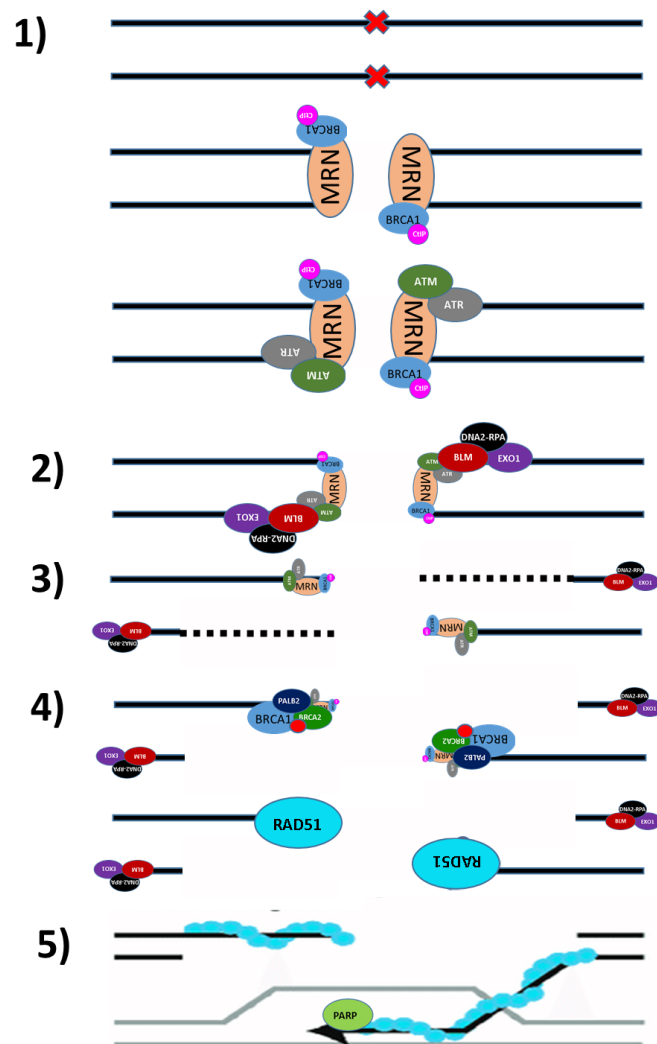


Fig.2. Reparación de daño a DNA por recombinación homóloga. 1. Reconocimiento del daño por MRN y reclutamiento de ATM/ATR para la fosforilación de H2AX. 2 y 3. Activación del MRN por

BRCA1/CTIP y reclutamiento del complejo de resección BLM-DNA2-RPA-EXO1. 4. Unión de BRCA1-PALB2-BRCA2 y reclutamiento de RecA y RAD51. 5. Reconocimiento de la cadena homóloga.

Además de ello, BRCA1 participa en varios procesos, principalmente la regulación del ciclo celular y el control de la transcripción. BRCA1 regula el ciclo celular interactuando con RB hipofosforilado, para después unirse al factor de transcripción E2F y al mismo tiempo reclutar una desacetilasa de histona y bloquear la transcripción de genes encargados de la progresión del ciclo celular. También, BRCA1 junto con BARD1 pueden inducir la fosforilación de p53 por ATM y con ello promover la transcripción de p21, que bloquearía la progresión del ciclo celular (Deng, 2006). Además, BRCA1 también tiene diferentes interacciones con otras proteínas y complejos participantes de la transcripción, tal como la unión a la RNA pol II y con la RNA helicasa A (Anderson, Schlegel, Nakajima, Wolpin, & Parvin, 1998) funcionando como co-activador. Si bien BRCA1 no tiene ningún papel como factor de la transcripción puede funcionar como co-activador y co-represor de algunos factores de transcripción como en el caso de STAT1 y c-Myc respectivamente, o bien regular la actividad de otros co-activadores o co-represores, como p300, CBP y ZBRK1. (Ouchi, 2000; Pao, Janknecht, Ruffner, Hunter, & Verma, 2000; Wang, Zhang, Kajino, & Greene, 1998; Zheng *et al.*, 2000. Fig.3)

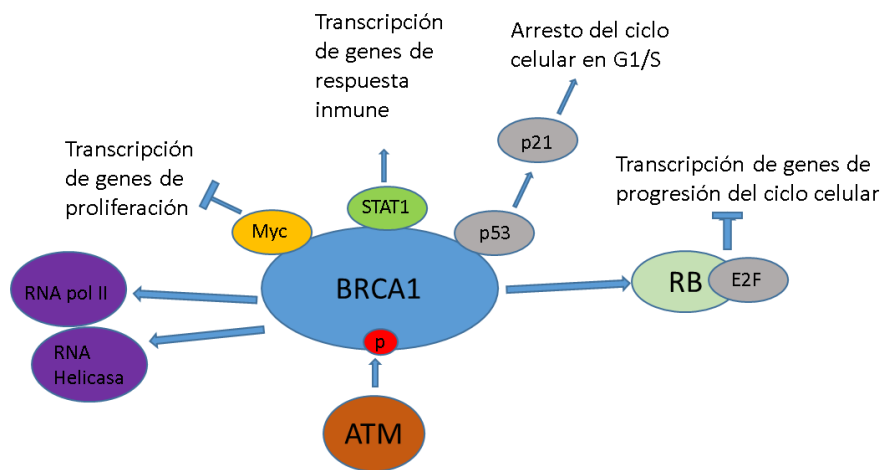


Fig.3. BRCA1 y su papel en la transcripción. BRCA1 es fosforilado por ATM y de esta manera puede interactuar con la RNA helicasa y Polimerasa II, además puede funcionar como co-represor de Myc e inhibir la transcripción de sus blancos, a diferencia de STAT1 y p53 donde funciona como co-activador y promueve la transcripción de sus blancos. Finalmente BRCA1 se une a RB y fortalece el secuestro de E2F y por lo tanto se inhibe su función.

La participación de BRCA1 principalmente en la reparación de DNA, así como su papel en la regulación de otros procesos le confiere la calidad de supresor de tumores, pues mantiene la estabilidad genómica y en consecuencia puede incidir en la progresión del ciclo celular. Sin embargo, se han identificado diversas mutaciones que afectan la funcionalidad de BRCA1 (Miki *et al.*, 1994). Actualmente se han descrito más de 3000 mutaciones de BRCA1 en las Bases de datos internacionales para mutaciones; BIC y UMD (Bérout *et al.*, 2000; Szabo *et al.*, 2000). Estas mutaciones pueden truncar la proteína al añadir un codón de paro prematuro (nonsense) o al recorrer el marco de lectura al perder o añadir una base (frameshift), además, también están las mutaciones missense, de cambio de aminoácido que pueden afectar la funcionalidad de la proteína. Si bien se tienen identificados los efectos que tienen algunas mutaciones en la proteína, más del 50 % de estas no han sido descritas o bien tienen efecto sobre las regulaciones post transcripcionales como en el proceso de splicing (Landrum, M. J. 2016).

2.4. Splicing

El *splicing* es un proceso cotranscripcional realizado en los organismos eucariotas, principalmente es la unión de los exones (la parte codificante del DNA) y la exclusión de los intrones para formar un RNA maduro que pueda ser traducido. Este proceso se lleva a cabo por una maquinaria celular conocida como *Spliceosoma*, que reconoce los intrones a través de tres sitios principales. En los extremos 5' y 3' de cada intrón se localizan los sitios donador y aceptor, caracterizados por la presencia de una secuencia GURAGU y yAG, respectivamente; el tercer sitio, el sitio de ramificación, se encuentra de 18 a 40 nucleótidos río arriba del extremo 3' del intrón y tiene una secuencia consenso YNCURAY (Hoskins & Moore, 2012; Gilbert, 1978. Fig.4). (Nucleótidos Y: C o T, N: A, T, C o G, R: A o G).



Fig.4. Secuencias de reconocimiento para *splicing*.

Bioquímicamente, este proceso se lleva a cabo por dos reacciones de transesterificación: el primero se lleva a cabo cuando el 2'OH del penúltimo nucleótido del sitio de ramificación realiza un ataque nucleofílico al primer nucleótido del extremo 5' del intrón (G) y el segundo se lleva a cabo por un ataque nucleofílico del 3'OH del extremo 5' al último nucleótido (G) del extremo 3' del intrón. De esta forma, se libera el intrón en forma de una estructura llamada lariat y propiciando la unión de los dos exones (Fica *et al.*, 2013. Fig. 5)

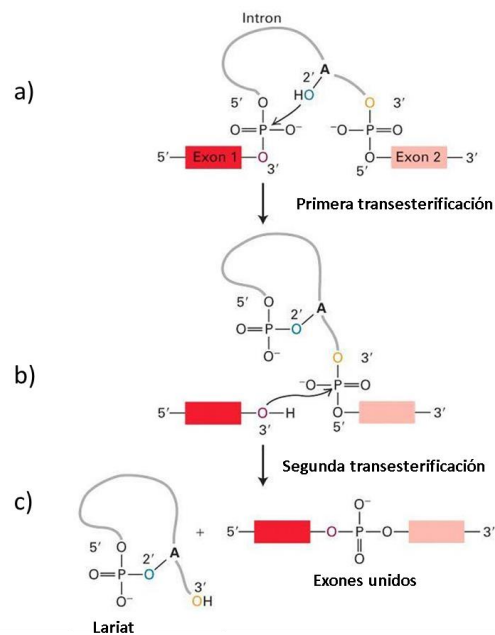


Fig.5. Bioquímica del splicing. Después de la transcripción del RNA a) el OH de la adenina de la secuencia de ramificación realiza un ataque nucleofílico a la guanina del extremo 5' del intrón, b) en seguida el OH libre realiza el segundo ataque nucleofílico al extremo 3' del intrón, c) liberando el lariat y ensamblándose ambos extremos de cada exón.

El *spliceosoma*, está formado principalmente por las partículas ribonucleoprotéicas U1, U2, U3, U4, U5 y U6, junto con alrededor de otras 300 proteínas auxiliares. El *splicing* se inicia por la formación del complejo E (*early*) o CC (*commitment complex*): La unión de U1 al sitio donador 5' junto con otras proteínas auxiliares. Enseguida se forma el complejo A con la unión de U2 al sitio de ramificación y paralelamente, se lleva a cabo la formación del complejo U4/U6-U5, que formara al complejo B1, al unirse U5 al extremo 3' del intrón y U6 a U2, usando a U4 como puente. En la formación del complejo B2, U1 es liberado y U6 pasa al extremo 5' del

intrón, con ello se da pie a la formación del complejo C1, donde U4 es liberado y U5 se une al extremo 5' del intrón y U6 y U2 promueven la reacción de transesterificación que corta el extremo 3' del intrón. Finalmente en la formación del complejo C2 hay un cambio conformacional que promueve el corte del extremo 3' del intrón, liberando así el lariat y ensamblando ambos exones con un gasto de ATP, para después disociar el complejo (Hoskins & Moore, 2012; Jurica & Moore, 2003. Fig. 6.)

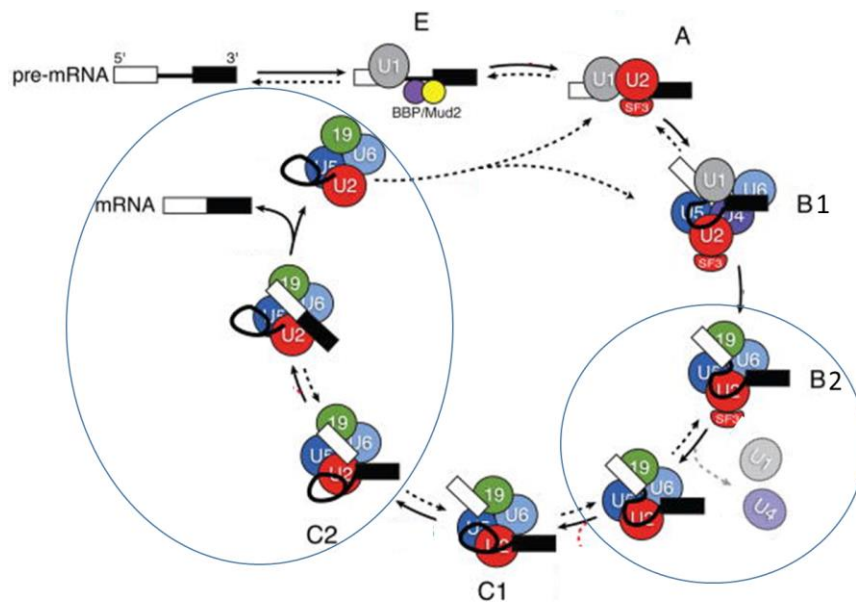


Fig.6. *Splicing* y ensamblaje del *spliceosoma*. Formación de complejos E: unión de U1a extremo 5' del intrón, A: unión de U2 a sitio de ramificación, B1: ensamblaje y unión de U4/U6-U5, B2: liberación de U1 y U4, C1: Cambio conformacional y corte del extremo 5' del intrón y C2: corte del extremo 3' del intrón, unión de exones y liberación de lariat (Hoskins & Moore, 2012).

2.4.1. *Splicing* alternativo.

El *splicing* alternativo es el proceso donde los exones provenientes de un mismo mRNA se empalman alternativamente, esto es, incluyéndose o excluyéndose, parcial o totalmente al final en el mRNA maduro. Este proceso resulta en una gran diversidad de mensajeros maduros a partir de un pre-mRNA, que a su vez, resultan en isoformas de una misma proteína a partir de un solo gen (Alekseyenko, Kim, & Lee, 2007. Fig.7).

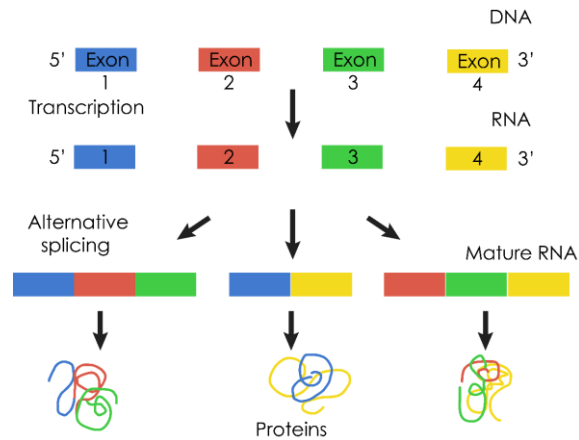


Fig.7. Splicing alternativo. A partir de un mRNA pueden derivar diversos mensajeros que dan lugar a diferentes proteínas.

Existen cuatro principales formas por las que se puede dar el splicing alternativo. (Kim, Goren, & Ast, 2008 Fig.8)

1ª: *Exón skipping*: De esta manera un exón no es reconocido y se omite del transcrito final, ya sea por la debilidad en los sitios de splicing que lo comprometen o por el reconocimiento de sitios más fuertes de los exones adyacentes. Este es el mecanismo que predomina en el 40% de los eventos de splicing alternativo (Fig. 8A)

2ª. Reconocimiento alternativo 5': Por esta forma se reconocen sitios donadores localizados dentro de un exón, lo que propicia la inclusión de solo de un fragmento del exón. (Fig.8B)

3ª. Reconocimiento alternativo 3': Al igual que la forma anterior solo que en este caso se reconocen sitios aceptores dentro del exón que de igual forma, incluyen un exón incompleto. (Fig.8C)

4ª. Retención de intrón: Los intrones son retenidos por el bloque en el reconocimiento de sitios donadores y aceptores. (Fig. 8D)

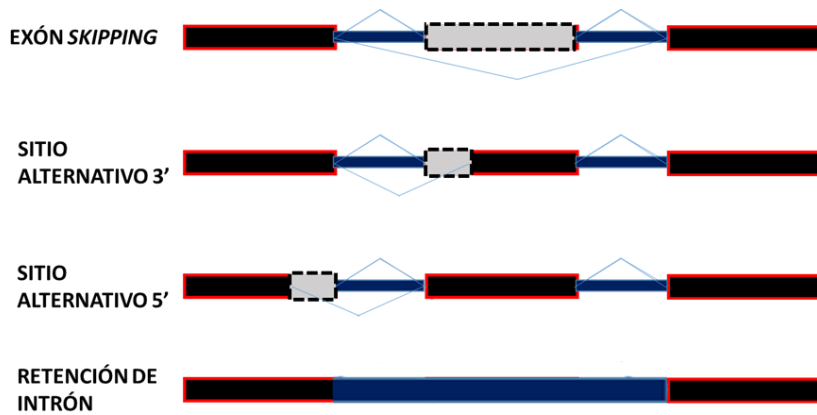


Fig.8. Variantes de splicing alternativo.

2.4.2. Regulación del *splicing*.

Si bien el *splicing* es un proceso realizado por el *spliceosoma*, este mismo depende de algunas señales de regulación, específicamente la potenciación o bloqueo por parte de proteínas auxiliares las cuales compiten por la unión a secuencias potenciadoras y silenciadoras, de esta manera se regula la inclusión u omisión de exones. (Busch & Hertel, 2012)

Secuencias reguladoras.

Además de los sitios canónicos como los sitios aceptores, donadores y la secuencia de ramificación, los intrones y exones pueden presentar sitios de unión a proteínas auxiliares del *spliceosoma* que funcionan como potenciadores (*enhancer*) o silenciadores del *splicing*. Por sus siglas en ingles, se conocen como: ISS: intronic splicing silencer ISE: intronic splicing enhancer, ESE exonic splicing enhancer, ESS exonic splicing silencer.

Proteínas reguladoras.

Existen principalmente dos familias de proteínas reguladoras que reconocen sitios ISS, ESS e ISE, ESE: proteínas SR y proteínas HnRNP.

Proteínas SR: son proteínas ricas en serina y treonina, que contienen principalmente dos dominios, uno de interacción proteína-proteína y uno de unión a RNA. Al unirse a los sitios enhancer promueven el reclutamiento e interacción de las ribonucleoproteínas U1, U2, U3, U4, U5 y U6.

Proteínas HnRNP (ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares): además de tener participación en la estabilidad y exportación de los mensajeros, son proteínas que funcionan para bloquear la interacción del spliceosoma con el RNA al unirse con sitios ISS y ESS.

Diferentes proteínas reguladoras se han visto expresadas diferencialmente en diversos tipos de tejido lo que promueve patrones de *splicing* diferenciales en los genes y, consecuentemente, la formación de diferentes isoformas dependientes de tejido y del requerimiento de las mismas. (Warzecha *et al*, 2009. Fig. 9).

