

# Una misma receta, muchas delicias. La alternatividad del splicing

\* Por Mariano Alló

## Parte 1

Ruperto de Nola era considerado uno de los más destacados chef europeos, pero además, él era un aficionado a los juegos de lógica y los implementaba, constantemente, en su extravagante y asombrosa gastronomía. Uno de sus más conocidos e ingeniosos legados fue la receta de las **cien delicias**, en la cual trabajó durante tres largos años, y su desarrollo demostraba la inteligencia y creatividad del autor. Su idea fue diseñar una sola receta que pudiera ser utilizada para preparar cien platos dulces diferentes. Para llevar a cabo tal empresa debería valerse de los códigos de redacción que ya habían sido pre-establecidos con los ayudantes de cocina, bibliotecarios y demás personal involucrado.

**¿Pero cómo sería posible formar cien platos usando una sola receta?  
Aprovechando al máximo las posibilidades que dicho código le otorgaba.**

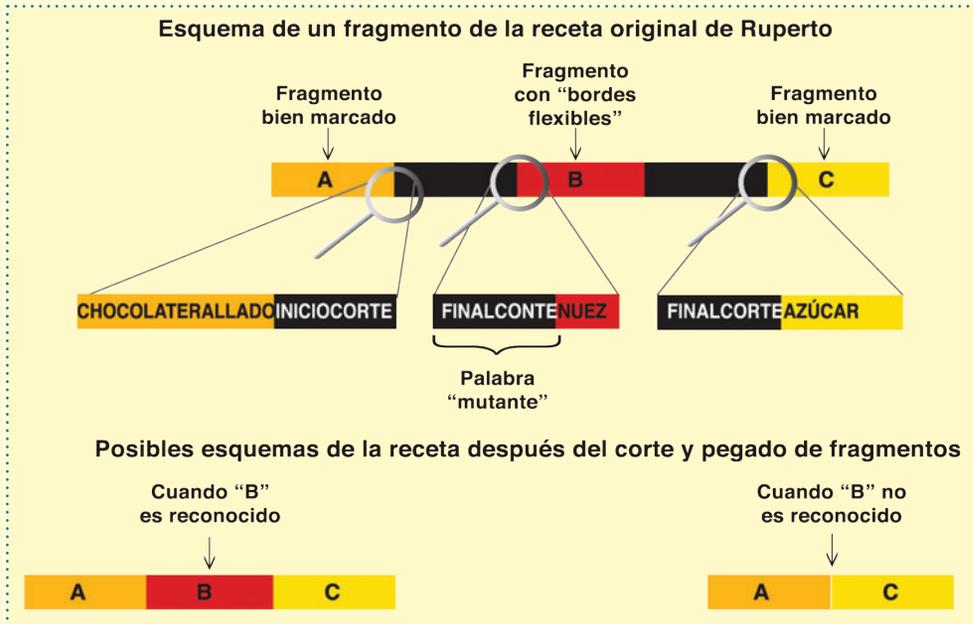
Recordemos que las recetas se escribían todas juntas, sin espacios y con mucha información inútil en el medio, que debía ser cortada y eliminada durante la transcripción de la receta. Con tal fin habían introducido, como parte del código de escritura, una combinación de palabras que delimitaban el inicio y fin de cada receta, pero además, también, habían colocado palabras determinadas con el fin de marcar las partes que debían ser quitadas o eliminadas de cada receta. Por ejemplo, NUEVARECETA indicaba el inicio, valga la redundancia, de una nueva receta; mientras que palabras como INICIOCORTE, FINALCORTE, DIVISORINICIAL, DIVISORFINAL, PRIMERLIMITE, ULTIMOLIMITE y muchas otras marcaban los sitios que debían ser eliminados. Una señalaba el inicio del corte y la otra el final. Podemos imaginar a una secuencia de órdenes verdaderas de la receta rodeada a ambos lados por secuencias falsas. El principio de la secuencia verdadera estará marcado por el final de una secuencia falsa (la anterior) y, por lo tanto, por alguna de las siguientes palabras: FINALCORTE, DIVISORFINAL, ULTIMOLIMITE. De la misma manera el final de la secuencia verdadera estará indicado por el inicio del fragmento falso con alguno de los siguientes códigos: INICIOCORTE, DIVISORINICIAL, PRIMERLIMITE.

