

LP12. Expresia genica. Metode de evaluare a gradului de activare genica.

Informatia continuta in ADN-ul genomic nu este utilizata direct pentru sinteza proteinelor, ci prin intermediul moleculelor de ARN. Atunci cand o celula trebuie sa sintetizeze o anumita proteina, secventa de nucleotide ADN corespunzatoare acelei proteine este copiată in ARN (*transcriptie*), iar ARN-ul este utilizat drept matrita pentru sinteza proteinei respective (*translatie*).

Astfel, transcriptia si translatia reprezinta procesele prin care o celula isi citeste, sau *exprima*, instructiunile genetice de la nivelul genelor. Deoarece mai multe molecule de ARN mesager (ARNm) identice pot fi transcrise de pe aceeasi gena (ADN), si fiecare molecula de ARNm poate directiona sinteza mai multor molecule proteice identice, celulele isi pot sintetiza o cantitate foarte mare de proteina foarte rapid. Dar fiecare gena poate fi transcrisa si translatata cu eficienta diferite, permitand unei celule sa sintetizeze cantitati foarte mari dintr-o anumita proteina si cantitati infime de alte proteine. In plus, o celula poate modifica (sau *regla*) expresia fiecarei gene in functie de necesitatile celulei dintr-un anumit moment; cel mai frecvent aceasta reglare are loc prin controlul productiei de ARNm.

Astfel, diferitele tipuri celulare ale unui organism multicelular se diferentiaza unele de altele deoarece sintetizeaza si acumuleaza diferite seturi de molecule de ARNm si proteine, pastrandu-si aceeasi informatie genetica la nivelul secventei de nucleotide a ADN.

Controlul expresiei genice

Pentru a intelege mecanismele de diferentiere celulara si reglare a expresiei genice, trebuie cunoscute cateva principii generale:

1. Multe procese celulare sunt comune tuturor tipurilor celulare, si astfel numeroase tipuri de proteine sunt comune tuturor celulelor. Aceste proteine includ proteinele structurale cromozomiale, ARN-polimerazele, enzimele de reparare a ADN, proteinele ribozomale, enzimele implicate in reactiile metabolice, precum si multe din proteinele ce intra in alcatuirea citoscheletului.
2. Unele proteine sunt abundente in celule specializate in care isi indeplinesc functiile si nu pot fi detectate in alte celule; de exemplu hemoglobina poate fi detectata doar in hematii.
3. Studiul diferitelor molecule de ARNm sugereaza faptul ca o celula umana tipica exprima simultan, in orice moment, aproximativ 30-60% din genele structurale. Prin compararea modelelor de expresie genica in linii celulare diferite s-a demonstrat faptul ca nivelurile de expresie pentru fiecare gena in parte difera intre variate tipuri celulare; doar o mica parte din aceste diferente sunt foarte semnificative (vezi exemplul hemoglobinei), restul fiind mult mai subtile. Modele ale expresiei ARNm pentru diferite gene (determinate utilizand tehnologiile *microarray*) sunt atat de caracteristice si specifice pentru diferitele tipuri celulare incat pot fi utilizate pentru a determina tipul unor celule canceroase cu origine necunoscuta.
4. Desi diferentele intre nivelurile ARNm sunt cele mai semnificative, ele nu pot prezice cu exactitate diferentele intre modelele de expresie a proteinei, existand numeroase etape post-transcriptionale la nivelul carora expresia genica poate fi reglata.

Semnalele din exteriorul celulei pot determina modificarea expresiei genice

Majoritatea celulelor specializate sunt capabile sa-si modifice modelul normal de expresie genica drept raspuns la diferiti stimuli extracelulari. De exemplu, daca un hepatocit este expus la un hormon glucocorticoid, productia unor proteine specifice este crescuta semnificativ. Glucocorticoizii sunt eliberati in cursul perioadelor de infometare sau exercitiu fizic si au drept efect productia de glucoza din aminoacizi si alte molecule mici, in hepatocite; proteinele implicate in aceste procese sunt necesare astfel intr-o cantitate crescuta in hepatocite (de exemplu, tirozin-aminotransferaza care participa la convertirea tirozinei in glucoza). Atunci cand hormonii nu mai sunt prezenti la nivelul ficatului, productia acestor proteine de catre hepatocite revine la nivelul normal. Alte tipuri de celule au un raspuns diferit la glucocorticoizi. Celulele adipoase isi reduc productia de tirozin-aminotransferaza, iar alte tipuri de celule nu au niciun fel de raspuns la glucocorticoizi.