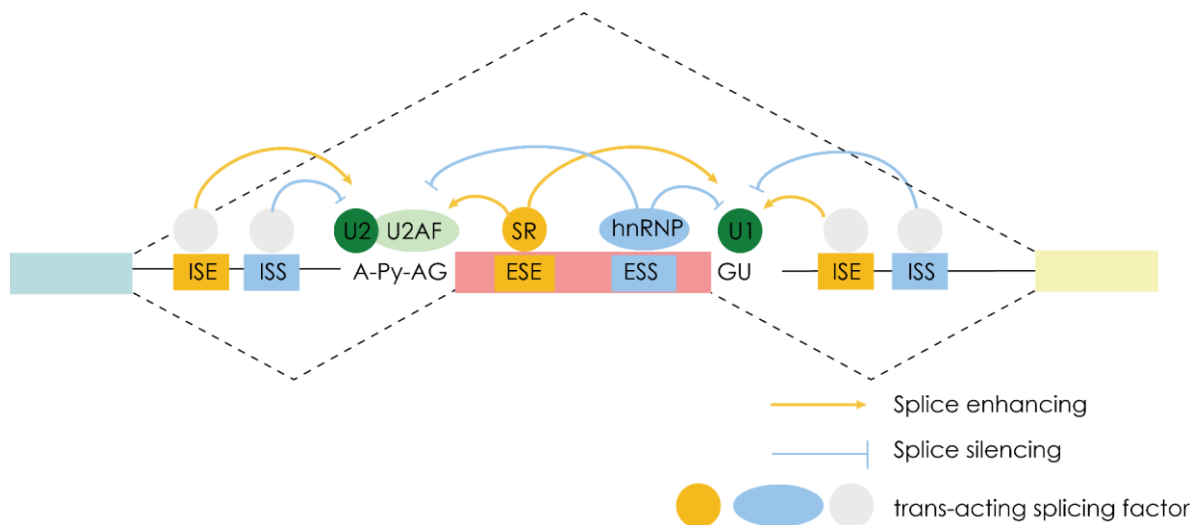


Fig.9. Regulación del splicing alternativo. Secuencias de regulación intrónicas (ISE e ISS) y exónicas (ESE y ESS). Proteínas de regulación SR y HnRNP y su interacción con RNA y otras proteínas (Takeda *et al.*, 2007)

2.4.3. Efecto de las mutaciones en el *splicing*.

Independientemente de su efecto en la codificación de proteínas, las mutaciones presentes a lo largo del pre-mRNA, pueden debilitar o fortalecer el reconocimiento de los sitios canónicos o bien, crear nuevos sitios de splicing alternativo. Las mutaciones en exones o intrones pueden afectar las secuencias reguladoras modificando su afinidad hacia las proteínas de unión a RNA, debilitando o bien aumentando innecesariamente (Ke, Zhang, & Chasin, 2008). Adicionalmente, las mutaciones pueden crear estructuras secundarias en el RNA que impiden el reconocimiento de un exón mediante impedimento estérico (J. Zhang, Kuo, & Chen, 2011). Por lo tanto la unión de alguno de los factores que facilitan o bloquean

el reclutamiento del spliceosoma a lo largo del RNA así como la misma estructura secundaria del RNA es clave para la inclusión u omisión de exones, y en consecuencia para el patrón de isoformas alternativas del mismo gen. (Cartegni *et al.*, 2002)

Enfermedades relacionadas a modificación de secuencias de splicing

Tal es la importancia de la presencia de las secuencias reguladoras del *splicing* que se han reportado diversos padecimientos involucrados en la modificación de secuencias (Baralle & Baralle, 2005). Por ejemplo, una modificación que elimina el sitio donador provocado por la mutación T1945+6C en el intrón de la proteína KCNH2 –lo que provoca que no se una la subunidad U1 y además genera un nuevo sitio de reconocimiento– promueve la retención del intrón 6 y por lo tanto se obtiene una KCNH2 no funcional que desencadena el síndrome QT largo que provoca taquicardias (L. Zhang *et al.*, 2004). Otro ejemplo es la eliminación de un sitio de unión ESE, provocado por una mutación presente en una población canadiense (c.802_815) en la proteína PEX6, lo que favorece el reconocimiento de sitios crípticos dentro del exón 1, generando una proteína trunca que afecta el desarrollo cerebral y el funcionamiento del hígado (Levesque *et al.*, 2012). Se ha reportado también la generación de nuevos sitios, como el sitio ESS provocado por la mutación c.4250A>T en el gen de la distrofina que promueve la unión de una HnRNP, que a su vez propicia la exclusión del exón 31 generando proteínas pobres funcionalmente (Disset *et al.*, 2006).

2.5. Mutaciones en BRCA1

En el caso de BRCA1 se han reportado mutaciones de línea germinal que alteran la estructura y función de la proteína. Varias de estas mutaciones son de tipo missense, deletéreas o de corrimiento de marco de lectura, llamadas en la clínica como Patogénicas. Todas estas representan un riesgo ya que pueden ocasionar la modificación o eliminación de dominios, mal plegamiento o incluso la pérdida de la expresión de la proteína, lo que puede contribuir al riesgo de contraer y desarrollar cáncer (Godet & Gilkes, 2017; Stoppa-Lyonnet, 2016). Sin embargo en muchos estudios donde se buscan mutaciones frecuentes, a menudo aparecen mutaciones con un significado incierto, llamadas "Variants of Unknown Clinical

Significance “(VUS), es decir, que no están clasificadas como benignas o patogénicas, ya que el efecto que tendrían a nivel de proteína no está reportado o bien, sus efectos no implican un cambio en la estructura y función, si no que tal vez podrían alterar el balance de isoformas o la cantidad de proteína disponible, de tal forma que la falta de estudios funcionales no permite esclarecer el papel de las VUS, por lo que representan una limitante en el diagnóstico oportuno (Eccles et al, 2015; López-Urrutia et al., 2018).

Se ha encontrado que algunas VUS modifican el splicing, como la identificación de la variante c.5406+2T>C, que elimina el sitio donador del exón 21 lo que retiene 156pb del intrón en el transcrito maduro, lo cual comprometería la funcionalidad de los dominios BRCT (Esposito et al., 2016). La mutación c.309 T>G crea un nuevo sitio donador críptico más fuerte que el canónico en el exón 5, por lo que es usado preferentemente y esto culmina en la pérdida de 22 nucleotidos en el transcrito final (Yang et al., 2003). Otro ejemplo sería la generación de un transcrito alternativo sin el exón 18 provocada por la variante c.5123 C>A que altera dos sitios enhancer (Sanz et al., 2010)

En CaMa existen mutaciones que pueden dar origen a procesos de splicing aberrantes, debido a que se pueden modificar secuencias que funcionan como enhancers y/o silenciadores, lo que llevaría a la unión factores de splicing ajenos al sitio o bien, a la falta de su unión y como consecuencia final, se tendrían proteínas truncas o disfuncionales que permitieran la proliferación celular en caso de ser proteínas supresoras de tumor (Sanz, Acedo, Infante, et al., 2010).

En el año 2012, nuestro grupo de trabajo (Vaca-Paniagua et al., 2012), identificó mutaciones en la secuencia del gen BRCA1 de 39 pacientes mexicanas con CaMa. De estas mutaciones se encontraron cinco con un efecto incierto o desconocido (VUS) según la base de datos ClinVar (Landrum et al., 2016). De estas, se tomaron dos, de las que se pretende estudiar el efecto que tienen sobre el proceso de splicing a través de ensayos en minigenes y así contribuir al conocimiento y diagnóstico de posibles neoplasias producto de mutaciones.

3. Hipótesis

Las mutaciones con significado clínico incierto (VUS) localizadas en el gen de BRCA1 tendrán un efecto aberrante en el proceso de splicing.

4. Objetivos

4.1. General

Analizar el efecto de dos mutaciones VUS sobre el *splicing* de BRCA1

4.2. Particulares

- + Construir un sistema de minigenes que permita analizar los efectos de una mutación puntual en el *splicing* de BRCA
- + Inducir, mediante mutación sitio-dirigida, las VUS de estudio en los minigenes de BRCA
- + Análisis del patrón de *splicing* producido por las VUS de estudio, mediante RT PCR

5. Materiales y métodos

5.1. Análisis *in silico*

Las dos mutaciones del gen BRCA1 tomadas del trabajo de Vaca-Paniagua, F *et al* (2012. Tabla 2), fueron ubicadas dentro de la secuencia del gen (GenBank ID: gi|262359905:92501-173689) con ayuda del programa CLC Sequence Viewer 8 (Qiagen).

Tabla 2. Mutaciones de BRCA1.

No.	Nucleótido	Estatus (ClinVar)
1	c.-19T>C	VUS
3	c.4485-64C>G	VUS

El análisis *in silico* para validar las secuencias canónicas de splicing se hizo con ayuda tres programas: *Fruit fly and human splice predictor* (Rees *et al*, 1997) *NetGene2 Server* (Hebsgaard *et al.*, 1996) y *Alternative Splice Site Predictor (ASSP)* (M. Wang & Marín, 2006) los cuales están basados en ensayos, algoritmos y matrices de datos que en conjunto evalúan las secuencias y les asignan un score de confianza, dicho score es un valor obtenido del 0 al 1, siendo 1 el valor más alto y por lo tanto de mayor validez. Para identificar posibles secuencias reguladoras y sus potenciales blancos se ocupó el programa *Human Splicing Finder* (Desmet *et al.*, 2009).

5.2. Construcción de minigenes

Diseño

Cada minigen contiene solo los exones e intrones de BRCA1 que se usaran para analizar un evento de splicing y constan de un promotor incluido en el vector de expresión y de 3 fragmentos; el fragmento 2 contiene la mutación y está formado de un exón flanqueado por 100 pb de intrones, a su vez este fragmento esta flanqueado por los fragmentos 1 y 3 formados de 100 pb de intrones y los exones adyacentes al exón de en medio. Esta construcción se ligó al vector pSPL3 interrumpiendo el intrón de VIH del propio vector (Fig.10).

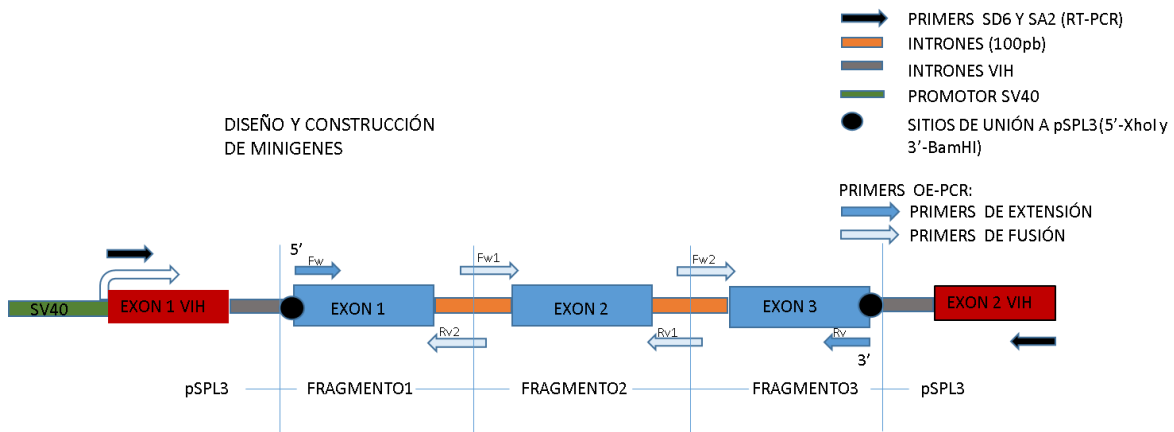


Fig. 10. Diseño y construcción de minigen. De izquierda a derecha: Promotor de SV40, exón 1 de VIH, intrón VIH, Fragmento 1; sitio XhoI para unión a vector, exón 1, 100 pb del intrón. Fragmento 2; 100 pb del intrón, exón y 100 pb del intrón. Fragmento 3; 100 pb del intrón, exón y sitio de restricción. Intrón VIH y exón 2 VIH.

Amplificación y ensamblaje

La obtención del DNA para la construcción de los mini genes se hizo a partir de la línea celular Hek293T empleando la técnica de TRIzol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células se mantuvieron en condiciones de esterilidad, en una incubadora a 37°C, 5 % de CO₂ y 90 % de humedad relativa.

La amplificación y ensamble de los fragmentos se llevó a cabo por Overlap-Extension PCR (OE-PCR) que consiste en la unión de amplicones independientes mediante una segunda reacción de PCR (Higuchi, Krummel, & Saiki, 1988) Fig.11)

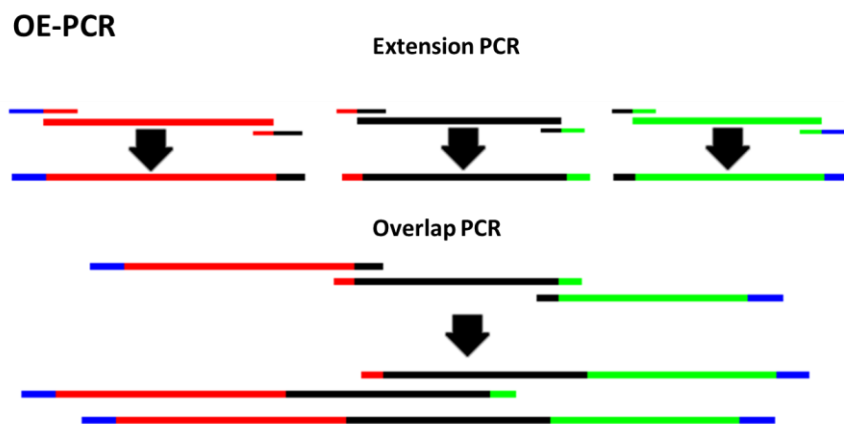


Fig.11. Overlap-Extension PCR. Paso 1 de extensión y paso 2 de unión de amplicones. Tomado de Protocols (2017).

Cada fragmento inicial se amplificó con un par de primers para cada uno (Fw y Rv) de alrededor de 20-40 pb, con 50 % de CG y Tm de 40-65°C. A los primers Fw y Rv (extensión) se les añadió en sus extremos 5' los sitios de restricción para las endonucleasas XhoI y BamHI respectivamente, para su ensamble al vector de expresión. Para la unión de los tres fragmentos que conforman a cada minigen, se diseñaron los primers Fw1, Fw2, Rv1, Rv2 (fusión) de alrededor de 40 pb; éstos contienen la mitad de bases complementarias a la región a amplificar y la segunda mitad es complementaria a la región amplificada por el primer adyacente. De esta forma, la segunda ronda de amplificación tuvo como resultado un solo amplicón con los tres fragmentos fusionados (Fig. 10, Tabla 3).

Tabla 3. Primers; secuencia y especificaciones.

Primer	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)
Uso general		
Fw SD6	TCTGAGTCACCTGGACAACC	53.8
Rv SA2	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC	50.5
Fw pspI3	CTTGGGATGTTGATGATCTGT	50.5
Rv pspI3	ATAGAGTGGTGGTTGCTT	45.8
Fw T3	AATTAACCCTCACTAAAGG	44.6
Rv T7	TAATACGACTCACTATAGGG	47.7
Minigen c.-19T>C		
Fw extensión	CTCGAGGCTGTGGGGTTTCTCAGATA	58
Rv extensión	GGATCCCTTGCAAAATATGTGGTCACAC	58.4
Fw1 fusión	TAAGGCGTTGTGAACCCTGGACGTTGTCATTAGTTCT	65.6
Rv1 fusión	AGAACTAATGACAACGTCCAGGGTTCACAACGCCTTA	65.6
Fw2 fusión	AGGGAAGAAAAGACATGTCTGGCCTTATGTTGACTCAGTC	66.5
Rv2 fusión	GACTGAGTCAACATAAGGCCAGACATGTCTTTTCTCCCT	66.5
Fw Mut	TATATATATGTTTTTCTAATGTGTTAAAGTTCATTGGAACAGAAAGAAATGGATTTATC	63.2
Rv Mut	GATAAATCCATTTCTTTCTGTTCCAATGAACTTAAACACATTAGAAAAACATATATATA	63.2
Minigen c.4031A>G		

Fw extensión	CTCGAGGACAAGTTTGAGGTGTCTGC	61.1
Rv extensión	GGATCCAGAAGGATCAGATTCAGGGT	59.5
Fw1 fusión	CCAGTTTTTGCATACAGGCCTGATCTCTCTGACATGAGC	67.6
Rv1 fusión	CATGAATACAGTGTTGGTGGAAAGTGCCATGATAGACTAG	65.5
Fw2 fusión	CTAGTCTATCATGGACACTTCCACCAACACTGTATTCATG	65.5
Rv2 fusión	GCTCATGTCAGAGAGATCAGGCCTGTATGCAAAAACTGG	67.6
Fw Mut	ATGCTTTGGCTGCCAGCAAGTATGATTTGTCCT	64.4
Rv Mut	AGGACAAATCATACTTGCTGGGCAGCCAAAGCAT	64.4

Primers y condiciones.

Extensión: Se hizo una reacción independiente para cada uno de los tres fragmentos, usando para el fragmento1 (Fg1) los primers Fw extensión y Rv2 fusión, para el Fg2 el primer Fw1 fusión y Rv1 fusión, finalmente el Fg3 fue amplificado con Fw2 fusión y Rv extensión (Tabla 1), bajo las condiciones representadas en la Fig. 12.

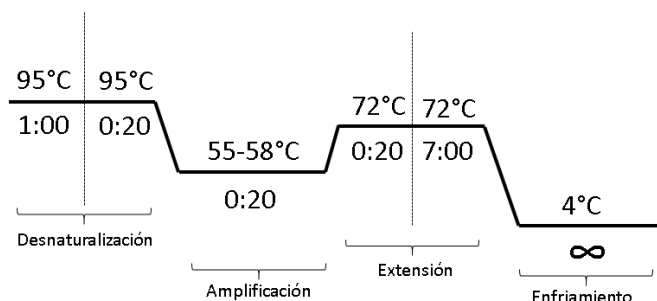


Fig. 12. Condiciones de PCR de Extensión.

Ensamblaje. Se hizo a partir de la adición equimolar de los amplicones de fg1, fg2 y fg3 únicamente utilizando los primers Fw (extensión) y Rv (extensión). Las condiciones de reacción fueron las mismas excepto por un aumento de 10 segundos en el tiempo de extensión (Fig. 13)

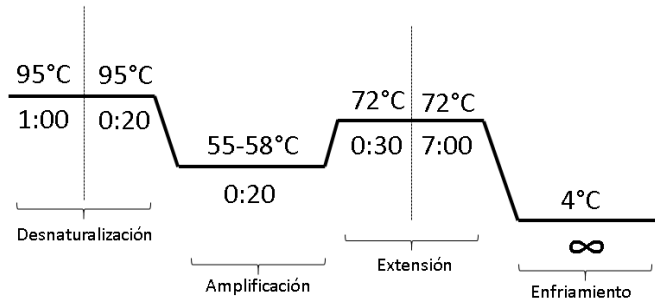


Fig. 13. Condiciones de PCR de ensamblaje.

Una vez amplificados tanto en el primer y segundo paso, los fragmentos fueron resueltos en geles de agarosa y purificados por el kit de columnas PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). Los amplicones ensamblados fueron ligados en una relación 1:10 al vector de clonación pBluescript (Stratagene) y fue transformada en células competentes *E. coli* XL10Gold. De las colonias resultantes, 10 fueron analizadas; primero extrayendo los plásmidos por el kit PureLink miniprep (Invitrogen) y enseguida haciendo ensayos de restricción con las enzimas XhoI y BamHI para verificar la presencia del inserto. Una vez verificadas, las construcciones se analizaron por secuenciación Sanger, usando los primers FwT4 y RvT7.

Dicha secuenciación así como todas las requeridas para este trabajo fueron llevadas a cabo en el laboratorio de bioquímica molecular de la UBIPRO en la FES Iztacala UNAM, con el equipo ABI Prism 3130xl y el Kit BigDye Terminator Ready.