Ruperto agregó una serie de variaciones al código pre-existente aumentando la cantidad de combinaciones que se podían producir al momento de cortar y pegar los fragmentos sin sentido de la receta. Una nueva posibilidad era que algunos de los límites pudieran ser flexibles.

**¿Esto qué quiere decir?**

Bueno, cuando los ayudantes o el mismísimo bibliotecario estuvieran identificando las regiones que debían eliminar de una receta, los bordes “flexibles”, algunas veces, iban a ser utilizados y otras no. Ahora imagina un ejemplo donde tengas fragmentos verdaderos de una receta delimitados por bordes “flexibles” de los fragmentos falsos. A la hora de eliminar los fragmentos falsos, ¿qué crees que pasaría si sacas alguno de los bordes? Cuando eran reconocidos, el corte se producía correctamente a diferencia de cuando no lo eran. Esta novedosa variante permitía una explosión de mezcolanzas posibles. Así existían fragmentos que podían ser o no incluidos en la versión final de la receta de acuerdo a la habilidad para detectarlos que tuviera el ayudante. En otros casos se trataba de fragmentos verdaderos consecutivos separados por regiones falsas mutuamente excluyentes (uno llamado A y el otro B) de manera que si se utilizaba A, B era eliminado y si se utilizaba B, A era el fragmento cortado.

Para hacerlo aún más interesante dejó mucho librado al azar. Incluyó algunas palabras “mutantes” que marcaban los límites, en lugar de poner INICIOCORTE, utilizó INICLOCORTE o INICIOCONTE o INDICECORTE y en lugar de FINALCORTE utilizó FINALCONTE, FILIALCORTE o FINOCORTE. Estas palabras eran parecidas a las preestablecidas pero, en realidad, no eran las palabras correctas. Por lo tanto, a medida que la receta se transcribía dependiendo de la rapidez o lentitud con la cual trabajaran las personas que debían llevar a cabo el corte, estas palabras iban a ser reconocidas como verdaderos indicadores o no. Si se le dedicaba mucho tiempo a la tarea había una mayor probabilidad de que se dieran cuenta INICIOCONTE no es igual que INICIOCORTE y, por lo tanto, no la reconocieran como un sitio para empezar a cortar. En



*Variabilidad en las recetas. Ruperto cambió el código. Utilizando bordes “flexibles” en los fragmentos que los ayudantes debían reconocer para eliminar de las recetas, pudo agregar variabilidad. El esquema muestra cómo a partir de un fragmento con un borde “mutante”, el B, pueden originarse distintas variantes de la receta según si es reconocido como válido o no durante el corte y pegado de los fragmentos.*

cambio si procedían velozmente, el ayudante no iba a tener el tiempo suficiente como para poder notar la diferencia sutil entre las dos palabras e iniciarían el corte cuando leyeran INICIOCONTE o INICIOCORTE.

Pero lo más fantástico de todo esto, fue que dada la enorme cantidad de posibilidades de eliminación de fragmentos, cualquiera sea la combinación elegida, Ruperto había ideado una receta de manera tal que para cada disposición, el resultado final fuera un exquisito plato dulce.

El ingenio de Ruperto de Nola parecía no tener límites. Una misma receta, muchas delicias. Una misma receta, cien delicias.

Gracias a esta pequeña historia, podremos abordar otro tema fascinante de la Biología Molecular de nuestros días conocido como *Splicing alternativo*.

### **¿Tenemos presente el número aproximado de genes de nuestro genoma?**

Deberíamos saberlo a esta altura... veinticinco mil genes, aproximadamente.

Y...

### **¿el número de proteínas?**

No lo sabemos ciertamente, pero lo que sí sabemos es que es muy superior a este número.

Y...

### **¿cómo se explican estas diferencias?**

Antes de seguir con la lectura de la segunda parte de este capítulo, releamos la primera parte y elaboremos una hipótesis para explicar este fenómeno. Ya que no importa la respuesta en sí, sino el camino recorrido por nuestro razonamiento.

## Parte2

La respuesta no era muy complicada... el ejemplo de la multi-receta gráfica, con sencillez, un concepto complejo y muchas veces mal interpretado.