Nivelurile de reglare a expresiei genice (de la ADN la proteine)

Exista numeroase etape necesare pentru ca informatia de la nivelul genelor (ADN) sa fie tradusa in final intr-o proteina si fiecare din aceste etape poate fi controlata. Astfel, o celula poate controla nivelul unei proteine sintetizate prin mai multe mecanisme:

1. *controlul transcriptional* - cand si de cate ori o gena este transcrisa;
2. *controlul procesarii ARN* - controlul splicing-ului si procesarii ARN;
3. *controlul transportului si localizarii ARN* - selectarea moleculelor de ARNm care sunt transportate din nucleu in citoplasma, precum si localizarea moleculelor de ARNm in citosol;
4. *controlul translational* - selectarea moleculelor de ARNm din citoplasma care vor fi translatate in proteine la nivelul ribozomilor;
5. *controlul degradarii ARNm* - destabilizarea selectiva a anumitor molecule de ARNm in citoplasma;
6. *controlul activitatii proteinei* - activarea, inactivarea, degradarea sau localizarea specifica a anumitor molecule proteice dupa sinteza.

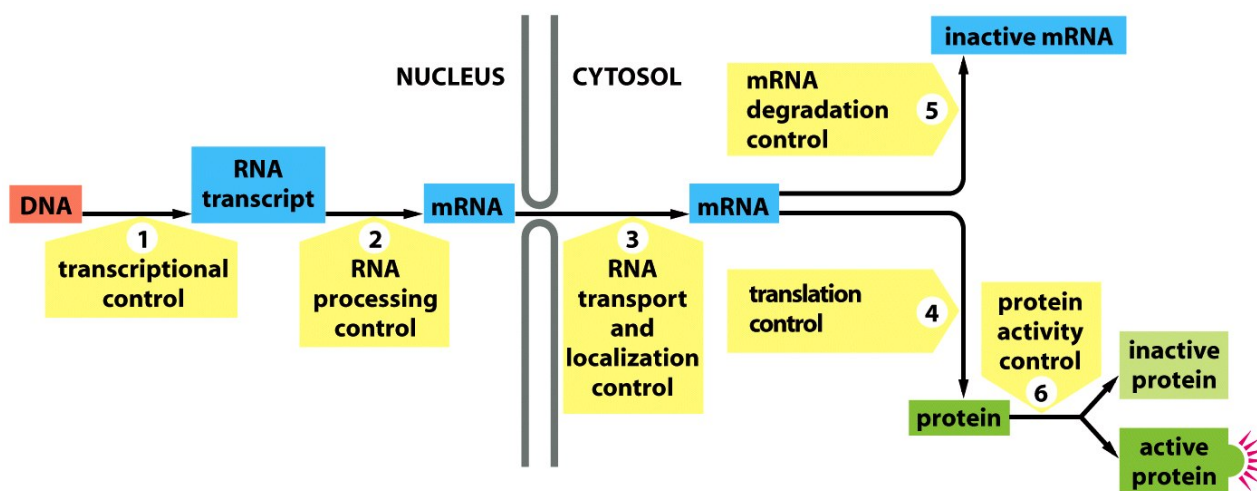


Figure 7-5 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fig. 1. Cele 6 etape la nivelul carora poate fi reglata expresia genica la eucariote.

Metode de evaluare a gradului de activare genica.

I. Analiza ARNm prin Northern blot.

Northern blot este o variantă a metodei Southern blot în care acidul nucleic țintă este ARNm. Obiectivul principal al metodei este obținerea de informații privind profilurile de expresie (tipul celular, abundența transcriptului) unei anumite gene (deja clonată).