Después de confirmar la secuencia del minigen se subclonó en el vector de expresión pSPL3 dirigido con enzimas XhoI y BamHI. Después de verificar la identidad de la construcción mediante restricción y secuenciación Sanger con los primer Fw pspl3 y Rv pspl3, se indujo la mutación a evaluar, por medio de mutagénesis sitio-dirigida usando el kit QuikChange (Agilent) y los primers de mutagénesis Fw M1 Mut y Rv M1 Mut. (Fig. 14, Tabla1) Los plásmidos resultantes se analizaron también por secuenciación Sanger para verificar la mutación.

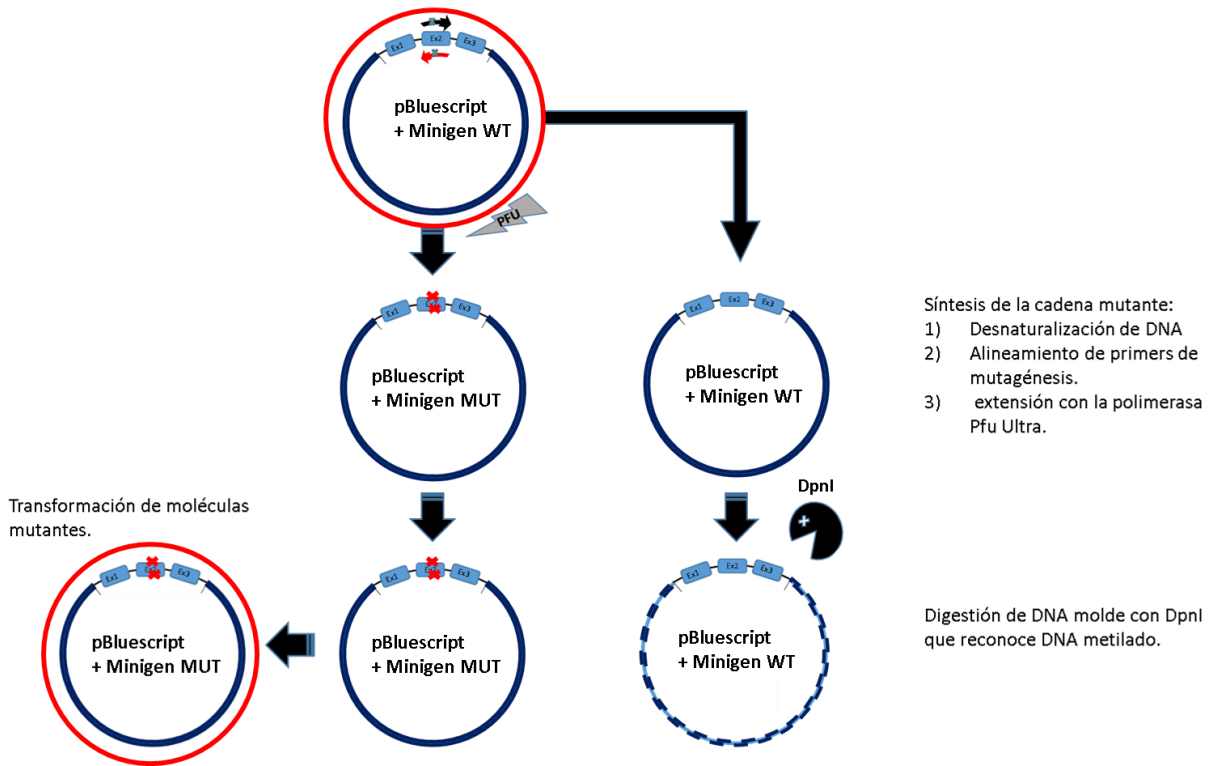


Fig. 14. Esquema de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange (Agilent). Modificado del manual del fabricante.

Al tener la construcción en el plásmido Psp3, tanto wild type (WT) y mutante (Mut), se realizó una maxiprep con el kit PureLink Maxiprep (Invitrogen) de cada uno.

5.3. Evaluación del splicing

Transfección y extracción de RNA

Los ensayos de splicing se llevaron a cabo en células Hela que se sembraron en 2 placas de 6 pozos, cada uno con 400 mil células y con 3 ml de medio DMEM/F12 mantenidas en condiciones de esterilidad, en una incubadora a 37°C, 5 % de CO₂ y 90 % de humedad relativa, en el laboratorio de Genómica Funcional L-11 de la UBIMED en la FES Iztacala, UNAM.

Se consideraron cuatro grupos experimentales para tres repeticiones: control negativo (HeLa-), mock (Psp3), Psp3+M.WT y Psp3+M.Mut. Se transfectaron 2 µg de plásmido de los últimos tres grupos, por medio del agente de Transfección Lipofectamina 3000 (Invitrogen) a células con una confluencia del 70%-80%. Las

células se mantuvieron en las condiciones anteriormente descritas. Veinticuatro horas post-transfección se extrajo RNA total por el método de TRIzol.

Detección de los transcritos

Se obtuvo cDNA con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Roche) y a través de PCR se amplificó el transcrito resultado del splicing de cada minigen transfectado. Para ello se usaron los primer Fw SD6 y Rv SA2 que reconocen los exones 1 y 2 de VIH, presentes en el vector pSPL3 (Fig. 15). Los amplicones obtenidos se resolvieron en un gel de agarosa al 1 %. Adicionalmente, se hizo una prueba por electroforesis capilar con el equipo ABI Prism 3130xl y el Kit BigDye Terminator Ready del laboratorio de bioquímica molecular de la UBIPRO dentro de la Fes Iztacala UNAM.

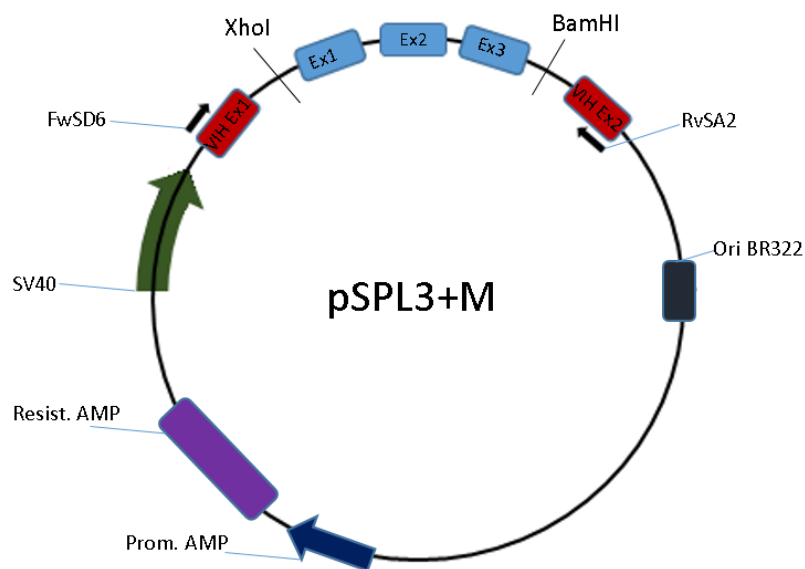


Fig. 15. PspI3+M. Esquema de plásmido con la construcción del minigen. Plásmido con los siguientes elementos: origen de replicación promotor de AMP, gen de resistencia a antibiótico, promotor de SV40, exon1 de VIH, minigen, exon2 de VIH.

6. Resultados

6.1. Predicciones y análisis *in silico*

Validación de secuencias canónicas de splicing.

Se hizo la validación de los sitios donadores y aceptores de cada minigen, con y sin mutación, analizando toda la secuencia. Cada sitio fue evaluado con un score de confianza de acuerdo a cada programa: Splice site prediction (SSP), NetGene Serve 2 (NS2) y alternative splicing site prediction (ASSP), siendo 1 el valor más alto de confianza (Ver anexo 1 Y 2).

Minigen c.19T>C. Con el programa SSP no se mostró ninguna diferencia entre el minigen WT y MUT. En ambas secuencias se reconocieron los cuatro sitios donadores (SD) siendo el SD2 el que tiene un score más bajo, con 0.70 unidades. Además solo se reconocieron dos de los cuatro sitios aceptores (SA) (1 y 2), siendo el SA2 con el score más bajo de 0.52 unidades. Con NS2 tanto en la secuencia WT como en la MUT solo reconocieron tres SD (1,3 y 4). También los sitios SA1, 2 y 3 fueron reconocidos en ambas secuencias, sin embargo además de ser reconocido únicamente por este programa, en el sitio SA3 tuvo una disminución en el score de 10 unidades, pasando de 0.17 del WT al 0.07 del MUT. Usando el ASSP no se detectaron diferencias entre secuencia MUT ni WT y en ambas se detectaron los cuatro SD, respecto a los SA, solo se reconocieron el 1 y 2. Ninguno de los programas pudo detectar el sitio aceptor 4 (Fig.16 y anexo 1).

Minigen c.-19T>C

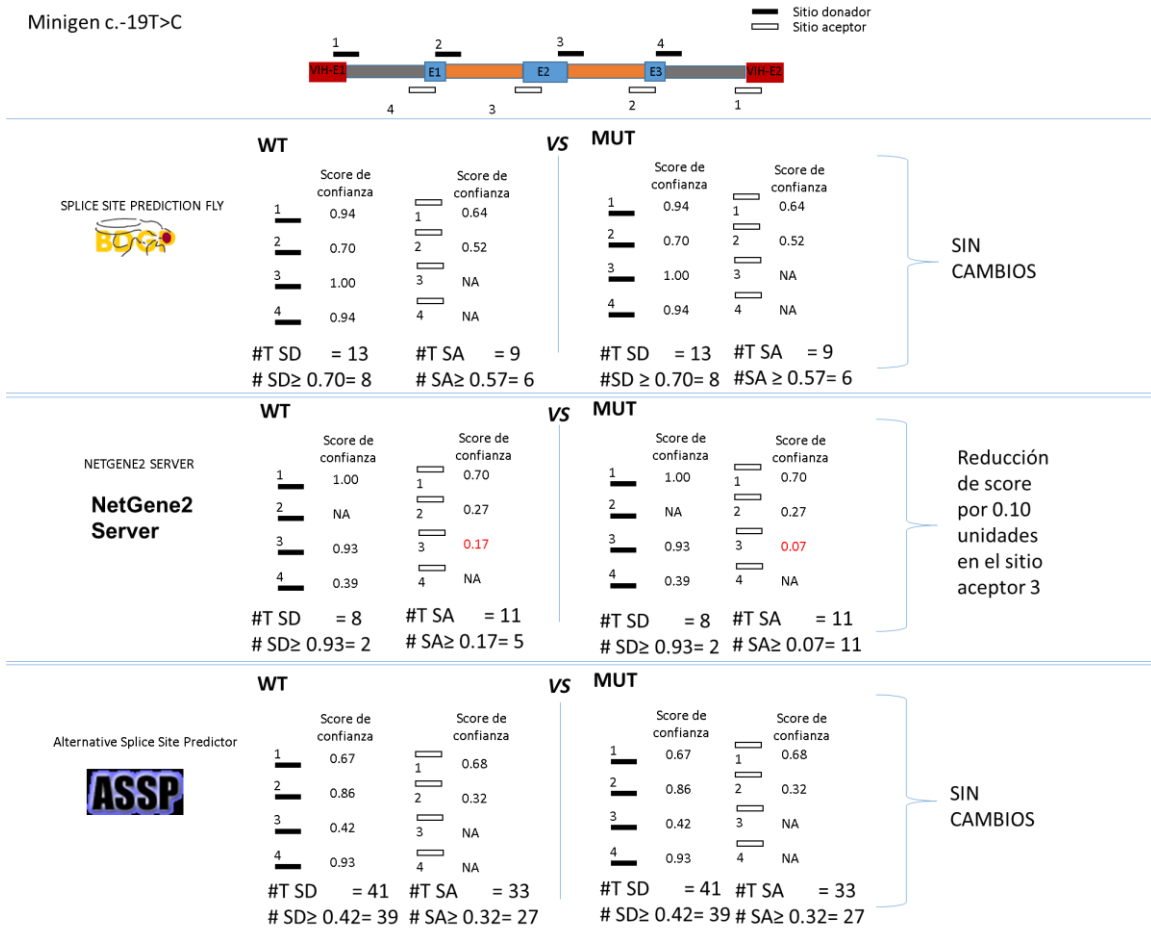


Fig.16. Validación de secuencias canónicas de minigen c.-19T>C con tres diferentes programas: SSP FLY, netgene2 y ASSP. #T SD: número total del sitios donadores detectados. # SD≥: número de sitios donadores mayores o iguales al score con unidades más bajas. #T SA: número total del sitios aceptores detectados. # SA≥: número de sitios aceptores mayores o iguales al score con unidades más bajas. NA: no hubo reconocimiento.

Minigen c.4485-64C>G: Usando SSP, tanto en WT y MUT se encontraron los cuatro SD y tres de los SA (1, 2 y 3) y se encontró una diferencia en el total de sitios donadores entre WT y MUT, ya que en este último, un posible SD es eliminado. Al usar NS2 en ambas secuencias se reconocieron los cuatro SD y solo tres SA (1,2 y 3); además, el número total de SA y SD permaneció igual, por lo que no hubo diferencias entre WT y MUT. Usando el ASSP también se logró reconocer los cuatro SD y tres de los cuatro SA, en ambas secuencias. Sin embargo hay una diferencia en el total de sitios aceptores entre WT y MUT ya que en este último se genera un nuevo y posible sitio aceptor (Fig.17 y Anexo 2).

Minigen c.4485-64 C>G

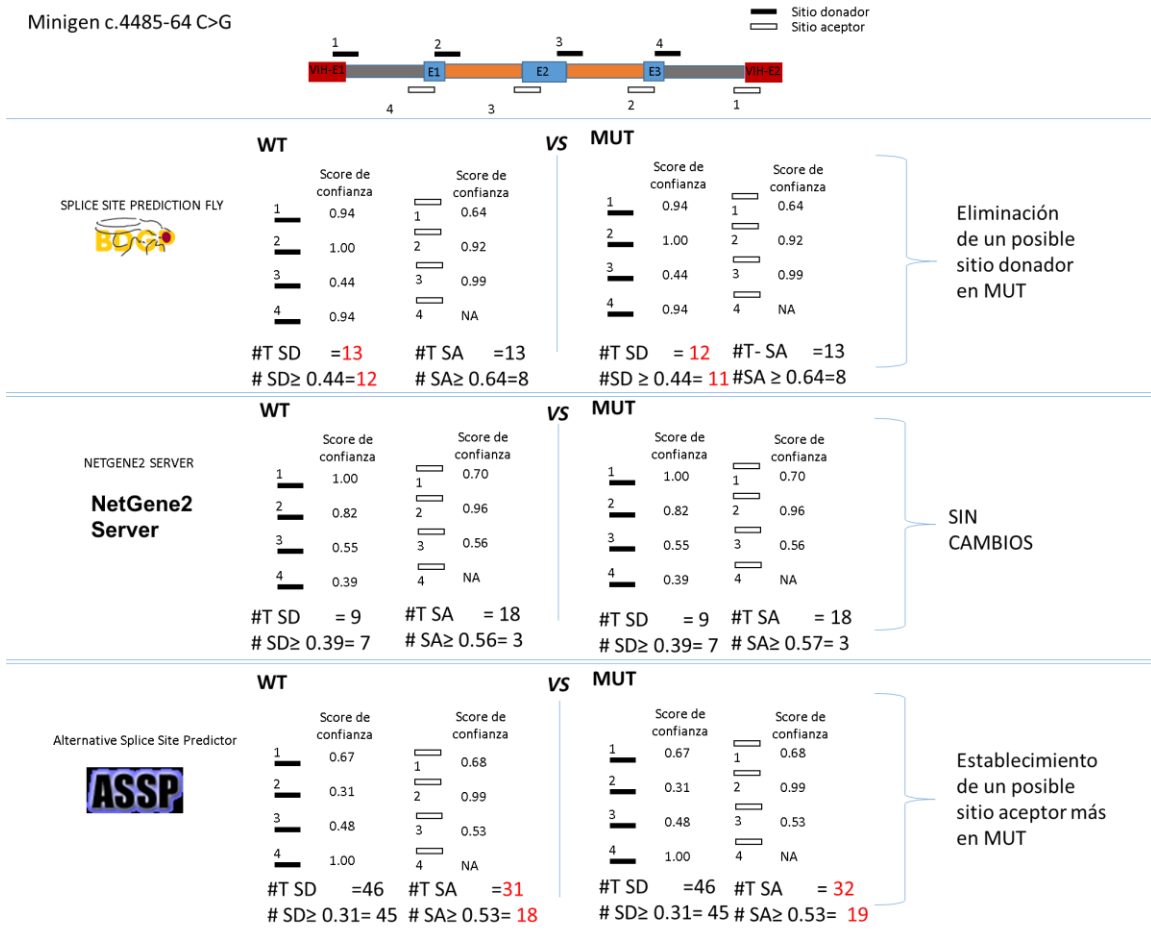


Fig.17. Validación de secuencias canónicas de minigen c.4485-64C>G con tres diferentes programas: SSP FLY, netgene2 y ASSP. #T SD: número total del sitios donadores detectados. #SD≥: número de sitios donadores mayores o iguales al score con unidades más bajas. #T SA: número total del sitios aceptores detectados. #SA≥: número de sitios aceptores mayores o iguales al score con unidades más bajas. NA: no hubo reconocimiento.

Reconocimiento y modificación de secuencias reguladoras de splicing.

Con ayuda del programa Human splicing finder que integra la información de varios programas se hizo el reconocimiento de posibles secuencias reguladoras, tanto en el minigen WT como en su versión MUT. Este programa identificó algunas potenciales secuencias o motivos a las que diversas proteínas reguladoras podrían unirse y lo organizo de acuerdo a un score de afinidad que va de 0 a 100 unidades, siendo 100 el valor más alto de afinidad.

Minigen c.19T>C: En este análisis se observó que en la secuencia Mut, a diferencia del WT, se generaron dos motivos enhancer, uno para la proteína SRp40 el cual cuenta con un score muy alto de afinidad, (>80 unidades) y otro para una proteína SR Octamerica. Además se perdió un motivo de unión para la proteína SC35 y se genera un potencial motivo ESS (Fig. 18A).