Los genes, como ya sabemos, tienen secuencias con información para sintetizar proteínas llamadas exones y otras que serán eliminadas durante la maduración del ARN mensajero inmaduro, llamadas intrones. Los exones, usualmente, están delimitados por secuencias consenso que indican el principio y el fin de un intrón. Pero, al igual que ocurre con la receta de Ruperto, los exones no siempre son incluidos en la versión final del ARN mensajero (ARNm). Muchas veces son cortados junto con los intrones que lo rodean. Un **exón alternativo** es aquél que, algunas veces, es reconocido formando parte del ARNm y otras tantas es eliminado. Finalmente, el proceso por el cual esto ocurre es denominado ***splicing alternativo***, y fue descubierto, conjuntamente, por los laboratorios de David Baltimore y Leroy Hood a principio de la década del 80 en genes que codificaban para inmunoglobulinas. En pocos años se encontraron muchos ejemplos adicionales de genes con *splicing* alternativo.

Este proceso capaz de generar una enorme diversidad proteica a partir de un mismo gen, explica en parte, las diferencias entre número de genes y número de proteínas al cual

hacíamos referencia en la parte 1 de este capítulo. Pero además, también arroja algo de luz sobre los procesos evolutivos que nos han separado de otros mamíferos. Por ejemplo, hemos dicho que tenemos los mismos genes que los chimpancés, y el mismo número que un ratón, pero que además son casi los mismos genes también. Pues una de las cosas que nos hace diferentes aún conservando los mismos genes es cómo esos genes son utilizados para dar distintos tipos de proteínas.

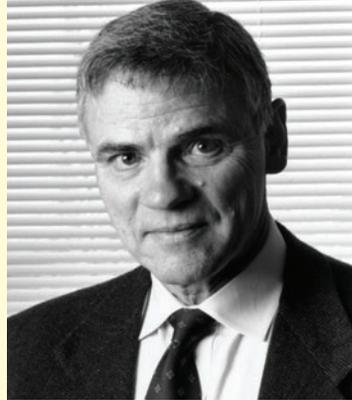
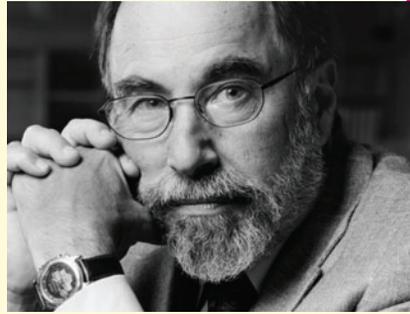
Actualmente se cree que cerca del 70% de los genes de todo el genoma humano tiene la capacidad de originar más de una proteína por medio del proceso que acabamos de describir, el splicing alternativo. Pero, además, este fenómeno está ampliamente distribuido en los organismos vivos, desde las plantas hasta los animales, mostrándonos con claridad la importancia que dicho proceso tiene en la biología.

Dado que está involucrado en la expresión de aproximadamente el 70% de los genes de nuestro genoma, podemos suponer, también, que el efecto de un mal funcionamiento de alguna de las piezas en él involucradas sería gravísimo. Efectivamente la regulación del splicing alternativo también es llevada a cabo de manera muy meticulosa y, el fino balance entre las diferentes proporciones de proteínas generadas a partir de un mismo gen, afecta un sinnúmero de procesos moleculares fundamentales. Aquí estamos tan sólo a un paso de hablar de enfermedades asociadas a los defectos que puedan producirse en el splicing alternativo. Daremos ese pequeño paso que nos resta para que pueda contarte que varias enfermedades graves tienen un origen en deficiencias durante este proceso. Para citar algunas, podemos mencionar el síndrome de Frasier, demencia frototemporal, parkinson, fibrosis quística, distrofia muscular, distrofia miotónica y como no podría ser de otra manera: EL CÁNCER.

El laboratorio en el cual yo trabajo (realizo mi doctorado en Biología Molecular durante la escritura de este libro) ha estudiado desde hace mucho tiempo la regulación del splicing alternativo. Mi director, el Dr. Alberto Kornblihtt, es uno de los científicos pioneros de esta disciplina a nivel mundial.

Nuestro laboratorio lleva el nombre de LFBM, Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Aquí mismo, en nuestro país, podemos realizar investigaciones en el área de splicing alternativo, y de hecho es a lo que nuestro grupo de trabajo se dedica.