Punerea în evidență a unui anumit ARN mesager se bazează pe hibridarea moleculară a ARN cu o sondă complementară monocatenară (ADN c denaturat; oligonucleotide ADN antisens). Moleculele de ARNm, de diferite lungimi (în funcție de gena transcrisă), extrase din diferite țesuturi, sunt separate prin electroforeză în gel de agaroză denaturant (care suprimă structura secundară ce ar jena migrarea și hibridizarea). Apoi ele sunt transferate pe un filtru de nitroceluloză și hibridate cu o sondă de ADN marcată. Pe autoradiogramă se observă una sau mai multe benzi a căror talie, număr și intensitate sunt indicații prețioase. Absența unei benzi ce ar fi trebuit evidențiată de sondă ne indică faptul că gena nu este exprimată / transcrisă datorită unei mutații. Existența unei mutații (de ex, deleție) poate fi relevată printr-un fragment de ARNm cu talie anormală.

Analiza ARN mesager este mult mai delicată și mai dificilă decât cea a ADN deoarece: ARN este foarte vulnerabil la ARN-azele citoplasmatic; numeroase tipuri au o expresie celulară variabilă în funcție de diferențierea celulară (de ex. ARNm pentru fenilalanin-hidroxilază nu este prezent decât în hepatocite, iar cel pentru tiroglobulină numai în celulele tiroidiene); ARNm se găsește în cantități foarte mici.