Minigen c.4485-64C>G: En el análisis se encontró que en la secuencia Mut, se eliminaron tres sitios enhancer, dos para SF2 y uno para SC3 y dos secuencias ESS. También se generó un sitio para SF2 en el mismo lugar donde se encontraba el sitio para SC35 (Fig. 18B)

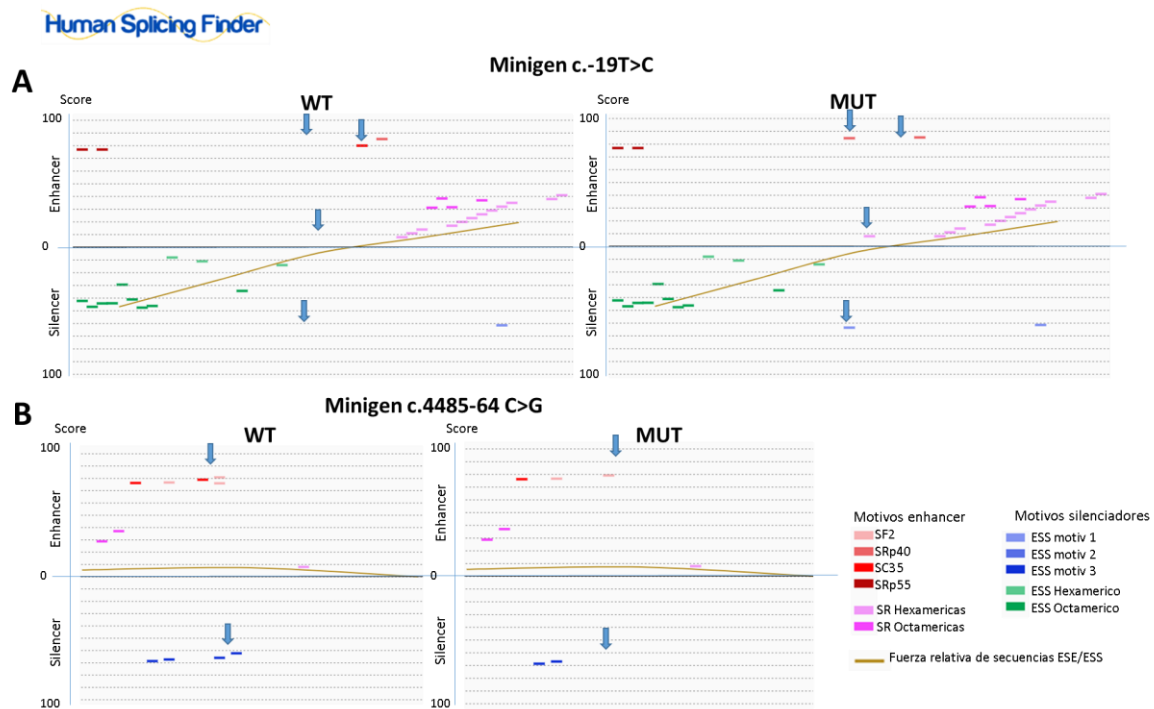


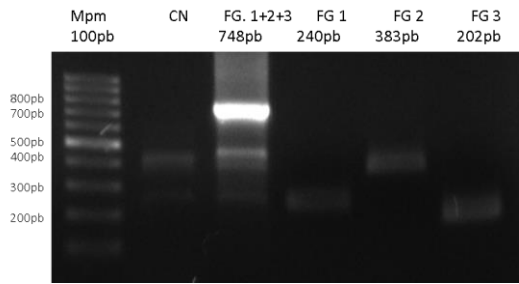
Fig.18. Reconocimiento y modificación de secuencias reguladoras de splicing. A. minigen c.-19T>C. B. minigen c.4485-64 C>G.

6.2. Construcción de minigenes.

Amplificación y ensamblaje por OE-PCR

Por medio de reacciones independientes de PCR se hizo la amplificación de cada fragmento y por medio de una cuarta reacción fueron ensamblados y finalmente visualizados en un gel de agarosa al 1 %. El método de OE-PCR permitió ensamblar los minigenes *in vitro* exitosamente (Fig. 19)

A Minigen c.-19T>C



B Minigen c.4485-64C>G

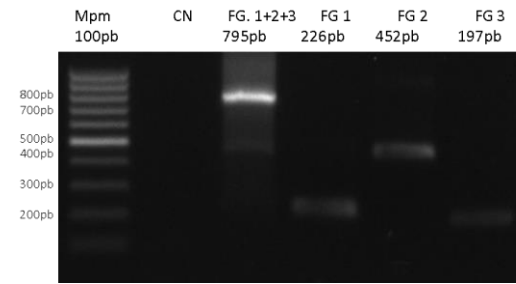
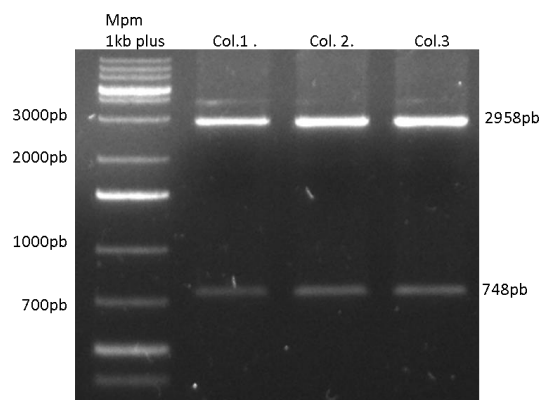


Fig. 19. Geles de agarosa al 1% para verificar la amplificación y ensamblaje. Panel A: Minigen c.-19 T>C, carriles de izquierda a derecha: CN: Control negativo de OE-PCR. FG. 1+2+3: banda de 748 pb al hacer la unión de los tres fragmentos. FG1: Amplicón del fragmento 1 de 240 pb. FG2: Amplicón del fragmento 2 de 383 pb y FG3: Amplicón del fragmento 3 de 202. Panel B: Minigen c.-4485 C>G, CN: Control negativo de OE-PCR. FG. 1+2+3: banda de 795 pb al hacer la unión de los tres fragmentos. FG1: Amplicón del fragmento 1 de 226 pb. FG2: Amplicón del fragmento 2 de 452 pb y FG3: Amplicón del fragmento 3 de 197.

Ligación en vector de clonación.

Los amplicones producto de OE-PCR se ligaron al vector pBluescript KS (+) y la construcción se verificó por restricción (Fig. 20)

A Minigen c.-19T>C



B Minigen c.4485-64C>G

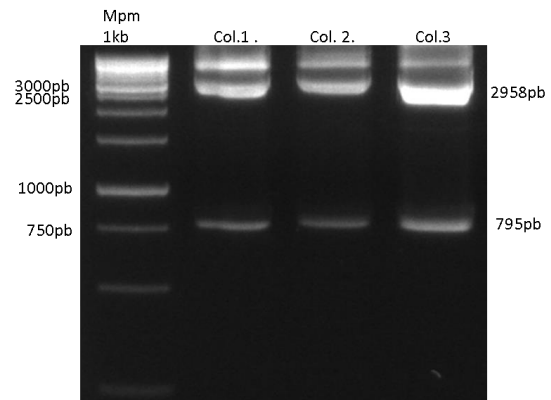


Fig. 20. Geles de agarosa al .8 % para verificar las construcciones en pBluescript (t). Panel A: Minigen c.-19 T>C, carriles de izquierda a derecha: Mpm: marcador de peso molecular 1 kilobase plus, colonia 1, 2 y 3, cada una con la banda producto del vector linealizado de 2958 pb y con la banda del inserto liberado de 748 pb. Panel B: Minigen c.-4485 C>G, Mpm: marcador de peso molecular 1kilobase, colonia 1, 2 y 3, cada una con la banda producto del vector linealizado de 2958 pb y con la banda del inserto liberado de 795 pb.

Subclonación en vector de expresión.

Los insertos, una vez clonados y verificada su secuencia, se liberaron y se subclonaron en el vector de expresión pSPL3. De igual forma se hizo un ensayo de restricción para verificar la presencia y el tamaño de los insertos (Fig. 21)

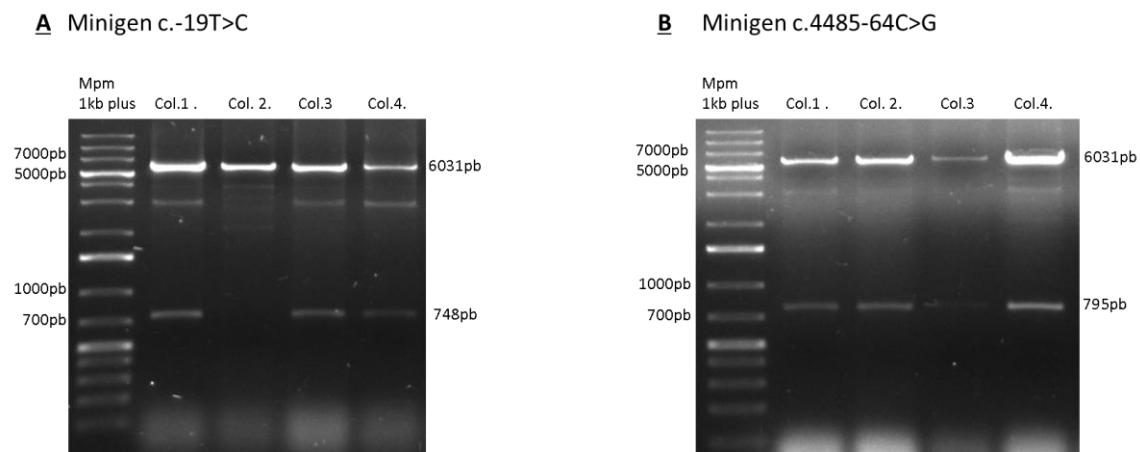


Fig. 21. Geles de agarosa al .8 % para verificar las construcciones en pSPL3. Panel A: Minigen c.-19 T>C, carriles de izquierda a derecha: Mpm: marcador de peso molecular 1kilobase plus, colonia 1, 2, 3 y 4 cada una con la banda producto del vector linearizado de 6031pb y con la banda del inserto liberado de 748 pb a excepción de la colonia 2. Panel B: Minigen c.-4485 C>G, Mpm: marcador de peso molecular 1kilobase plus, colonia 1, 2, 3 y 4 cada una con la banda producto del vector linearizado de 6031pb y con la banda del inserto liberado de 795 pb.

Mutación sitio-dirigida

Una vez aplicada la metodología de mutagénesis, las mutaciones fueron verificadas por secuenciación Sanger (Fig. 20).

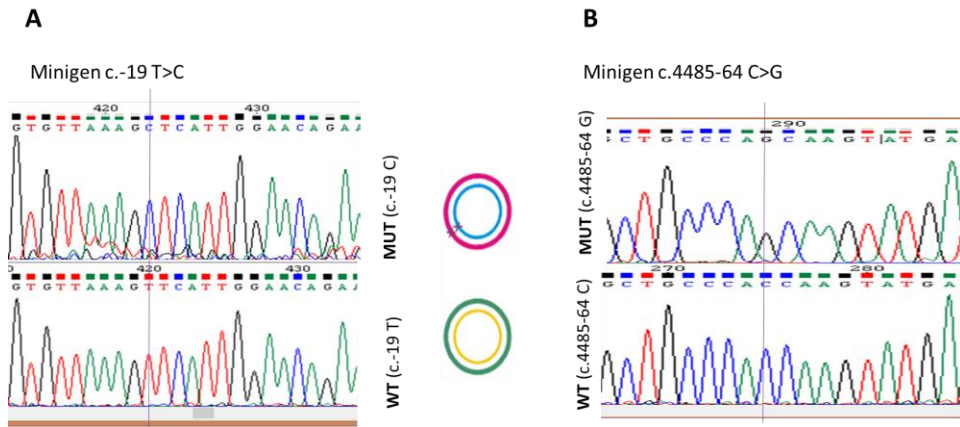


Fig.22.Alineamiento de secuencias. Wild Type y Mutantes. A. Minigen c.-19T>C y B. Minigen c.4485-64 C>G

6.3. Análisis de *splicing* por RT-PCR.

Se observaron los transcritos obtenidos por RT-PCR de los cuatro grupos experimentales: control- HeLa, mock- pSPL3, pSPL3+minigen wt y pSPL3+minigen mutante.

Minigen c.-19 T>C: En la figura 23 se muestran los transcritos detectados a partir de las construcciones en pSPL3. En las células HeLa sin transfectar no se observó amplificación, lo que indica que las bandas observadas en los demás carriles proceden de las construcciones transfectadas. El amplicón de 263 pb que se observa en los demás grupos corresponde al *splicing* esperado del plásmido pSPL3 parental. En el tercer carril con el minigen WT se observaron cinco bandas, de 263 pb, 362 pb, 386 pb, 519 pb y 543 pb. El amplicón de 263 pb corresponde al producto del *splicing* de los exones del plásmido control. El de 362 pb es producto del *splicing* entre los exones del vector y el exón 2 (E2), el amplicón de 386 pb corresponde al *splicing* de los exones del vector con los exones 1 y 3 (E1 y E3), la banda de 519 pb es producto del *splicing* entre el exón VIH1, E2 el VIH2+152 nt de intrón del vector, la última banda de 543 pb corresponde al *splicing* entre VIH1 con E1, E3 y VIH2+152 nt. En el cuarto carril se encuentra el grupo del minigen mutante el cual tiene las mismas bandas que el Minigen. WT, con una intensidad mayor de los amplicones de 362 pb y 519 pb y una menor en los de 263 pb y 386 pb al WT.

Minigen c.-19T>C

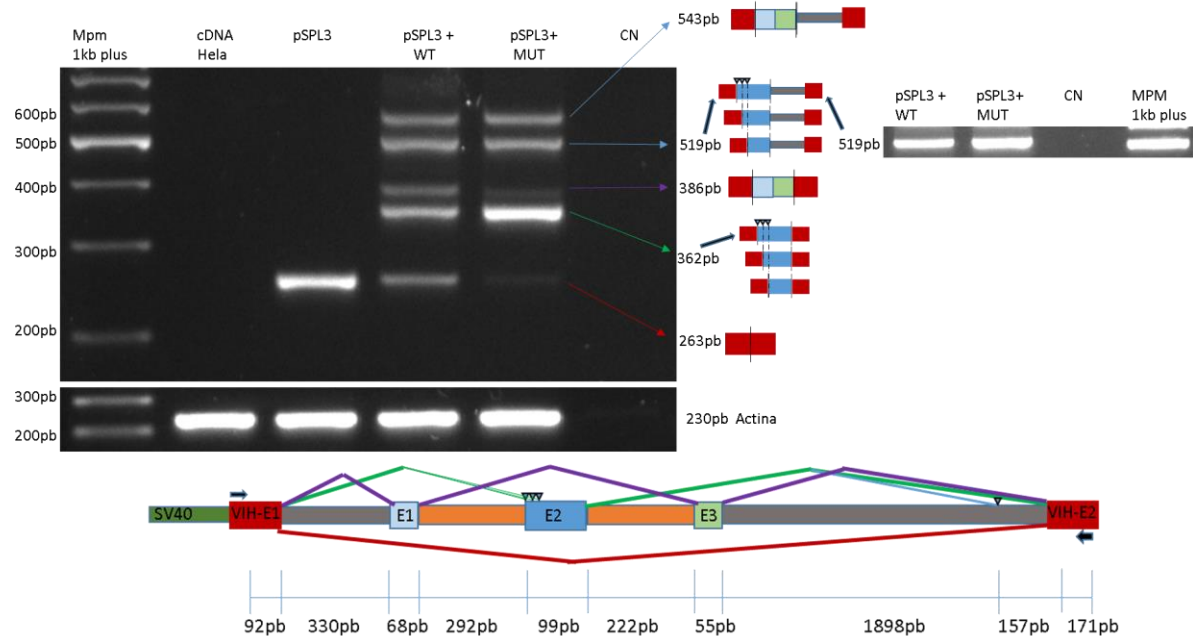


Fig.23. Gel de agarosa al 3 % con productos de RT-PCR de minigen c.-19T>C. Carriles de izquierda a derecha: Mpm: marcador de peso molecular 100pb, grupo control HeLa, Mock- psp3 con amplicón de 263 pb, psp3+WT y psp3+MUT con amplicones de 263 pb, 362 pb, 386 pb, 519 pb y 543 pb. Cada banda producto de diferente splicing.

Minigen c.-4485-64C>G: En la figura 24 se muestran los transcritos detectados a partir de las construcciones en pSPL3. En las células HeLa sin transfectar no se observó amplificación, lo que indica que las bandas observadas en los demás carriles proceden de las construcciones transfectadas. El amplicón de 263 pb que se observa en el segundo carril corresponde al *splicing* esperado del plásmido pSPL3 parental. En el tercer carril con el minigen WT se observaron dos bandas, de 263 pb y 639 pb. El amplicón de 263 pb corresponde al producto del *splicing* de los exones del plásmido control y el de 639 pb es producto del *splicing* entre todos los exones del minigen. En el cuarto carril mutante se observaron las mismas bandas del carril anterior. En el quinto carril se observa el minigen de longitud completa sin sufrir *splicing* amplificado directamente a partir del vector pSPL3+WT.

Minigen c.4485-64C>G

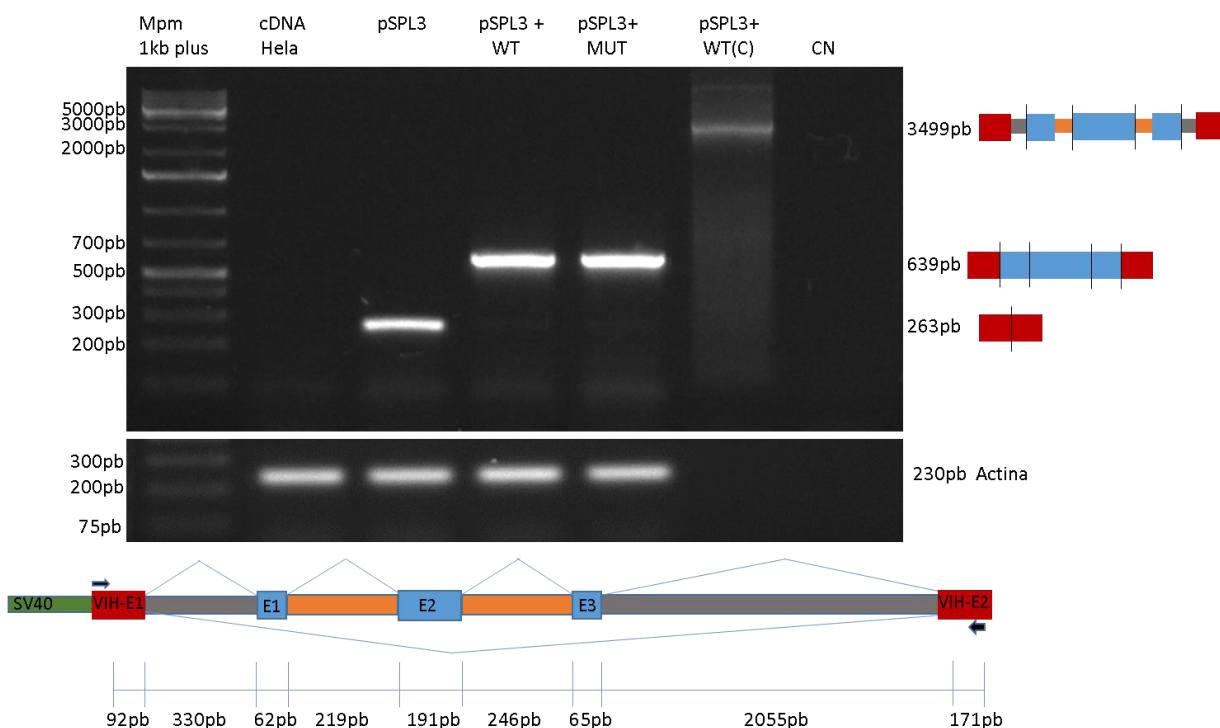


Fig.24. Gel de agarosa al 1% con productos de RT-PCR de minigen c.4485 C>G. Carriles de izquierda a derecha: Mpm: marcador de peso molecular 1kb plus, grupo control HeLa, Mock- psp13 con amplicón de 263 pb, psp13+WT con amplicones de 263 pb y 639 pb, psp13+MUT con amplicones de 263 pb y 639 pb. psp13+WT(c) es decir minigen sin transfectar con un amplicón de 3499 pb.