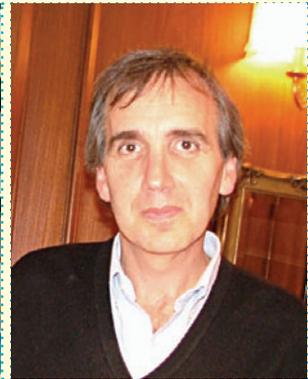
*El laboratorio. Uno podría pensar que este tipo de investigaciones se llevan a cabo en lugares muy lejanos. Sin embargo, en el 2º piso del pabellón II de Ciudad Universitaria se encuentra nuestro laboratorio, en plena Capital Federal.*



a  
b

*Los fundadores. David Baltimore (a) y Leroy Hood (b) descubrieron en forma conjunta el proceso de splicing alternativo a principios de los años 80.*





*a. El grupo. Aunque el dinamismo de los grupos de investigación hace que la gente cambie todo el tiempo, quiero agradecer a todos los miembros del grupo y además "amigos" que han sido fundamentales en mi formación. De izquierda a derecha en la foto: Juan Pablo Fededa, Manuel Muñoz, Ezequiel Petrillo, Matías Blaustein, Federico Pelisch y yo. No están presentes en esta fotografía y también han sido muy importantes, Manuel de la Mata e Ignacio Schor.*

*b. Mi director y mentor. Alberto Kornblihtt ha sido uno de los pioneros del estudio del *splicing* alternativo en el mundo. Desde 2005 es el director de mi doctorado y principal responsable de mi formación. A él le debo la mayoría de las cosas que he aprendido acerca de un científico y su calidad humana.*

En la mayoría de los casos cuando estudiamos el *splicing* alternativo, nos centramos en la proporción que existe entre las diferentes proteínas generadas a partir de un único gen por dicho proceso, también llamadas diferentes isoformas del gen. Dado un gen A que origina dos proteínas diferentes, la proteína A1 y la proteína A2, existe un balance natural de la relación de estas dos isoformas para cada tipo de célula. Por ejemplo, en hepatocitos (células del hígado) hay un 50% de cada isoforma y, por lo tanto, la relación es 1/1. Pero en las células epidérmicas (de nuestra piel) la relación A1/A2 es igual a 3. Esto ¿qué quiere decir? Que hay 3 veces más cantidad de la isoforma A1 que de A2 del gen A en células epidérmicas. Muchas veces, diferencias sutiles en esta relación pueden tener consecuencias notables en la vida de la célula.

A partir de la analogía con la receta de las **cien delicias** podemos tener una idea global de cómo ocurre el proceso de *splicing* alternativo. Vamos a integrar esta nueva información a los conceptos que hemos venido desarrollando a lo largo de los diferentes capítulos del libro con el fin de tener, al menos, una aproximación a la dinámica y complejidad de estos procesos. Para ello, voy a contarles dos versiones de una misma historia, y al igual que en los ejercicios de "encuentra las diez diferencias" (sobre dibujos) ahora deberemos prestar mucha atención para poder explicar dónde radica la principal discrepancia de las versiones y por qué.

Antes de comenzar a narrar la historia voy a contar algunos detalles de su actor principal: el gen de la fibronectina, que se ha ganado este papel central, ya que es nuestro modelo fundamental de estudio en el laboratorio. Pero vamos a los hechos.

El gen está localizado casi en un extremo del cromosoma 2 humano. Tiene un tamaño de 75.615 bases (letras), con la posibilidad de originar más de diez isoformas gracias a tres regiones que poseen *splicing* alternativo. Está formado por cuarenta y siete exones y origina una proteína de aproximadamente 2.386 aminoácidos que, usualmente, es encontrada en tejido conectivo, adherida a la superficie de la célula, en el plasma u otros fluidos (líquidos) corporales. Interactúa con una enorme variedad de macromoléculas

(moléculas GRAAAANDES) incluidos algunos componentes del citoesqueleto, la matriz extracelular, receptores en la superficie celular de fibroblastos, neuronas, fagocitos y bacterias.

En cuanto a su función, está involucrada en muchos procesos celulares abarcando desde la reparación de tejidos, coagulación sanguínea, migración y adhesión celular, hasta procesos tan complejos como el cáncer.