7. Discusión.

En este proyecto evaluamos el efecto funcional de dos mutaciones puntuales del gen BRCA1 sobre el *splicing*: la mutación c.-19T>C, que tuvo un efecto en el *splicing* y la mutación c.4485-64C>G que no lo tuvo.

De acuerdo con nuestro análisis, la mutación, c.4485-64C>G puede ser catalogada como benigna. El patrón de *splicing* resultante fue el mismo tanto en el WT (4485-64C) como en la mutación (c.4485-64C>G), en cantidad de variantes y número de amplicones por transcrito, coincidiendo con las predicciones bioinformáticas.

Esta mutación se ubica en el intrón 14, 64 bases antes del inicio del exón 15, por lo que, al tratarse de una mutación intrónica, la probabilidad de que no tuviera un efecto en el *splicing* es mayor. Los intrones son secuencias importantes, pues entre sus funciones, podrían considerarse esponjas de mutaciones: al no ser parte de la secuencia codificante las mutaciones en ellos podrían conservarse sin afectar la codificación (Jurica & Moore, 2003). Sin embargo, un cúmulo de mutaciones, o bien una mutación en un sitio estratégico, podrían modificar elementos regulatorios presentes en el intrón y con consecuencias patogénicas, por lo que el análisis funcional detallado sigue siendo necesario. Se han reportado mutaciones intrónicas con efectos deletéreos, como la mutación c.6430-3C>G en el gen F8 (involucrado en la coagulación sanguínea), conduce a una proteína trunca que desencadena el desarrollo de hemofilia A (Xia *et al.*, 2018), mientras que una mutación puntual en el intrón 7 del gen E1a PHD promueve la unión del factor de *splicing* SC35, que origina la retención de un fragmento del intrón por el uso de un sitio críptico en el 5', lo que culmina en un pobre desarrollo mental (Miné *et al.*, 2003).

En cuanto al minigen c.-19T>C, el ensayo de *splicing* mostró modificaciones importantes, por lo que se trata de una mutación potencialmente patogénica. Ninguno de los amplicones encontrados resultó de la unión de los 5 exones, lo que podría deberse a la baja afinidad del sitio aceptor del exón 2, como lo muestran los análisis *in silico* donde, de los tres programas para identificar sitios canónicos y crípticos, solo uno logro identificar el sitio aceptor 3 (ver figura 16 y/o anexo 1) mismo al que le fue asignado un score de afinidad muy bajo. Sin embargo, el fragmento de nuestro interés por contener la mutación se ve implicado en el patrón de transcritos obtenidos, por lo que valida nuestro estudio sin dejar de considerar las diferencias en el contexto celular y de secuencia con respecto al gen BRCA completo.

La mutación c.-19T>C ubicada en el primer nucleótido del exón 2, generó un cambio en la cantidad de transcritos como consecuencia de la posible generación de dos transcritos alternativos nuevos, pese a que los análisis *in silico* no detectaran ningún cambio significativo (comparar Fig.16, 18A y Fig. 23).

Al inducir la mutación, el patrón de splicing cambia respecto al WT, lo que favorece la presencia de dos versiones alternativas, las cuales carecen de 13 y 17 nucleótidos del primer exón. Esta mutación modifica el sitio aceptor del exón 2, donde, según el análisis del servidor NetGene2Server, el sitio aceptor reduce su afinidad al complejo de splicing (ver figura 16 y/o anexo1); al hacer esto, el nuevo score asignado al sitio aceptor se iguala al score de 2 sitios aceptores crípticos que se encuentran muy cerca del sitio canónico, dentro del exón 2 (ver anexo1). Además de ello, según el análisis del programa Human splicing finder, se identifica la creación de dos nuevos sitios de reconocimiento para proteínas SR, lo que en conjunto podría propiciar la generación de tres transcritos con diferencias de 13 y 17 nt respecto al transcrito canónico; de esta forma puede explicarse la mayor área de las bandas de 362 y 519 pb del Mut respecto al WT (ver figura 23). Un resultado similar fue publicado por Fernández-Guerra *et al.*, (2010) donde observan que la mutación c.288+9C>T clonada en el vector pSPL3 induce la generación de un transcrito nuevo que retiene 7 nucleótidos del intrón 2 del gen BCKDHA, lo cual acumula tanto en transcrito wt como el mutante a manera de una sola banda más brillante resuelta en un gel de agarosa. Además en este experimento se evidencia la presencia de un sitio aceptor críptico dentro del intrón del vector, lo cual lleva a la retención de 157 pb y justifica el tamaño de los amplicones que aparecen en nuestro estudio (ver figura 23).

Si bien el efecto de esta mutación no compromete la integridad de la secuencia codificante de mRNA de BRCA1, si modificaría la región 5'UTR de la que el exón 1 y parte del exón 2 de BRCA1 hacen parte. Además, los efectos identificados, debido a su cercanía con el codón de inicio de la traducción podrían jugar un papel importante en su regulación, por lo que no podríamos descartar un posible efecto patogénico, ya que hay reportes de mutaciones que pueden afectar a la proteína al verse modificada esta región. Por ejemplo, una mutación puntual en el gen del receptor de andrógeno que genera un *upstream open reading frame* (uORF) lo que en consecuencia genera un polipéptido de 63 aminoácidos y una disminución notable de proteína (Hornig *et al.*, 2016). Bajo este mismo panorama, otra mutación en la 5'-UTR del gen IFITM5 también genera un codón de inicio

arriba del codón de inicio canónico, lo que culmina en la adición de 5 aminoácidos a la secuencia original de la proteína (Semler *et al.*, 2012).

En el caso del transcrito sin modificación en el splicing, la mutación c.-19T>C permanecería como parte de la secuencia y por si misma jugaría un papel importante en la traducción debido a su cercanía con el sitio de inicio de la traducción, tal como en un par de trabajos donde se probó que las mutaciones c.-2A>T y c.-3G>C ubicadas en la región 5'UTR regulan a la baja la traducción de la proteína debido a la modificación de las secuencias de reconocimiento del ribosoma (Signori *et al.*, 2001; J. Wang, Lu, Min, Wang, & Ma, 2007). O bien, debido a la interacción diferencial con diversas proteínas como las *RNA binding proteins* que reconocen motivos de unión a RNA principalmente en la región 5' y 3'UTR y regulan la estabilidad del mensajero así como su traducción (Abdelmohsen, 2012).

Además de estas posibles intervenciones en la traducción de la proteína, la mutación también podría modificar la estructura secundaria de la 5'UTR del mensajero, la cual se ha identificado como un potente blanco de regulación epigenética por miRNAs que al modificarse, puede afectar su interacción (Gu *et al.*, 2014)

Con base en la evidencia experimental de este trabajo y los reportes de la literatura, la mutación podría ser catalogada como una *splice site mutation* potencialmente maligna. Sin embargo, habría que hacer más análisis funcionales estudiando principalmente la región 5'UTR y las proteínas con las que interactúa, así como también analizar los potenciales efectos de esta mutación en la regulación de la traducción proteína.

Las mutaciones analizadas demuestran la necesidad de seguir estudiando VUS, ya que las predicciones bioinformáticas no son lo suficientemente confiables aún para predecir los efectos de las mutaciones, aunque es claro que hay cierta consistencia entre las predicciones de los diferentes software. Sin embargo sigue siendo necesario estudiar a nivel funcional cada mutación para entender bien su papel en el desarrollo de enfermedades, de tal manera que el tener caracterizado el

mayor número de mutaciones podrá ayudar al mejor diagnóstico del Cáncer de Mama y, por lo tanto, a una selección más precisa del tratamiento adecuado.

8. Conclusiones

-La mutación c.-19T>C altera el patrón de splicing de BRCA1 favoreciendo la aparición de transcritos alternativos. Puede ser catalogada como una *splice site mutation* potencialmente patogénica.

-La mutación c.4485-64C>G no tiene ningún efecto sobre el splicing de BRCA1 por lo que se catalogaría como una mutación benigna.

-Las predicciones bioinformáticas de la influencia de mutaciones en el *splicing* no son totalmente consistentes con los resultados de ensayos funcionales.

9. Perspectivas

- Evaluar el efecto de la mutación c.-19T>C en el splicing del gen BRCA1 completo

- Analizar los componentes diferenciales del spliceosoma que se unen diferencialmente al exón de BRCA1 con la mutación c.-19T>C

- Evaluar el efecto de la mutación c.-19T>C en la regulación de la traducción

10. Bibliografía.

- Alekseyenko, A. V., Kim, N., & Lee, C. J. (2007). Global analysis of exon creation versus loss and the role of alternative splicing in 17 vertebrate genomes. *RNA (New York, N.Y.)*, 13(5), 661–670. <https://doi.org/10.1261/rna.325107>
- Anderson, S. F., Schlegel, B. P., Nakajima, T., Wolpin, E. S., & Parvin, J. D. (1998). BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nature Genetics*, 19(3), 254–256. <https://doi.org/10.1038/930>
- Baralle, D., & Baralle, D. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet*, 42, 737–748. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.029538>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Busch, A., & Hertel, K. J. (2012). Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/wrna.100>
- Bérout, C., Collod-Bérout, G., Boileau, C., Soussi, T., & Junien, C. (2000). UMD (Universal Mutation Database): A generic software to build and analyze locus-specific databases. *Human Mutation*, 15(1), 86–94. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<86::AID-HUMU16>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<86::AID-HUMU16>3.0.CO;2-4)
- Cartegni, L., Chew, S. L., & Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*, 3(4), 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrg775>
- Clark, S. L., Rodriguez, A. M., Snyder, R. R., Hankins, G. D. V., & Boehning, D. (2012). Structure-Function of the Tumor Suppressor Brca1. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 1(1), e201204005. <https://doi.org/10.5936/csbj.201204005>
- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., & Ezzati, M. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*, 366(9499), 1784–1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67725-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67725-2)
- Deng, C. X. (2006). BRCA1: Cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Research*, 34(5), 1416–1426. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl010>
- Desmet, F.-O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., & Bérout, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*, 37(9), e67–e67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>

- Disset, A., Bourgeois, C. F., Benmalek, N., Claustres, M., Stevenin, J., & Tuffery-Giraud, S. (2006). An exon skipping-associated nonsense mutation in the dystrophin gene uncovers a complex interplay between multiple antagonistic splicing elements. *Human Molecular Genetics*, *15*(6), 999–1013. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl015>
- Dizdar, O., Arslan, C., & Altundag, K. (2015). Advances in PARP inhibitors for the treatment of breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *16*(18), 2751–2758. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.1100168>
- Eccles, B. K., Copson, E., Maishman, T., Abraham, J. E., & Eccles, D. M. (2015). Understanding of BRCA VUS genetic results by breast cancer specialists. *BMC Cancer*, *15*, 936. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1934-1>
- Esposito, M. V., Nunziato, M., Starnone, F., Telese, A., Calabrese, A., D'Aiuto, G., ... Salvatore, F. (2016). A novel pathogenic BRCA1 splicing variant produces partial intron retention in the mature messenger RNA. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12), 1–9. <https://doi.org/10.3390/ijms17122145>
- Fernández-Guerra, P., Navarrete, R., Weisiger, K., Desviat, L. R., Packman, S., Ugarte, M., & Rodríguez-Pombo, P. (2010). Functional characterization of the novel intronic nucleotide change c.288+9C>T within the BCKDHA gene: understanding a variant presentation of maple syrup urine disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *33*(S3), 191–198. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9077-7>
- Fica, S. M., Tuttle, N., Novak, T., Li, N.-S., Lu, J., Koodathingal, P., ... Piccirilli, J. A. (2013). RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing. *Nature*, *503*(7475), 229–234. <https://doi.org/10.1038/nature12734>
- Godet, I., & Gilkes, D. M. (2017). BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, *4*(1). <https://doi.org/10.15761/ICST.1000228>
- Hahn, W. C., & Weinberg, R. A. (2002). Rules for Making Human Tumor Cells. *New England Journal of Medicine*, *347*(20), 1593–1603. <https://doi.org/10.1056/NEJMra021902>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hebsgaard, S. M., Korning, P. G., Tolstrup, N., Engelbrecht, J., Rouzé, P., & Brunak, S. (1996). Splice site prediction in Arabidopsis thaliana pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Research*, *24*(17), 3439–3452. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8811101>
- Higuchi, R., Krummel, B., & Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research*, *16*(15), 7351–7367. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3045756>
- Hornig, N. C., de Beaufort, C., Denzer, F., Cools, M., Wabitsch, M., Ukat, M., ...

- Holterhus, P.-M. (2016). A Recurrent Germline Mutation in the 5'UTR of the Androgen Receptor Causes Complete Androgen Insensitivity by Activating Aberrant uORF Translation. *PLoS One*, 11(4), e0154158. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154158>
- Hoskins, A. A., & Moore, M. J. (2012). The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(5), 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.02.009>
- Jurica, M. S., & Moore, M. J. (2003). Pre-mRNA Splicing: Awash in a Sea of Proteins. *Molecular Cell*, 12(1), 5–14. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00270-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00270-3)
- Ke, S., Zhang, X. H.-F., & Chasin, L. A. (2008). Positive selection acting on splicing motifs reflects compensatory evolution. *Genome Research*, 18(4), 533–543. <https://doi.org/10.1101/gr.070268.107>
- Kim, E., Goren, A., & Ast, G. (2008). Alternative splicing: current perspectives. *BioEssays*, 30(1), 38–47. <https://doi.org/10.1002/bies.20692>
- Kowalczykowski, S. C. (2015). An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410>
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G., Chao, C., Chitipiralla, S., ... Maglott, D. R. (2016). ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D862-8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1222>
- Larsen, M. J., Kruse, T. A., Tan, Q., Lænkholm, A.-V., Bak, M., Lykkesfeldt, A. E., ... Thomassen, M. (2013). Classifications within molecular subtypes enables identification of BRCA1/BRCA2 mutation carriers by RNA tumor profiling. *PLoS One*, 8(5), e64268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064268>
- Levesque, S., Morin, C., Guay, S.-P., Villeneuve, J., Marquis, P., Yik, W. Y., ... Braverman, N. E. (2012). A founder mutation in the PEX6 gene is responsible for increased incidence of Zellweger syndrome in a French Canadian population. *BMC Medical Genetics*, 13, 72. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-13-72>
- López-Urrutia, E., Salazar-Rojas, V., Brito-Elías, L., Coca-González, M., Silva-García, J., Sánchez-Marín, D., ... Pérez-Plasencia, C. (2018). BRCA mutations: is everything said? *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4986-5>
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., ... Bogden, R. (1994). A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Source: Science, New Series (Vol. 266)*. Retrieved from <https://courses.washington.edu/gs466/readings/miki.pdf>
- Miné, M., Brivet, M., Touati, G., Grabowski, P., Abitbol, M., & Marsac, C. (2003). Splicing error in E1alpha pyruvate dehydrogenase mRNA caused by novel intronic mutation responsible for lactic acidosis and mental retardation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 11768–11772.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M211106200>

- Osborne, C. K. (1998). Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 339(22), 1609–1618.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199811263392207>
- Ouchi, T., Lee, S. W., Ouchi, M., Aaronson, S. A., & Horvath, C. M. (2000). Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5208–5213. <https://doi.org/10.1073/pnas.080469697>
- Pao, G. M., Janknecht, R., Ruffner, H., Hunter, T., & Verma, I. M. (2000). CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3), 1020–1025.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1020>
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Protocols. (2017, September 1). OpenWetWare, . Retrieved 18:46, April 29, 2019 from
<https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=Protocols&oldid=992179>.
- Roy, R., Chun, J., & Powell, S. N. (2011a). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews. Cancer*, 12(1), 68–78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>
- Roy, R., Chun, J., & Powell, S. N. (2011b). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews. Cancer*, 12(1), 68–78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>
- Sanz, D. J., Acedo, A., Durán, M., Pérez-Cabornero, L., Esteban-Cardenosa, E., Lastra, E., ... Velasco, E. A. (2010). Susceptibility and Prevention A High Proportion of DNA Variants of BRCA1 and BRCA2 Is Associated with Aberrant Splicing in Breast/Ovarian Cancer Patients. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2564>
- Sanz, D. J., Acedo, A., Infante, M., Durán, M., Pérez-Cabornero, L., Esteban-Cardenosa, E., ... Velasco, E. A. (2010). A High Proportion of DNA Variants of BRCA1 and BRCA2 Is Associated with Aberrant Splicing in Breast/Ovarian Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 16(6), 1957–1967.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2564>
- Semler, O., Garbes, L., Keupp, K., Swan, D., Zimmermann, K., Becker, J., ... Netzer, C. (2012). A mutation in the 5'-UTR of IFITM5 creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. *American Journal of Human Genetics*, 91(2), 349–357.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.06.011>
- Stoppa-Lyonnet, D. (2016). The biological effects and clinical implications of BRCA

- mutations: where do we go from here? *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 24 Suppl 1(Suppl 1), S3-9. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.93>
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>
- Sung, P., & Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(10), 739–750. <https://doi.org/10.1038/nrm2008>
- Szabo, C., Masiello, A., Ryan, J. F., Brody, L. C., & Brody, L. C. (2000). The Breast Cancer Information Core: Database design, structure, and scope. *Human Mutation*, 16(2), 123–131. [https://doi.org/10.1002/1098-1004\(200008\)16:2<123::AID-HUMU4>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1098-1004(200008)16:2<123::AID-HUMU4>3.0.CO;2-Y)
- Takeda, J., Suzuki, Y., Nakao, M., Kuroda, T., Sugano, S., Gojobori, T., & Imanishi, T. (2007). H-DBAS: alternative splicing database of completely sequenced and manually annotated full-length cDNAs based on H-Invitational. *Nucleic Acids Research*, 35(Database issue), D104-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl854>
- Vaca-Paniagua, F., Alvarez-Gomez, R. M., Fragoso-Ontiveros, V., Vidal-Millan, S., Herrera, L. A., Cantú, D., ... Pérez-Plasencia, C. (2012). Full-Exon Pyrosequencing Screening of BRCA Germline Mutations in Mexican Women with Inherited Breast and Ovarian Cancer. *PLoS ONE*, 7(5), e37432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037432>
- Wang, M., & Marín, A. (2006). Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene*, 366(2), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.07.015>
- Wang, Q., Zhang, H., Kajino, K., & Greene, M. I. (1998). BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. *Oncogene*, 17(15), 1939–1948. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202403>
- Warzecha, C. C., Sato, T. K., Nabet, B., Hogenesch, J. B., & Carstens, R. P. (2009). ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing. *Molecular Cell*, 33(5), 591–601. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.025>
- Wong-Brown, M. W., Meldrum, C. J., Carpenter, J. E., Clarke, C. L., Narod, S. A., Jakubowska, A., ... Scott, R. J. (2015). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 150(1), 71–80. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3293-7>
- Xia, Z., Lin, J., Lu, L., Kim, C., Yu, P., & Qi, M. (2018). An intronic mutation c.6430-3C>G in the F8 gene causes splicing efficiency and premature termination in hemophilia A. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 29(4), 381–386. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000730>
- Yang, Y., Swaminathan, S., Martin, B. K., & Sharan, S. K. (2003). Aberrant splicing induced by missense mutations in BRCA1: clues from a humanized mouse model. *Human Molecular Genetics*, 12(17), 2121–2131. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg222>

- Yersal, O., & Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 412. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412>
- Zepeda-Castilla, E. J., Recinos-Money, E., Cuéllar-Hubbe, M., Robles-Vidal, C. D., Maafs-Molina, E., & 61, S. (2008). *Clasificación molecular del cáncer de mama*. *Cir Ciruj* (Vol. 76). Retrieved from www.medigraphic.com
- Zhang, J., Kuo, C. C. J., & Chen, L. (2011). GC content around splice sites affects splicing through pre-mRNA secondary structures. *BMC Genomics*, 12, 90. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-90>
- Zhang, L., Vincent, G. M., Baralle, M., Baralle, F. E., Anson, B. D., Benson, D. W., ... Splawski, I. (2004). An intronic mutation causes long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 44(6), 1283–1291. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2004.06.045>
- Zheng, L., Pan, H., Li, S., Flesken-Nikitin, A., Chen, P.-L., Boyer, T. G., & Lee, W.-H. (2000). Sequence-Specific Transcriptional Corepressor Function for BRCA1 through a Novel Zinc Finger Protein, ZBRK1. *Molecular Cell*, 6(4), 757–768. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00075-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00075-7)

11. Anexos.

11.1 Anexo 1. Resultados in silico completos de las predicciones para el minigen c.-19T>C

Splice Site Prediction Fly

SPLICE SITE PREDICTION FLY



PspI3+M1 WT

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):

Donor site predictions for 132.248.216.217.2340.0: Acceptor site predictions for 132.248.216.217.2340.0:

Start	End	Score	Exon	Intron	Start	End	Score	Intron	Exon
86	100	0.94	cccagca	gtaagtaa	342	382	0.42	tgatgatctgtagtctaca	gaaaaattgtgggtcacagtc
385	399	0.59	ttatggg	gtacggga	419	459	0.69	cgaggctgtgggtttctca	gataactggccctgcgctc
484	498	0.70	gtaaaag	gtagtaga	1083	1123	0.52	tctccccctaccctgcta	gtctggagttgatcaaggaac
612	626	0.51	gagaaggc	gtaaggcg	1208	1248	0.79	ccactctattttgtcatca	gatgctaaagcatatgataca
875	889	1.00	ccatctg	gtaagtca	1271	1311	0.47	cacatgccggtgtaccaca	gacccaaccacaagaagta
1245	1259	0.94	tacagag	gtacataa	2390	2430	0.42	gatttcacaatattaca	gggctgctattaacaagagat
1311	1325	0.81	agtattg	gtaaatgt	3152	3192	0.64	tttttctgactttctgta	gtgaatagagttaggcagggga
1552	1566	1.00	ataaag	gtaagggtg	3193	3233	0.64	tattaccattatcgtttca	gacctggagatctcccagggg
1674	1688	0.78	tccaaag	gtatcctt	3295	3335	0.96	ttcgaccaattcactcctca	gggtcaggctcctatcagaa
1860	1874	0.57	agaagag	gtagtaat					
2354	2368	0.74	aagcaat	gtatgccc					
3129	3143	0.53	aggcttg	gtaggttt					
3309	3323	0.40	tcctcag	gtgcaggc					

SPLICE SITE PREDICTION FLY



PspI3+M1 MUT

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):

Donor site predictions for 132.248.216.217.2694.0: Acceptor site predictions for 132.248.216.217.2694.0:

Start	End	Score	Exon	Intron	Start	End	Score	Intron	Exon
86	100	0.94	cccagca	gtaagtaa	342	382	0.42	tgatgatctgtagtctaca	gaaaaattgtgggtcacagtc
385	399	0.59	ttatggg	gtacggga	419	459	0.69	cgaggctgtgggtttctca	gataactggccctgcgctc
484	498	0.70	gtaaaag	gtagtaga	1083	1123	0.52	tctccccctaccctgcta	gtctggagttgatcaaggaac
612	626	0.51	gagaaggc	gtaaggcg	1208	1248	0.79	ccactctattttgtcatca	gatgctaaagcatatgataca
875	889	1.00	ccatctg	gtaagtca	1271	1311	0.47	cacatgccggtgtaccaca	gacccaaccacaagaagta
1245	1259	0.94	tacagag	gtacataa	2390	2430	0.42	gatttcacaatattaca	gggctgctattaacaagagat
1311	1325	0.81	agtattg	gtaaatgt	3152	3192	0.64	tttttctgactttctgta	gtgaatagagttaggcagggga
1552	1566	1.00	ataaag	gtaagggtg	3193	3233	0.64	tattaccattatcgtttca	gacctggagatctcccagggg
1674	1688	0.78	tccaaag	gtatcctt	3295	3335	0.96	ttcgaccaattcactcctca	gggtcaggctcctatcagaa+
1860	1874	0.57	agaagag	gtagtaat					
2354	2368	0.74	aagcaat	gtatgccc					
3129	3143	0.53	aggcttg	gtaggttt					
3309	3323	0.40	tcctcag	gtgcaggc					

NetGene2 Server

NETGENE2 SERVER

**NetGene2
Server**

PspI3+M1 WT

Donor splice sites, direct strand

pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exón	intron	3'
93	1	+	1.00	CG	ACCCAGCA	^GTAAGTAATA	
619	0	+	0.34	CCTGAGAGGC	^GTAAGGCGTT		
882	2	+	0.93	GTCCCATCTG	^GTAAGTCAGC	H	
1318	0	+	0.55	AGTAGTATTG	^GTAAGTGGA		
1559	1	+	0.76	AGCATAAGAG	^GTAAGGTGCA		
1867	0	+	0.31	AGAAGAAGAG	^GTAGTAATTA		
2791	0	+	0.30	GCAGCTCCAG	^GCAAGAATCC		
3267	0	+	0.55	GAAGAAGAAG	^GTGGAGAGAG		

Acceptor splice sites, direct strand

pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
782	2	+	0.17	TGTGTTAAAG	^TTCATTGGAA		
795	0	+	0.07	ATTGGAACAG	^AAAGAAATGG		
799	1	+	0.07	GAACAGAAAG	^AAATGGATT		
1103	2	+	0.27	ACCCTGCTAG	^TCTGGAGTTG		
1228	1	+	0.25	TGTGCATCAG	^ATGCTAAAGC		
2638	2	+	0.14	GGAGCAGCAG	^GAAGCACTAT		
2642	0	+	0.07	CAGCAGAAAG	^CACTATGGGC		
2748	0	+	0.07	GGCGAACAG	^CATCTGTTGC		
3213	1	+	0.70	ATCGTTTCAG	^ACCTGGAGAT		
3221	0	+	0.25	AGACCTGGAG	^ATCTCCCGAG		
3231	1	+	0.30	ATCTCCCGAG	^GGGACCCGAC		

NETGENE2 SERVER

**NetGene2
Server**

PspI3+M1 MUT

Donor splice sites, direct strand

pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exón	intron	3'
93	1	+	1.00	CG	ACCCAGCA	^GTAAGTAATA	
619	0	+	0.34	CCTGAGAGGC	^GTAAGGCGTT		
882	2	+	0.93	GTCCCATCTG	^GTAAGTCAGC	H	
1318	0	+	0.55	AGTAGTATTG	^GTAAGTGGA		
1559	1	+	0.76	AGCATAAGAG	^GTAAGGTGCA		
1867	0	+	0.31	AGAAGAAGAG	^GTAGTAATTA		
2791	0	+	0.30	GCAGCTCCAG	^GCAAGAATCC		
3267	0	+	0.55	GAAGAAGAAG	^GTGGAGAGAG		

Acceptor splice sites, direct strand

pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
782	2	+	0.07	TGTGTTAAAG	^CTCATTGGAA		
795	0	+	0.07	ATTGGAACAG	^AAAGAAATGG		
799	1	+	0.07	GAACAGAAAG	^AAATGGATT		
1103	2	+	0.27	ACCCTGCTAG	^TCTGGAGTTG		
1228	1	+	0.25	TGTGCATCAG	^ATGCTAAAGC		
2638	2	+	0.14	GGAGCAGCAG	^GAAGCACTAT		
2642	0	+	0.07	CAGCAGAAAG	^CACTATGGGC		
2748	0	+	0.07	GGCGAACAG	^CATCTGTTGC		
3213	1	+	0.70	ATCGTTTCAG	^ACCTGGAGAT		
3221	0	+	0.25	AGACCTGGAG	^ATCTCCCGAG		
3231	1	+	0.30	ATCTCCCGAG	^GGGACCCGAC		

Alternative Splice Site Prediction

Sequence: PspI3+M1 WT							
Position (bp)	Putative splice site	Sequence	Score*	Intron GC*	Activations**		Confidence*
					Alt./Cryptic	Constitutive	
80	Alt. isoform/cryptic acceptor	cgtgtctctagAGTCGACCCA	2.918	0.529	0.879	0.115	0.869
92	Constitutive donor	CGACCCAGCAgtaagtaata	11.781	0.286	0.227	0.697	0.675
96	Alt. isoform/cryptic donor	CCAGCAGTAAgtaatacatg	4.743	0.286	0.724	0.197	0.728
105	Alt. isoform/cryptic donor	AGTAATACATgtaatgcaac	7.818	0.314	0.841	0.11	0.869
182	Alt. isoform/cryptic acceptor	tgttcacatgTAATCATAGA	3.497	0.329	0.861	0.137	0.841
227	Alt. isoform/cryptic donor	AAATAGACAAGttaattgat	9.261	0.371	0.743	0.194	0.738
363	Alt. isoform/cryptic acceptor	agtgtcacagAAAAATTGTG	5.11	0.543	0.841	0.158	0.812
369	Alt. isoform/cryptic donor	CAGAAAAATtgggttcaca	6.5	0.543	0.919	0.056	0.939
391	Alt. isoform/cryptic donor	CTATTATGGGttagggatc	6.078	0.586	0.862	0.1	0.884
440	Alt. isoform/cryptic acceptor	ggttctcagATAACTGGGC	4.775	0.543	0.739	0.241	0.673
462	Alt. isoform/cryptic donor	ctgcgctcagAGGCCTTCA	4.232	0.586	0.801	0.187	0.767
484	Alt. isoform/cryptic donor	TCTGCTCTGGtaaaagtag	6.451	0.6	0.632	0.287	0.546
490	Alt. isoform/cryptic donor	CTGGTAAAGtagtagagat	7.825	0.614	0.838	0.114	0.864
491	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctgggtaagGTAGTAGAGT	2.236	0.6	0.897	0.094	0.895
525	Alt. isoform/cryptic donor	GGGGGCCCAgtagtgcct	4.516	0.557	0.929	0.05	0.946
596	Alt. isoform/cryptic donor	TTGACGGGGGtaggggagg	8.823	0.514	0.834	0.114	0.863
618	Alt. isoform/cryptic donor	CCTGAGAGGctaaagcgtt	4.881	0.386	0.953	0.03	0.968
659	Alt. isoform/cryptic donor	TAGTCTTTGtggttgatta	6.635	0.2	0.861	0.099	0.885
830	Alt. isoform/cryptic acceptor	cgcttgaagAAGTACAAAA	4.927	0.329	0.876	0.121	0.862
831	Alt. isoform/cryptic donor	CGTTGAAAGAgtaacaaatg	5.672	0.386	0.762	0.181	0.762
859	Alt. isoform/cryptic acceptor	tgtatgcagAAAATCTTAG	2.946	0.371	0.939	0.058	0.938
881	Alt. isoform/cryptic donor	GTCCTCATGtgaatgcagc	12.08	0.343	0.583	0.333	0.429
965	Alt. isoform/cryptic acceptor	tacatactagGGAAGAAAAG	2.314	0.329	0.562	0.419	0.255
1001	Alt. isoform/cryptic acceptor	gttgactcagTCATAACAGC	3.138	0.386	0.837	0.157	0.812
1104	Alt. isoform/cryptic acceptor	acctgctagTCTGGAGTTG	3.545	0.329	0.588	0.397	0.325
1138	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctccacaaagTGTGACCA	2.355	0.457	0.741	0.248	0.665
1174	Alt. isoform/cryptic donor	CAGATATCTGgtatcccgt	4.793	0.457	0.914	0.064	0.93
1229	Alt. isoform/cryptic acceptor	tgtgcatcagATGCTAAAAG	6.478	0.5	0.621	0.358	0.424
1251	unclassified donor	TGATACAGAGgtacataatg	10.319	0.486	0.443	0.469	0
1292	Alt. isoform/cryptic acceptor	gtaccacagACCCCAACCC	4.224	0.471	0.718	0.272	0.621
1308	Alt. isoform/cryptic donor	CCCAACAAGAgtagtattgg	4.836	0.343	0.82	0.133	0.838
1317	Alt. isoform/cryptic donor	AGTAGTATTGgtaaatgtga	7.392	0.314	0.902	0.067	0.926
1359	Alt. isoform/cryptic donor	AAATGACATGgtaagaacaga	5.908	0.371	0.817	0.134	0.836
1437	Alt. isoform/cryptic donor	CCCACTGTGttagttaa	5.345	0.343	0.936	0.044	0.953
1443	Alt. isoform/cryptic acceptor	tctgttagTTTAAAGTGC	2.401	0.371	0.53	0.454	0.143
1545	Alt. isoform/cryptic acceptor	tcaatcagCACAAAGCATA	5.938	0.357	0.837	0.157	0.813
1558	Constitutive donor	AGCATAAAGGtaagggtca	12.762	0.271	0.108	0.851	0.873
1563	Alt. isoform/cryptic donor	AAGAGTAAAGgtcagaag	6.992	0.257	0.874	0.09	0.897
1669	Alt. isoform/cryptic acceptor	cattacacagCCTGTCCA	4.434	0.343	0.719	0.267	0.629
1680	Constitutive donor	CTGTCCAAAGgtatcctttg	11.3	0.386	0.316	0.599	0.473
1741	Alt. isoform/cryptic donor	ATTCTAAAATgtaataataa	7.247	0.371	0.881	0.081	0.908
1774	Alt. isoform/cryptic donor	ACAGGACCAgtacaaatgt	5.787	0.386	0.864	0.098	0.886
1782	Alt. isoform/cryptic donor	ATGTACAAAgtcagcacag	5.782	0.429	0.881	0.085	0.903
1798	Alt. isoform/cryptic donor	ACAGTACAAgtacacatgg	4.621	0.429	0.857	0.102	0.881
1866	Alt. isoform/cryptic donor	AGAAGAAGAGgtagtaatta	9.409	0.357	0.576	0.334	0.419
1914	Alt. isoform/cryptic donor	AACCATAATAgtagactga	4.842	0.329	0.916	0.058	0.937
2021	Alt. isoform/cryptic acceptor	gttacaatagAAAAAATAGG	4.885	0.414	0.637	0.339	0.467
2156	Alt. isoform/cryptic acceptor	caactcctcagGAGGGGACC	3.103	0.271	0.768	0.222	0.711
2236	Alt. isoform/cryptic donor	CTGTTAATAgtagtctggt	4.68	0.386	0.908	0.062	0.931
2253	Alt. isoform/cryptic acceptor	ggtttaatagTACTTGGAGT	2.931	0.3	0.746	0.244	0.673
2316	Alt. isoform/cryptic acceptor	tccatcagAATAAAACAA	4.589	0.414	0.756	0.229	0.697
2360	Alt. isoform/cryptic donor	GAAAAGCAATgtatgccct	5.583	0.414	0.94	0.039	0.958
2379	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctccatcagCGGACAAATT	6.077	0.4	0.673	0.309	0.541
2411	unclassified acceptor	aatattacagGGCTGCTATT	2.744	0.414	0.488	0.483	0
2434	Alt. isoform/cryptic donor	AGAGATGGTgtaataacaa	7.298	0.457	0.785	0.157	0.799
2466	Alt. isoform/cryptic acceptor	agatcttcagACCTGGAGGA	2.763	0.4	0.829	0.162	0.805
2500	Alt. isoform/cryptic donor	AATTGGAGAGgtgaattata	5.149	0.329	0.72	0.215	0.701
2520	Alt. isoform/cryptic donor	TAAATATAAAgtagtaaaaa	6.57	0.414	0.909	0.064	0.93
2523	Alt. isoform/cryptic donor	ATATAAAGTAgtaaaaattg	5.648	0.429	0.922	0.053	0.942
2595	Alt. isoform/cryptic donor	AAAAAGAGCAgtgggaatag	5.497	0.543	0.902	0.07	0.922
2673	Constitutive donor	GACGCTGACgtacaggcca	5.108	0.486	0.396	0.519	0.236
2698	Alt. isoform/cryptic donor	TTATTGTCTgtatagtca	7.165	0.486	0.749	0.192	0.743
2705	Alt. isoform/cryptic acceptor	tctgtatagTGACGACGCA	2.261	0.529	0.577	0.408	0.293
2768	Alt. isoform/cryptic acceptor	caactcacagTCTGGGCAT	3.547	0.5	0.649	0.337	0.481
3002	Alt. isoform/cryptic acceptor	ttaattgaagAATCGCAAAA	3.014	0.4	0.845	0.148	0.825
3098	Alt. isoform/cryptic donor	ATTGGCTGTggtataaaaa	6.2	0.286	0.75	0.186	0.753
3135	Alt. isoform/cryptic donor	AGGAGGCTGtaggtttaa	9.435	0.343	0.68	0.238	0.65
3173	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctttcttagTGAATAGAGT	6.065	0.3	0.882	0.11	0.875
3214	Alt. isoform/cryptic acceptor	atcgtttcagACCTGGAGAT	6.28	0.357	0.75	0.233	0.689
3266	Alt. isoform/cryptic donor	GAAGAAGAAggtggagagag	6.499	0.514	0.77	0.174	0.774
3316	Constitutive acceptor	cactcctcagGTGCAGGCTG	7.581	0.471	0.276	0.713	0.613
3322	Constitutive acceptor	tcagggtcagGCTGCCTATC	3.997	0.471	0.255	0.727	0.649
3334	Constitutive acceptor	tgctatcagAAGGTGGTGG	2.377	0.514	0.402	0.572	0.297