### VERSIÓN 1: Expresión de un gen según el modelo clásico.

Vamos a seguir mediante nuestra ENORME imaginación “la vida” y actividad de un gen X en el interior celular. Entonces comencemos por el principio. (El gen X tiene un único promotor, que es la región donde va a dar comienzo la transcripción. Como ya sabemos la molécula de ADN está enrollada alrededor de unas pelotitas llamadas histonas que ayudan a empaquetarlo o compactarlo. Para que el gen comience a transcribirse, primero deben unirse una serie de proteínas que detectan la región promotora, entre ellas se unirá la ARN Polimerasa II (PolII) la enzima encargada de copiar o mejor dicho TRANSCRIBIR la secuencia del gen en una nueva molécula de ARN. Cuando la ARN Polimerasa II se ponga en marcha, otras proteínas se encargarán de colocar las banderitas que marcarán que el gen está siendo transcrito, está activo. Por delante de la Polimerasa II (PolII) un grupo de proteínas se encargará de remover las pelotitas sobre las cuales el ADN está retorcido y lo “extenderá” facilitándole el paso a la PolII. Esta actividad es de suma importancia ya que si esto no ocurriera la PolII se quedaría estancada y no podría continuar con la transcripción). De esta forma la Polimerasa recorrerá las más de 65 mil bases que forman el gen hasta encontrar una secuencia que le indique el final y, allí, se despegará del ADN, habiendo formado, previamente, una molécula idéntica pero de ARN. La molécula de ARN será como un hilo muy largo con dos extremos. Al extremo que se sintetizó primero le llamaremos cabeza y al final, cola. Entonces, dará comienzo la etapa de maduración o procesamiento de esta flamante molécula de ARN que tendrá tres etapas principales:

- 1) primero se le agregará una especie de casco protector en la “cabeza” del gen (es, en realidad, una modificación química).
- 2) en segundo lugar se procederá a eliminar todos los intrones y pegar los exones (proceso que conocemos como *splicing*).
- 3) finalmente a la molécula de ARN también se le adicionará una colita protectora denominada cola de Poli(A).

Focalicémonos ahora en el proceso de *splicing*:

El ARN inmaduro será escaneado (letra por letra) por una maquinaria proteica (conjunto de muchas proteínas unidas para realizar una tarea específica conjunta) llamada “empalmosoma” (*spliceosome* en inglés) que detectará los límites entre los exones e intrones. A medida que estos límites son detectados, esta misma maquinaria corta los intrones y pega los exones uno al lado del otro. Pero, a veces, los límites no son tan claros, están un poco borrosos por decirlo de alguna manera, algo similar a lo que ocurría con las recetas cuando en lugar de decir INICIOCORTE decía INICIOCONTE. Pues bien, cuando esto ocurra estaremos en presencia de exones alternativos.

### ¿Qué pasa cuando un gen posee un exón alternativo?

Como este proceso se produce simultáneamente en muchos precursores de ARN (de un mismo gen), a veces el empalmosoma reconoce el límite entre exón-intron y, por



lo tanto, el exón va a ser incluido en el ARN mensajero maduro, mientras que, otras veces, no logrará detectarlo y, en consecuencia, el exón será eliminado junto al resto de los intrones que lo rodean. Normalmente, llamamos inclusión y exclusión del exón alternativo a estos dos eventos.

Una vez que el ARN mensajero es procesado, se produce la exportación del mismo, un viaje que lo llevará desde el interior del núcleo celular donde ha sido generado hacia el citoplasma. Una vez alcanzado su destino final, será utilizado por otra maquinaria proteica llamada ribosoma para sintetizar nuevas proteínas.

### **VERSIÓN 2: Expresión de un gen según la visión actual, el acoplamiento.**

El gen X tiene un único promotor, que es la región donde va a dar comienzo la transcripción. Como ya sabemos la molécula de ADN está enrollada alrededor de unas pelotitas llamadas histonas que ayudan a empaquetarlo o compactarlo. Para que el gen comience a transcribirse, primero deben unirse una serie de proteínas que detectan la región promotora, entre ellas se unirá la ARN Polimerasa II la enzima encargada de copiar o mejor dicho TRANSCRIBIR la secuencia del gen en una nueva molécula de ARN. Cuando la ARN Polimerasa II se ponga en marcha, otras proteínas se encargarán de colocar las banderitas que marcarán que el gen está siendo transcrito, está activo. Por delante de la Polimerasa II un grupo de proteínas se encargará de remover las pelotitas sobre las cuales el ADN está retorcido y lo “extenderá”, facilitándole el paso a la PolIII. Esta actividad es de suma importancia ya que si esto no ocurriera la PolIII se quedaría estancada y no podría continuar con la transcripción.

A medida que el nuevo transcripto es generado, comenzará a ser procesado en forma simultánea. Así pues, en cuanto la PolIII haya sintetizado las primeras veinte letras, aproximadamente, del ARN mensajero inmaduro, unas proteínas se le unirán y modificarán su “cabeza” agregándole una especie de casco protector. Luego, la PolIII continuará su recorrido a través de las más de 65 mil bases que forman el gen. A medida que avance en este trayecto será acompañada por un complejo de proteínas (conjunto de muchas proteínas unidas para realizar una tarea específica conjunta) llamada empalmosoma que realizará un escaneo en tiempo real del ARN naciente, buscando los límites entre los intrones y los exones. A medida que los intrones sean reconocidos, el empalmosoma producirá el corte de los mismos y el correspondiente pegado de los exones. Este proceso conocido como *splicing* ocurre en paralelo con la transcripción del gen. La Polimerasa II continuará su viaje hasta encontrar una secuencia de letras que le indique el final y allí se despegará del ADN, habiendo formado una molécula idéntica pero de ARN. Esa molécula de ARN recién formada aún poseerá algunos intrones pero, como dijimos, muchos ya habrán sido eliminados previamente por el empalmosoma. Por último, al precursor del ARN mensajero se le adicionará una colita protectora denominada cola de Poli (A). Todos estos procesos están tan fuertemente acoplados que, incluso, en muchos casos, el ARN comienza a ser exportado hacia el citoplasma antes de que la transcripción finalice. Todos los procesos ocurren simultáneamente.

## ¿Qué ocurre cuando un gen posee un exón alternativo?

Como este proceso se produce simultáneamente en muchos precursores de ARN (de un mismo gen), a veces, el empalmosoma reconoce el límite entre exón-intron y, por lo tanto, el exón va a ser incluido en el ARN mensajero maduro, mientras que otras veces no logrará detectarlo y, en consecuencia, el exón será eliminado junto al resto de los intrones que lo rodean. Normalmente llamamos inclusión y exclusión del exón a estos dos eventos.

Es muy importante destacar que, como todos los procesos ocurren de manera acoplada, existe una conexión temporal y espacial entre ellos. ¿Esto qué quiere decir? Quiere decir que se afectan mutuamente, si el agregado del “casco” no se produce, la transcripción se frena. Por otro lado, la velocidad a la cual la Pol II realiza la síntesis del nuevo ARN afecta el reconocimiento de los intrones y, por lo tanto, el *splicing* alternativo y la calidad del mensajero.

Este fenómeno es conocido como acoplamiento de la transcripción.

## ¿Cuáles son las principales diferencias entre estas dos versiones? ¿A qué se deben estas diferencias?

En principio debemos señalar que la búsqueda del conocimiento es una faceta humana enmarcada dentro de un patrón más general relacionado con la manera en que nuestra organización mental funciona. Para poder entender un sistema complejo, lo que usualmente hacemos es dividirlo en sus componentes fundamentales (las partes más pequeñas posibles) y, entonces, estudiamos cada uno de esos componentes por separado. Una vez conocido el funcionamiento de cada una de esas partes intentamos integrarlas, nuevamente, para interpretar el funcionamiento del conjunto de partes. Esta manera tan particular de adquirir conocimiento muchas veces nos confunde, ya que pensamos que, en realidad, lo que estamos estudiando ocurre de esa manera, particionado. En el camino perdemos la conciencia respecto a que esa partición es una construcción mental nuestra, los procesos no están separados, son un flujo continuo de eventos interrelacionados de maneras sumamente complejas. Esto ha ocurrido con el estudio de la transcripción de genes.

Abordar todo el proceso en forma conjunta es, técnicamente, imposible y por lo tanto, cada grupo de investigación se ha concentrado en el estudio de alguna parte puntual de la transcripción. A medida que estos grupos fueron incorporando conocimientos, imaginaron que los procesos ocurrían de la misma forma en que eran estudiados, tal cual lo describimos en la primera versión de la historia, como eventos independientes y sucesivos. Sin embargo, varios años más tarde, gracias a enfoques más amplios y menos reduccionistas, los científicos develaron que, en realidad, no existía tal compartimentalización e independencia de los eventos. Ocurrían en forma simultánea y de manera dependiente.

Los investigadores debemos esforzarnos, día a día, para no caer en el reduccionismo natural como consecuencia de estudiar muy a fondo procesos muy puntuales. En pocas palabras, que el árbol no nos tape el bosque.