Sequence: PspI3+M1 MUT							
Position (bp)	Putative splice site	Sequence	Score*	Intron GC*	Alt./Cryptic	Activations**	Confidence*
						Constitutive	
80	Alt. isoform/cryptic acceptor	cgtgctctagAGTCGACCCA	2.918	0.529	0.879	0.115	0.869
92	Constitutive donor	CGACCCAGCAgtaagtaata	11.781	0.286	0.227	0.697	0.675
96	Alt. isoform/cryptic donor	CCAGCAGTAAgtaatacatg	4.743	0.286	0.724	0.197	0.728
105	Alt. isoform/cryptic donor	AGTAATACATgtaatgcaac	7.818	0.314	0.841	0.11	0.869
182	Alt. isoform/cryptic acceptor	tggccatagTAATCATAGA	3.497	0.329	0.861	0.137	0.841
227	Alt. isoform/cryptic donor	AAATAGACAGGttaattgat	9.261	0.371	0.743	0.194	0.738
363	Alt. isoform/cryptic acceptor	agtgtcacgAAAAATTGTG	5.11	0.543	0.841	0.158	0.812
369	Alt. isoform/cryptic donor	CAGAAAAATTgtgggtcaca	6.5	0.543	0.919	0.056	0.939
391	Alt. isoform/cryptic donor	CTATTATGGGgtacgggatc	6.078	0.586	0.862	0.1	0.884
440	Alt. isoform/cryptic acceptor	ggtttctcagATACTGGGC	4.775	0.543	0.739	0.241	0.673
462	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctgcctcagGAGGCCCTTA	4.232	0.586	0.801	0.187	0.767
484	Alt. isoform/cryptic donor	TCTGCTCTGgtaaaagtag	6.451	0.6	0.632	0.287	0.546
490	Alt. isoform/cryptic donor	CTGGGTAAAgttagtagagt	7.825	0.614	0.838	0.114	0.864
491	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctgggtaagGTAGTAGAGT	2.236	0.6	0.897	0.094	0.895
525	Alt. isoform/cryptic donor	GGGGGCCCAgtgatgctct	4.516	0.557	0.929	0.05	0.946
596	Alt. isoform/cryptic donor	TTGACGGGGgtagggcg	8.823	0.514	0.834	0.114	0.863
618	Alt. isoform/cryptic donor	CCTGAGAGGcgaagcggtt	4.881	0.386	0.953	0.03	0.968
659	Alt. isoform/cryptic donor	TAGTTCTTgttgattata	6.635	0.2	0.861	0.099	0.885
830	Alt. isoform/cryptic acceptor	cgcttgaagAAGTACAAAA	4.927	0.343	0.876	0.121	0.862
831	Alt. isoform/cryptic donor	CGTTGAAAGgtacaaaatg	5.672	0.386	0.762	0.181	0.762
859	Alt. isoform/cryptic acceptor	tgctatcagAAAATCTTAG	2.946	0.371	0.939	0.058	0.938
881	Alt. isoform/cryptic donor	GTCCCATCTGtaagtgcagc	12.08	0.343	0.583	0.333	0.429
965	Alt. isoform/cryptic acceptor	tacatactagGGAAGAAAAG	2.314	0.329	0.562	0.419	0.255
1001	Alt. isoform/cryptic acceptor	gttgactcagTCATAACAGC	3.138	0.386	0.837	0.157	0.812
1104	Alt. isoform/cryptic acceptor	accctgtagTCTGGAGTTG	3.545	0.329	0.588	0.397	0.325
1138	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctccacaagTGTGACCACA	2.355	0.457	0.741	0.248	0.665
1174	Alt. isoform/cryptic donor	CAGATATCTGgtgatccgt	4.793	0.457	0.914	0.064	0.93
1229	Alt. isoform/cryptic acceptor	tgtgcatcagATGCTAAAGC	6.478	0.5	0.621	0.358	0.424
1251	unclassified donor	TGATACAGAGgtacataatg	10.319	0.486	0.443	0.469	0
1292	Alt. isoform/cryptic acceptor	gtaccacagACCCCAACCC	4.224	0.471	0.718	0.272	0.621
1308	Alt. isoform/cryptic donor	CCCACAAAGgtatattg	4.836	0.343	0.82	0.133	0.838
1317	Alt. isoform/cryptic donor	AGTAGTATTGtaaatgtga	7.392	0.314	0.902	0.067	0.926
1359	Alt. isoform/cryptic donor	AAATGACATGgtagaacaga	5.908	0.371	0.817	0.134	0.836
1437	Alt. isoform/cryptic donor	CCCACTCTGTtagtttaa	5.345	0.343	0.936	0.044	0.953
1443	Alt. isoform/cryptic acceptor	tctgtttagTTTAAAGTGC	2.401	0.371	0.53	0.454	0.143
1545	Alt. isoform/cryptic acceptor	tcaatcacgCACAAAGCATA	5.938	0.357	0.837	0.157	0.813
1558	Constitutive donor	AGCATAAGAGgttaagtgca	12.762	0.271	0.108	0.851	0.873
1563	Alt. isoform/cryptic donor	AAGAGGTAAgtgcagaaag	6.992	0.257	0.874	0.09	0.897
1669	Alt. isoform/cryptic acceptor	cattacacagCCCTGTCCAA	4.434	0.343	0.719	0.267	0.629
1680	Constitutive donor	CTGTCCAAAgttatcccttg	11.3	0.386	0.316	0.599	0.473
1741	Alt. isoform/cryptic donor	ATTCTAAAgttaataata	7.247	0.371	0.881	0.081	0.908
1774	Alt. isoform/cryptic donor	ACAGGACCATgtacaaatgt	5.787	0.386	0.864	0.098	0.886
1782	Alt. isoform/cryptic donor	ATGTACAAAtgtcacagcag	5.782	0.429	0.881	0.085	0.903
1798	Alt. isoform/cryptic donor	ACAGTACAAgttacatg	4.621	0.429	0.857	0.102	0.881
1866	Alt. isoform/cryptic donor	AGAAGAAGAGgttagtaatta	9.409	0.357	0.576	0.334	0.419
1914	Alt. isoform/cryptic donor	AACCATAAgtacactgca	4.842	0.329	0.916	0.058	0.937
2021	Alt. isoform/cryptic acceptor	gttacaatagGAAAAATAGG	4.885	0.414	0.637	0.339	0.467
2156	Alt. isoform/cryptic acceptor	caatcctcagGAGGGGACCC	3.103	0.271	0.768	0.222	0.711
2236	Alt. isoform/cryptic donor	CTGTTAATAgctattggtt	4.68	0.386	0.908	0.062	0.931
2253	Alt. isoform/cryptic acceptor	ggtttaagTACTTGGAGT	2.931	0.3	0.746	0.244	0.673
2316	Alt. isoform/cryptic acceptor	tccatcagAATAAAACAA	4.589	0.414	0.756	0.229	0.697
2360	Alt. isoform/cryptic donor	GAAAAGCAAgtatgccct	5.583	0.414	0.94	0.039	0.958
2379	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctccatcagCGACAAATT	6.077	0.4	0.673	0.309	0.541
2411	unclassified acceptor	aatattacagGGCTGCTATT	2.744	0.414	0.488	0.483	0
2434	Alt. isoform/cryptic donor	AGAGATGGTgtaataacaa	7.298	0.457	0.785	0.157	0.799
2466	Alt. isoform/cryptic acceptor	agatcttcagACCTGGAGGA	2.763	0.4	0.829	0.162	0.805
2500	Alt. isoform/cryptic donor	AATTGGAGAAgtgaattata	5.149	0.329	0.72	0.215	0.701
2520	Alt. isoform/cryptic donor	TAAATATAAgtagtaaaaa	6.57	0.414	0.909	0.064	0.93
2523	Alt. isoform/cryptic donor	ATATAAAGTgtgaaattg	5.648	0.429	0.922	0.053	0.942
2595	Alt. isoform/cryptic donor	AAAAAGAGCAgtgggaatag	5.497	0.543	0.902	0.07	0.922
2673	Constitutive donor	GACGCTGACGgtacagcca	5.108	0.486	0.396	0.519	0.236
2698	Alt. isoform/cryptic donor	TTATTGCTGgtatagtca	7.165	0.486	0.749	0.192	0.743
2705	Alt. isoform/cryptic acceptor	tctggtatagTGACAGCA	2.261	0.529	0.577	0.408	0.293
2768	Alt. isoform/cryptic acceptor	caactcacagTCTGGGCAT	3.547	0.5	0.649	0.337	0.481
3002	Alt. isoform/cryptic acceptor	ttaattgaagAATCGCAAAA	3.014	0.4	0.845	0.148	0.825
3098	Alt. isoform/cryptic donor	ATTGGCTGTgtatataaaa	6.2	0.286	0.75	0.186	0.753
3135	Alt. isoform/cryptic donor	AGGAGGCTTgtgattttaa	9.435	0.343	0.68	0.238	0.65
3173	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctttctgtagTGAATAGAGT	6.065	0.3	0.882	0.11	0.875
3214	Alt. isoform/cryptic acceptor	atcgtttcagACCTGGAGAT	6.28	0.357	0.75	0.233	0.689
3266	Alt. isoform/cryptic donor	GAAGAAGAAgtggagagag	6.499	0.514	0.77	0.174	0.774
3316	Constitutive acceptor	cactcctcagGTGCAGGCTC	7.581	0.471	0.276	0.713	0.613
3322	Constitutive acceptor	tcagggtcagGCTCCTATC	3.997	0.471	0.255	0.727	0.649
3334	Constitutive acceptor	tgctatcagAAGTGTGG	2.377	0.514	0.402	0.572	0.297

11.2. Anexo 2.Resultados in silico completos de los predicciones para el minigen c.4485-64C>G

Splice Site Prediction Fly

SPLICE SITE PREDICTION FLY 

PspI3+M2 WT

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):

Donor site predictions for 132.248.216.217.22613.0:

Start	End	Score	Exon	Intron
86	100	0.94	cccagca	gtaagtaa
385	399	0.59	ttatggg	gtacggga
478	492	1.00	tggaaag	gtaagaaa
637	651	0.52	ccaccaa	gtatgatt
888	902	0.44	gatctag	gtaatatt
1292	1306	0.94	tacagag	gtacataa
1358	1372	0.81	agtattg	gtaaatgt
1599	1613	1.00	ataagag	gtaagggtg
1721	1735	0.78	tccaaag	gtatcctt
1907	1921	0.57	agaagag	gtagtaat
2401	2415	0.74	aagcaat	gtatgccc
3176	3190	0.53	aggcttg	gtaggttt
3356	3370	0.40	tcctcag	gtgcaggg

Acceptor site predictions for 132.248.216.217.22613.0:

Start	End	Score	Intron	Exon
342	382	0.42	tgatgatctgtagtctaca	gaaaaattgtgggtcacagtc
557	597	0.85	ttttaccatactttctcca	gtttttgcatacaggcctga
571	611	0.93	tctccagtttttgcataca	ggcctgatctctgacatga
683	723	0.99	tccttccattatcttctca	ggatcacccttctaaatgcc
1056	1096	0.72	ggctttttaattcttaacaga	gaccagaactttgtaattc
1120	1160	0.92	aacttctccattctttcaga	gggaaccccttacctggaa
1194	1234	0.61	tctgatccttctggatccca	gat tctggtgatccctgacc
1255	1295	0.79	ccactctattttgcatca	gatgctaaagcatatgataca
1318	1358	0.47	cacatgccgggtgacccaca	gaccccaaccacaagaagta
2437	2477	0.42	gatgttcatcaaatattaca	gggctgctattaacaagagat
3199	3239	0.64	ttttgctgactttctgta	gtgaatagagttaggcagggga
3240	3280	0.64	tattcaccattatcgtttca	gacctggagatctccgaggg
3342	3382	0.96	ttgaccaattcactcctca	ggtcgagctgctcatcagaa

SPLICE SITE PREDICTION FLY 

PspI3+M2 MUT

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):

Donor site predictions for 132.248.216.217.22649.0:

Start	End	Score	Exon	Intron
86	100	0.94	cccagcagtaagtaa	
385	399	0.59	ttatggggtacggga	
478	492	1.00	tggaaagtaagaaa	
888	902	0.44	gatctaggtaatatt	
1292	1306	0.94	tacagaggtacataa	
1358	1372	0.81	agtattggtaaatgt	
1599	1613	1.00	ataagaggttaagggtg	
1721	1735	0.78	tccaaaggtatcctt	
1907	1921	0.57	agaagaggtagtaat	
2401	2415	0.74	aagcaatgtatgccc	
3176	3190	0.53	aggcttggtaggttt	
3356	3370	0.40	tcctcaggtgcaggg	

Acceptor site predictions for 132.248.216.217.22649.0:

Start	End	Score	Intron	Exon
342	382	0.42	tgatgatctgtagtctacagaaaaattgtgggtcacagtc	
557	597	0.85	ttttaccatactttccagtttttgcatacaggcctga	
571	611	0.93	tctccagtttttgcatacaggcctgatctctgacatga	
683	723	0.99	tccttccattatcttctaggtcacccttctaaatgcc	
1056	1096	0.72	ggctttttaattcttaacagagaccagaactttgtaattc	
1120	1160	0.92	aacttctccattctttcagaggggaaccccttacctggaa	
1194	1234	0.61	tctgatccttctggatccagatctggtgatccctgacc	
1255	1295	0.79	ccactctattttgcatcagatgctaaagcatatgataca	
1318	1358	0.47	cacatgccgggtgacccacagaccccaaccacaagaagta	
2437	2477	0.42	gatgttcatcaaatattacagggctgctattaacaagagat	
3199	3239	0.64	ttttgctgactttctgtagtgaatagagttaggcagggga	
3240	3280	0.64	tattcaccattatcgtttcagacctggagatctccgaggg	
3342	3382	0.96	ttgaccaattcactcctcaggtgcaggtgctcatcagaa	

NetGene2 Server

NETGENE2 SERVER

**NetGene2
Server**

PspI3+M2 WT

Donor splice sites, direct strand

pos	5'->3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
93	1	+		1.00	CG	ACCCAGCA	^GTAAGTAATA	
485	2	+		0.82	GAGTGGAAAG	^GTAAGAAACA		
895	2	+		0.55	CAAGATCTAG	^GTAATATTTT		
1299	0	+		0.39	TGATACAGAG	^GTACATAATG		
1365	0	+		0.55	AGTAGTATTG	^GTAATGTGA		
1606	1	+		0.76	AGCATAAGAG	^GTAAGGTGCA		
1914	0	+		0.31	AGAAGAAGAG	^GTAGTAATTA		
2838	0	+		0.30	GCAGCTCCAG	^GCAAGAATCC		
3314	0	+		0.55	GAAGAAGAAG	^GTGGAGAGAG		

Acceptor splice sites, direct strand

pos	5'->3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
591	2	+		0.43	TTGCATACAG	^GCCTGATCTC		
703	1	+		0.56	ATCTTTCTAG	^GTCATCCCCT		
773	0	+		0.07	GAGTCTCAG	^AATAGAAACT		
778	2	+		0.07	TTCAGAATAG	^AAACTACCCA		
795	1	+		0.17	CCATCTCAAG	^AGGAGCTCAT		
797	0	+		0.17	ATCTCAAGAG	^GAGCTCATT		
800	0	+		0.07	TCAAGAGGAG	^CTCATTAAAGG		
809	0	+		0.07	GCTCATTAAAG	^GTTGTTGATG		
1076	2	+		0.33	TTCTTAACAG	^AGACCAGAAC		
1140	1	+		0.96	TTCTTTTCAG	^AGGGAACCCC		
1142	0	+		0.69	CCTTTCAGAG	^GGAACCCCTT		
1171	1	+		0.19	CTGGAATCAG	^CCTCTTCTCT		
2685	2	+		0.14	GGAGCAGCAG	^GAAGCACTAT		
2689	0	+		0.07	CAGCAGGAAG	^CACTATGGGC		
2795	0	+		0.07	GGCGAACAG	^CATCTGTTGC		
3260	1	+		0.70	ATCGTTTCAG	^ACCTGGAGAT		
3268	0	+		0.25	AGACCTGGAG	^ATCTCCCGAG		
3278	1	+		0.30	ATCTCCCGAG	^GGGACCCGAC		

NETGENE2 SERVER

**NetGene2
Server**

PspI3+M2 MUT

Donor splice sites, direct strand

pos	5'->3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
93	1	+		1.00	CG	ACCCAGCA	^GTAAGTAATA /	
485	2	+		0.82	GAGTGGAAAG	^GTAAGAAACA /		
895	2	+		0.55	CAAGATCTAG	^GTAATATTTT /		
1299	0	+		0.39	TGATACAGAG	^GTACATAATG /		
1365	0	+		0.55	AGTAGTATTG	^GTAATGTGA		
1606	1	+		0.76	AGCATAAGAG	^GTAAGGTGCA		
1914	0	+		0.31	AGAAGAAGAG	^GTAGTAATTA		
2838	0	+		0.30	GCAGCTCCAG	^GCAAGAATCC		
3314	0	+		0.55	GAAGAAGAAG	^GTGGAGAGAG		

Acceptor splice sites, direct strand

pos	5'->3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
591	2	+		0.43	TTGCATACAG	^GCCTGATCTC		
703	1	+		0.56	ATCTTTCTAG	^GTCATCCCCT /		
773	0	+		0.07	GAGTCTCAG	^AATAGAAACT		
778	2	+		0.07	TTCAGAATAG	^AAACTACCCA		
795	1	+		0.17	CCATCTCAAG	^AGGAGCTCAT		
797	0	+		0.17	ATCTCAAGAG	^GAGCTCATT		
800	0	+		0.07	TCAAGAGGAG	^CTCATTAAAGG		
809	0	+		0.07	GCTCATTAAAG	^GTTGTTGATG		
1076	2	+		0.33	TTCTTAACAG	^AGACCAGAAC		
1140	1	+		0.96	TTCTTTTCAG	^AGGGAACCCC /		
1142	0	+		0.69	CCTTTCAGAG	^GGAACCCCTT		
1171	1	+		0.19	CTGGAATCAG	^CCTCTTCTCT		
2685	2	+		0.14	GGAGCAGCAG	^GAAGCACTAT		
2689	0	+		0.07	CAGCAGGAAG	^CACTATGGGC		
2795	0	+		0.07	GGCGAACAG	^CATCTGTTGC		
3260	1	+		0.70	ATCGTTTCAG	^ACCTGGAGAT /		
3268	0	+		0.25	AGACCTGGAG	^ATCTCCCGAG		
3278	1	+		0.30	ATCTCCCGAG	^GGGACCCGAC		