# Conceptos

\* Por Mariano Alló

Una vez sintetizado, el ARN mensajero cuenta con una enorme cantidad de señales dispersas por toda su secuencia, que serán utilizadas para diversas actividades biológicas. Algunas de estas señales indican los sitios que deben eliminarse cuando se produzca el procesamiento del ARN mensajero inmaduro. Estas señales están localizadas sobre los intrones y marcan el principio y el fin de los mismos. En realidad hay cuatro señales básicas que marcan a un intrón, el “sitio dador”, el “punto de ramificación”, una región “rica en pirimidinas” y el “sitio aceptor”. Cada uno de estas cuatro “estampillas” están conformadas por secuencias consenso, como veíamos en la receta de Ruperto cuando decía “INICIOCORTE” o “FINALCORTE”, que a su vez serán reconocidas por el empalmosoma por el cual, finalmente, procederá con el corte del intrón y el pegado de los exones.

El sitio dador contiene la secuencia que marca el principio del intrón, análogamente a INICIOCORTE. El consenso de esta señal en humanos es GUAWG (donde W puede ser A o U), es decir que la mayoría de los intrones comienzan con esta secuencia.

El sitio aceptor es el que señala el fin del intrón, análogamente a FINALCORTE, y su consenso, también para humanos, es NAGNAG (donde la N puede ser cualquier nucleótido A,C,G o U).

Finalmente, también, tenemos un sitio conocido como punto de ramificación y una región rica en “pirimidinas”. Llamamos pirimidinas a las bases citosina, timina y uracilo (adenina y guanina se conocen como purinas). Ambas regiones son requeridas por la maquinaria que llevará a cabo el proceso de *splicing*. Esta maquinaria incluye proteínas y unas moléculas de ARN llamadas ARN nucleares pequeños (no tienen nada que ver con los ARN de interferencia que vimos en el capítulo anterior) cuyos principales miembros son los ARN U1, U2, U4, U5 y U6. La unión de los ARN nucleares pequeños junto con su contraparte proteica ensamblará el empalmosoma.

Cuando un intrón posee variantes de estas señales que se alejan del consenso, sus contornos dejan de estar claramente marcados, el empalmosoma comienza a tener inconvenientes para reconocer el límite del intrón y, en consecuencia, del exón adyacente, convirtiéndose así en un exón alternativo “dando origen” al proceso de *splicing* alternativo.

La regulación de este mecanismo es extremadamente compleja. La interacción de múltiples factores influye sobre el correcto reconocimiento de los exones alternativos. Podemos imaginar una sumatoria de eventos muy diversos, donde cada evento aporta o resta capacidad de reconocimiento del exón alternativo.

Analicemos los factores involucrados en la regulación del *splicing* alternativo con mayor detalle:

en primer lugar podemos mencionar la presencia de **secuencias** reguladoras, tanto positivas como negativas. Las primeras favorecen el reconocimiento del exón alternativo,

mientras que las segundas hacen lo contrario. Aunque, en realidad, las secuencias por sí solas (como ya hemos dicho) no hacen nada. Necesitamos **proteínas** que se unan a estas secuencias **reguladoras** y que, luego, favorezcan o impidan la identificación del exón. Entonces, hasta aquí hemos mencionado dos factores de regulación: las secuencias y las proteínas reguladoras.

Otros factores importantes son el **tamaño de los intrones** que se ubican a ambos lados de un exón, y el tamaño del propio exón. Cuanto más chico es éste y más grandes los intrones, menor será la probabilidad de que sea efectivamente reconocido.

Por otro lado, el **estado de la cromatina** en el cual se encuentra inmerso el gen también es capaz de afectar el *splicing* alternativo.

Finalmente la **velocidad de la ARN Polimerasa II** al transcribir la región alternativa tiene una influencia directa sobre la posibilidad de reconocimiento del exón. Cuanto más rápido “viaje” la Polimerasa menos tiempo tendrá la maquinaria de *splicing* para reconocer el exón y, en consecuencia, la exclusión se verá favorecida. Contrariamente, cuanto más despacio se mueva, le otorgará un tiempo vital al empalmosoma para identificar las débiles señales que rodean al exón y, así, aumentar las probabilidades de que se produzca su inclusión en el ARN mensajero maduro.

Esta compleja red de factores interactúa todo el tiempo para regular, finamente, el balance de isoformas que se originan a partir de cada uno de los genes que poseen *splicing* alternativo. Esto es... la alternatividad del *splicing*.

.....