Alternative Splice Site Prediction

Sequence: PspI3+M2 Wt							
Position (bp)	Putative splice site	Sequence	Score*	Intron GC*	Activations**		
					Alt./Cryptic	Constitutive	Confidence*
80	Alt. isoform/cryptic acceptor	cggtcctagAGTCGACCCA	2.918	0.529	0.879	0.115	0.869
92	Constitutive donor	CGACCCAGCAgtaagtaata	11.781	0.286	0.227	0.697	0.675
96	Alt. isoform/cryptic donor	CCAGCAGTAAgtaatacatg	4.743	0.286	0.724	0.197	0.728
105	Alt. isoform/cryptic donor	AGTAAACATgtaatacaac	7.818	0.314	0.841	0.11	0.869
182	Alt. isoform/cryptic acceptor	tggtccatagTAATCATAGA	3.497	0.329	0.861	0.137	0.841
227	Alt. isoform/cryptic donor	AAATAGACAgttaattgat	9.261	0.371	0.743	0.194	0.738
363	Alt. isoform/cryptic acceptor	agtgctacagAAAAATTGTG	5.11	0.543	0.841	0.158	0.812
369	Alt. isoform/cryptic donor	CAGAAAAATTgtgggtcaca	6.5	0.514	0.937	0.044	0.953
391	Alt. isoform/cryptic donor	CTATTATGGGgtcaggatc	6.078	0.471	0.908	0.066	0.927
434	Alt. isoform/cryptic donor	CAAGTTTGAGgtgtctgcag	8.209	0.357	0.802	0.143	0.821
445	Constitutive acceptor	gtgtctgcagATAGTTCTAC	4.436	0.5	0.422	0.56	0.245
456	Alt. isoform/cryptic donor	AGTTCTACCAgtaaaaaata	5.272	0.357	0.899	0.069	0.923
484	Alt. isoform/cryptic donor	GAGTGGAAAGgtaagaaaca	12.031	0.286	0.536	0.366	0.316
499	Alt. isoform/cryptic donor	AAACATCAATgtaaatgatc	7.058	0.286	0.887	0.076	0.915
513	Alt. isoform/cryptic donor	AGATGCTGTgtatctgaca	4.721	0.257	0.701	0.226	0.677
578	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctttctcagTTTTTGAT	7.704	0.314	0.602	0.385	0.36
592	Alt. isoform/cryptic acceptor	ttgcatacagCCCTGATCTC	9.288	0.271	0.562	0.422	0.25
643	Alt. isoform/cryptic donor	TGCCACCAAgatgatttg	5.951	0.414	0.769	0.175	0.773
704	Constitutive acceptor	atctttctagGTCATCCCT	10.055	0.414	0.313	0.673	0.535
742	Alt. isoform/cryptic donor	ATGATAGGTGgtacatgcac	5.114	0.443	0.86	0.102	0.881
774	Alt. isoform/cryptic acceptor	gagttccagAATAGAAACT	3.441	0.471	0.82	0.174	0.788
809	Alt. isoform/cryptic donor	GCTCATTAAggtttgatg	4.991	0.5	0.907	0.065	0.928
884	Alt. isoform/cryptic acceptor	actgccaagCAAGATCTA	3.351	0.5	0.882	0.115	0.87
894	Alt. isoform/cryptic donor	CAAGATCTAGtaaatattc	9.826	0.3	0.597	0.31	0.48
981	Alt. isoform/cryptic acceptor	caacttttagTGTACTAGT	3.398	0.3	0.769	0.22	0.714
982	Alt. isoform/cryptic donor	ACTTTTAGATgtactagtct	5.688	0.371	0.943	0.038	0.96
1024	Alt. isoform/cryptic donor	CTGTATTCATgtaccattt	7.793	0.3	0.579	0.34	0.413
1077	Alt. isoform/cryptic acceptor	ttcttaacagAGCCAGAAC	6.525	0.314	0.642	0.342	0.468
1141	Constitutive acceptor	ttccttcagAGGGAAACCCC	9.804	0.343	0.468	0.52	0.999
1143	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctcttcagAGAAACCCCT	2.493	0.357	0.539	0.44	0.183
1215	Constitutive acceptor	tggtcccagATATCTGGTG	7.449	0.5	0.326	0.658	0.506
1221	Alt. isoform/cryptic donor	CAGATATCTgtgatccgt	4.793	0.457	0.906	0.072	0.921
1276	Alt. isoform/cryptic acceptor	gtgcatcagATGCTAAAGC	6.478	0.5	0.621	0.358	0.424
1298	unclassified donor	TGATACAGAGgtacataatg	10.319	0.486	0.443	0.469	1
1339	Alt. isoform/cryptic acceptor	gtaccacagACCCAAACCC	4.224	0.471	0.718	0.272	0.621
1355	Alt. isoform/cryptic donor	CCCACAAAGAgtagtattgg	4.836	0.343	0.82	0.133	0.838
1364	Alt. isoform/cryptic donor	AGTAGATTGgtaaatgtga	7.392	0.314	0.902	0.067	0.926
1406	Alt. isoform/cryptic donor	AAATGACATGgtagaacaga	5.908	0.371	0.817	0.134	0.836
1484	Alt. isoform/cryptic donor	CCCACTCTGTgtagtttaa	5.345	0.343	0.936	0.044	0.953
1490	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctgtgttagTTTAAAGTGC	2.401	0.371	0.53	0.454	0.143
1592	Alt. isoform/cryptic acceptor	taaatatcagCACAAAGCATA	5.938	0.357	0.837	0.157	0.813
1605	Constitutive donor	AGCATAAGAGgtaagtgca	12.762	0.271	0.108	0.851	0.873
1610	Alt. isoform/cryptic donor	AAGAGGTAAGgtgcagaaag	6.992	0.257	0.874	0.09	0.897
1716	Alt. isoform/cryptic acceptor	cattacacagCCCTGTCCAA	4.434	0.343	0.719	0.267	0.629
1727	Constitutive donor	CTGTCCAAAgtatcttttg	11.3	0.386	0.316	0.599	0.473
1788	Alt. isoform/cryptic donor	ATTCTAAAAgttaataata	7.247	0.371	0.881	0.081	0.908
1821	Alt. isoform/cryptic donor	ACAGGACCAgttaaatgt	5.787	0.386	0.864	0.098	0.886
1829	Alt. isoform/cryptic donor	ATGTACAAAgtcagcacag	5.782	0.429	0.881	0.085	0.903
1845	Alt. isoform/cryptic donor	ACAGTACAAgttacatgg	4.621	0.429	0.857	0.102	0.881
1913	Alt. isoform/cryptic donor	AGAAGAAGAGgtagtaatta	9.409	0.357	0.576	0.334	0.419
1961	Alt. isoform/cryptic donor	AACCTAATAgtagactgta	4.842	0.329	0.916	0.058	0.937
2068	Alt. isoform/cryptic acceptor	gttaacaatgAAAAATAGG	4.885	0.414	0.637	0.339	0.467
2203	Alt. isoform/cryptic acceptor	caatcctcagGAGGGACCC	3.103	0.271	0.768	0.222	0.711
2283	Alt. isoform/cryptic donor	CTGTTTAAAgtagtctggtt	4.68	0.386	0.908	0.062	0.931
2300	Alt. isoform/cryptic acceptor	ggtttaatgTACTGGAGT	2.931	0.3	0.746	0.244	0.673
2363	Alt. isoform/cryptic acceptor	ttccatcagAATAAAACAA	4.589	0.414	0.756	0.229	0.697
2407	Alt. isoform/cryptic donor	GAAAAGCAAgtatgccccct	5.583	0.414	0.94	0.039	0.958
2426	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctccatcagCGGACAAATT	6.077	0.4	0.673	0.309	0.541
2458	unclassified acceptor	aatattacagGGCTGTATT	2.744	0.414	0.488	0.483	0
2481	Alt. isoform/cryptic donor	AGAGATGTTgtaataaaca	7.298	0.457	0.785	0.157	0.799
2513	Alt. isoform/cryptic acceptor	agatcttcagACTGGAGGA	2.763	0.4	0.829	0.162	0.805
2547	Alt. isoform/cryptic donor	AATTGGAGAAgtgaattata	5.149	0.329	0.72	0.215	0.701
2567	Alt. isoform/cryptic donor	TAAATATAAgtagtaaaaa	6.57	0.414	0.909	0.064	0.93
2570	Alt. isoform/cryptic donor	ATATAAAGTgtaaaaaattg	5.648	0.429	0.922	0.053	0.942
2642	Alt. isoform/cryptic donor	AAAAAGAGCgtggaatag	5.497	0.543	0.902	0.07	0.922
2720	Constitutive donor	GACGCTGACgtcagagcca	5.108	0.486	0.396	0.519	0.236
2745	Alt. isoform/cryptic donor	TTATTGTCTgttatagtgca	7.165	0.486	0.749	0.192	0.743
2752	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctgttatagTCAGCAGCA	2.261	0.529	0.577	0.408	0.293
2815	Alt. isoform/cryptic acceptor	caactcacagTCTGGGCAT	3.547	0.5	0.649	0.337	0.481
3049	Alt. isoform/cryptic acceptor	ttaattgaagAATCGAAAA	3.014	0.4	0.845	0.148	0.825
3145	Alt. isoform/cryptic donor	ATTGGCTGTgtatataaaa	6.2	0.286	0.75	0.186	0.753
3182	Alt. isoform/cryptic donor	AGGAGGCTTgtgagtttaa	9.435	0.343	0.68	0.238	0.65
3220	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctttctgtgTGAATAGAGT	6.065	0.3	0.882	0.11	0.875
3261	Alt. isoform/cryptic acceptor	atcgttcagACCTGGAGAT	6.28	0.357	0.75	0.233	0.689
3313	Alt. isoform/cryptic donor	GAAAGAGAAgtggagagag	6.499	0.514	0.77	0.174	0.774
3363	Constitutive acceptor	cactcctcagGTGACAGCTG	7.581	0.471	0.276	0.713	0.613
3369	Constitutive acceptor	tcaggtcagGCTGCCTATC	3.997	0.471	0.255	0.727	0.649
3381	Constitutive acceptor	tgccatcagAAGGTGGTGG	2.377	0.514	0.402	0.572	0.297

Sequence: PspI3+M2 mut							
Position (bp)	Putative splice site	Sequence	Score*	Intron GC*	Activations**		
					Alt./Cryptic	Constitutive	Confidence*
80	Alt. isoform/cryptic acceptor	cggtcctagAGTCGACCCA	2.918	0.529	0.879	0.115	0.869
92	Constitutive donor	CGACCCAGCAgtaagtaata	11.781	0.286	0.227	0.697	0.675
96	Alt. isoform/cryptic donor	CCAGCAGTAAgtaatacatg	4.743	0.286	0.724	0.197	0.728
105	Alt. isoform/cryptic donor	AGTAATACATgtaagcaac	7.818	0.314	0.841	0.11	0.869
182	Alt. isoform/cryptic acceptor	tggtccatagTAATCATAGA	3.497	0.329	0.861	0.137	0.841
227	Alt. isoform/cryptic donor	AAATAGACAGgtaattgat	9.261	0.371	0.743	0.194	0.738
363	Alt. isoform/cryptic acceptor	agtgctacagAAAAATTGTG	5.11	0.543	0.841	0.158	0.812
369	Alt. isoform/cryptic donor	CAGAAAAATTggtgctcaca	6.5	0.514	0.937	0.044	0.953
391	Alt. isoform/cryptic donor	CTATTATGGGgtacgggatc	6.078	0.471	0.908	0.066	0.927
434	Alt. isoform/cryptic donor	CAAGTTTGAgtgtctgcag	8.209	0.357	0.802	0.143	0.821
445	Constitutive acceptor	gtgtctgcagATAGTCTAC	4.436	0.5	0.422	0.56	0.245
456	Alt. isoform/cryptic donor	AGTTCTACCAgtaaaaaata	5.272	0.357	0.899	0.069	0.923
484	Alt. isoform/cryptic donor	GAGTGGAAAgtagaagaaca	12.031	0.286	0.536	0.366	0.316
499	Alt. isoform/cryptic donor	AAACATCAATgtaagatgc	7.058	0.286	0.887	0.076	0.915
513	Alt. isoform/cryptic donor	AGATGCTGTggtatctgaca	4.721	0.257	0.701	0.226	0.677
578	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctttccagTTTTTTGCAT	7.704	0.314	0.602	0.385	0.36
592	Alt. isoform/cryptic acceptor	ttgcatacagGCCTGATCTC	9.288	0.271	0.562	0.422	0.25
641	Alt. isoform/cryptic acceptor	ggctgccagCAAGTATGAT	4.449	0.457	0.77	0.222	0.711
643	Alt. isoform/cryptic donor	TGCCACAGCAgtatgatttg	5.515	0.414	0.82	0.134	0.836
704	Constitutive acceptor	atctttctagGTCATCCCTC	10.055	0.414	0.313	0.673	0.535
742	Alt. isoform/cryptic donor	ATGATAGGTggtacatgcac	5.114	0.443	0.86	0.102	0.881
774	Alt. isoform/cryptic acceptor	gagttcagAATAAGAACT	3.441	0.471	0.82	0.174	0.788
809	Alt. isoform/cryptic donor	GCTCATTAAgtgtttgatg	4.991	0.5	0.907	0.065	0.928
884	Alt. isoform/cryptic acceptor	acttccaagGCAAGATCTA	3.351	0.5	0.882	0.115	0.87
894	Alt. isoform/cryptic donor	CAAGATCTAGtaattttc	9.826	0.3	0.597	0.31	0.48
981	Alt. isoform/cryptic acceptor	caacttttagATGACTAGT	3.398	0.3	0.769	0.22	0.714
982	Alt. isoform/cryptic donor	ACTTTTAGATgtactagtct	5.688	0.371	0.943	0.038	0.96
1024	Alt. isoform/cryptic donor	CTGTATTCATgtaccattt	7.793	0.3	0.579	0.34	0.413
1077	Alt. isoform/cryptic acceptor	ttcttaacagAGACCCAGAAC	6.525	0.314	0.642	0.342	0.468
1141	Constitutive acceptor	ttcctttcagAGGGAACCCC	9.804	0.343	0.468	0.52	0.099
1143	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctttccagGGAACCCCTT	2.493	0.357	0.539	0.44	0.183
1215	Constitutive acceptor	tggtaccagATATCTGGTG	7.449	0.5	0.326	0.658	0.506
1221	Alt. isoform/cryptic donor	CAGATATCTggtatccctg	4.793	0.457	0.906	0.072	0.921
1276	Alt. isoform/cryptic acceptor	tggtcatcagATGCTAAAGC	6.478	0.5	0.621	0.358	0.424
1298	unclassified donor	TGATACAGAGgtacataatg	10.319	0.486	0.443	0.469	1
1339	Alt. isoform/cryptic acceptor	gtaccacagACCCAAACCC	4.224	0.471	0.718	0.272	0.621
1355	Alt. isoform/cryptic donor	CCCACAAGAAgtagtattgg	4.836	0.343	0.82	0.133	0.838
1364	Alt. isoform/cryptic donor	AGTAGTATTgtaaatgta	7.392	0.314	0.902	0.067	0.926
1406	Alt. isoform/cryptic donor	AAATGCATGgtagaacaga	5.908	0.371	0.817	0.134	0.836
1484	Alt. isoform/cryptic donor	CCCCTCTGTgttagtttaa	5.345	0.343	0.936	0.044	0.953
1490	Alt. isoform/cryptic acceptor	tctgttttagTTTAAAGTGC	2.401	0.371	0.53	0.454	0.143
1592	Alt. isoform/cryptic acceptor	tcaatcatcagCACAAAGCATA	5.938	0.357	0.837	0.157	0.813
1605	Constitutive donor	AGCATAAGAGgtaaggtgca	12.762	0.271	0.108	0.851	0.873
1610	Alt. isoform/cryptic donor	AAGAGGTAAgtgcagaaga	6.992	0.257	0.874	0.09	0.897
1716	Alt. isoform/cryptic acceptor	cattacacagCCTGTCCAA	4.434	0.343	0.719	0.267	0.629
1727	Constitutive donor	CTGTCCAAAgtatcctttg	11.3	0.386	0.316	0.599	0.473
1788	Alt. isoform/cryptic donor	ATTCTAAAATgtaataataa	7.247	0.371	0.881	0.081	0.908
1821	Alt. isoform/cryptic donor	ACAGGACCATgtacaatgt	5.787	0.386	0.864	0.098	0.886
1829	Alt. isoform/cryptic donor	ATGTACAAATgtcagcacag	5.782	0.429	0.881	0.085	0.903
1845	Alt. isoform/cryptic donor	ACAGTACAAgtcacatgg	4.621	0.429	0.857	0.102	0.881
1913	Alt. isoform/cryptic donor	AGAAAGAGAgtgtaatta	9.409	0.357	0.576	0.334	0.419
1961	Alt. isoform/cryptic donor	AACCATAATgtacagctga	4.842	0.329	0.916	0.058	0.937
2068	Alt. isoform/cryptic acceptor	gttacaatgGAAAAATAGG	4.885	0.414	0.637	0.339	0.467
2203	Alt. isoform/cryptic acceptor	caatcctcagGAGGGGACCC	3.103	0.271	0.768	0.222	0.711
2283	Alt. isoform/cryptic donor	CTGTTAATAgtagtgggt	4.68	0.386	0.908	0.062	0.931
2300	Alt. isoform/cryptic acceptor	ggtttaatgTACTTGGAGT	2.931	0.3	0.746	0.244	0.673
2363	Alt. isoform/cryptic acceptor	tccatgcagAATAAAACAA	4.589	0.414	0.756	0.229	0.697
2407	Alt. isoform/cryptic donor	GAAAAGCAAgtatgccct	5.583	0.414	0.94	0.039	0.958
2426	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctccatcagCGGACAAATT	6.077	0.4	0.673	0.309	0.541
2458	unclassified acceptor	aatattcagGGCTGTATT	2.744	0.414	0.488	0.483	0
2481	Alt. isoform/cryptic donor	AGAGTGGTgtaataaaca	7.298	0.457	0.785	0.157	0.799
2513	Alt. isoform/cryptic acceptor	agatctcagACCTGGAGGA	2.763	0.4	0.829	0.162	0.805
2547	Alt. isoform/cryptic donor	AATTGGAGAAgtgaattata	5.149	0.329	0.72	0.215	0.701
2567	Alt. isoform/cryptic donor	TAAATAAAAgtagtaaaaa	6.57	0.414	0.909	0.064	0.93
2570	Alt. isoform/cryptic donor	ATATAAAGTgtaaaaaattg	5.648	0.429	0.922	0.053	0.942
2642	Alt. isoform/cryptic donor	AAAAAGAGCAgtgggaatag	5.497	0.543	0.902	0.07	0.922
2720	Constitutive donor	GACGCTGACgtcagagcca	5.108	0.486	0.396	0.519	0.236
2745	Alt. isoform/cryptic donor	TTATTGCTGTgtatagtca	7.165	0.486	0.749	0.192	0.743
2752	Alt. isoform/cryptic acceptor	tctgttatagTGCACAGCA	2.261	0.529	0.577	0.408	0.293
2815	Alt. isoform/cryptic acceptor	caactcacagTCTGGGGCAT	3.547	0.5	0.649	0.337	0.481
3049	Alt. isoform/cryptic acceptor	ttaattgaagAATCGCAAAA	3.014	0.4	0.845	0.148	0.825
3145	Alt. isoform/cryptic donor	ATTGGCTGTgtatataaaa	6.2	0.286	0.75	0.186	0.753
3182	Alt. isoform/cryptic donor	AGGAGGTTGtagtggtttaa	9.435	0.343	0.68	0.238	0.65
3220	Alt. isoform/cryptic acceptor	ctttctgtgTGAATAGAGT	6.065	0.3	0.882	0.11	0.875
3261	Alt. isoform/cryptic acceptor	atcgtttcagACCTGGAGAT	6.28	0.357	0.75	0.233	0.689
3313	Alt. isoform/cryptic donor	GAAAGAGAAgttgagagag	6.499	0.514	0.77	0.174	0.774
3363	Constitutive acceptor	cactcctcagGTGACGGCTG	7.581	0.471	0.276	0.713	0.613
3369	Constitutive acceptor	tcaggtcagGCTGCATC	3.997	0.471	0.255	0.727	0.649
3381	Constitutive acceptor	tgctcatcagAAGGTGGTGG	2.377	0.514	0.402	0.572	0.297