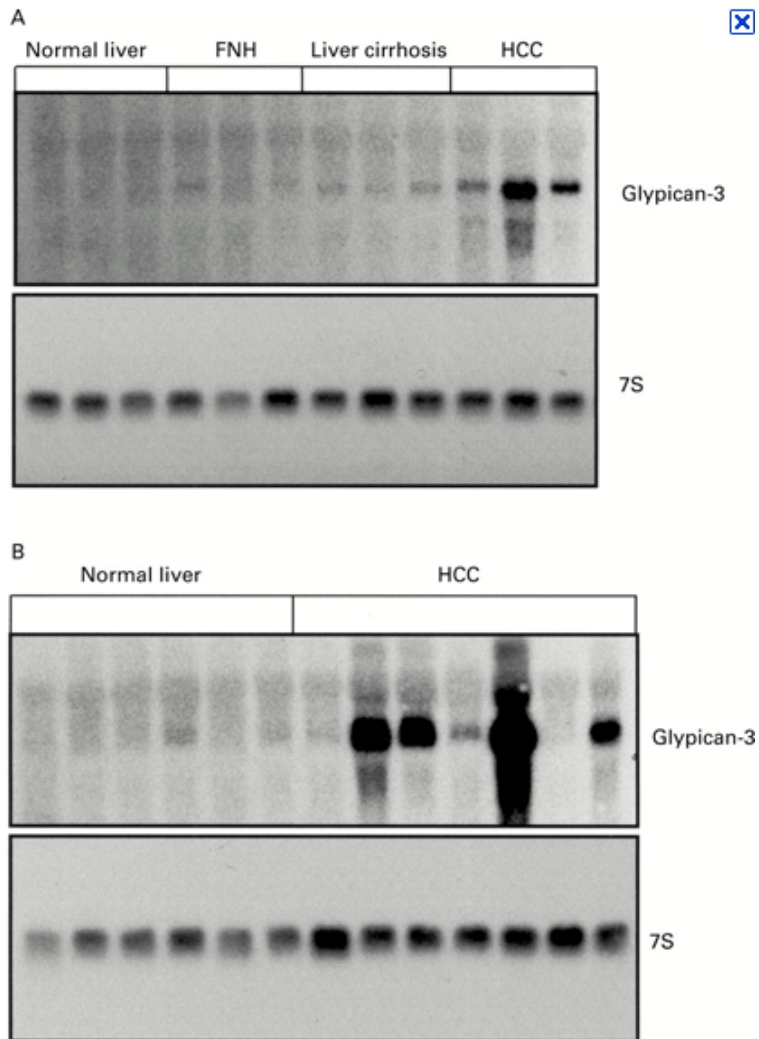
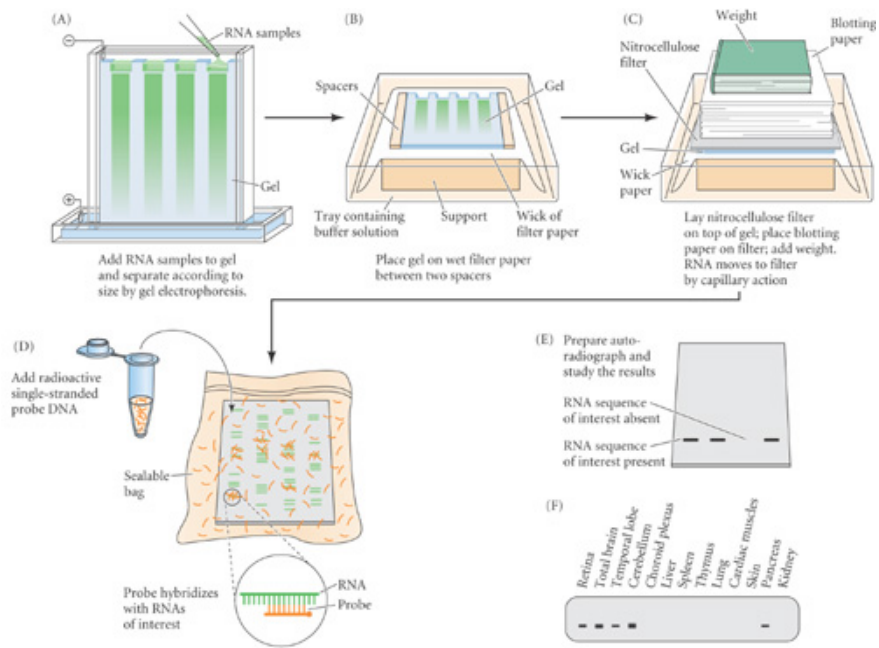
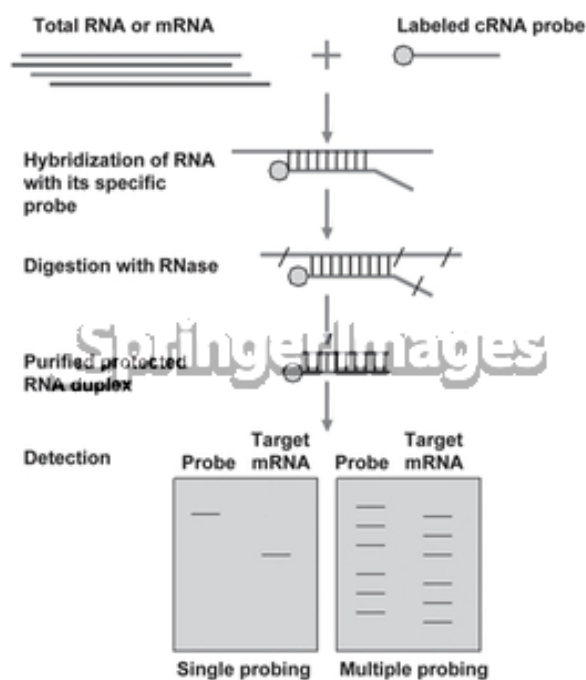


Fig. 2. Tehnica Northern blot

II. Testul de protecție la ribonucleaze (ribonuclease protection assay) - permite evaluarea cantitativă a unor produși de transcripție specifici anumitor gene, identificați cu o sondă de ARN complementară, dintr-un amestec de ARN total.

Tehnica constă în incubarea unei sonde ARN monocatenare marcate, antisens față de gena de interes, cu amestecul de ARN total, în condiții ce favorizează hibridizarea complementară a genei țintă cu sonda. După hibridizare, amestecul este tratat cu o ribonuclează care digerează toate moleculele monocatenare de ARN, dar nu și pe cele de ARN bicatenar rezultate în urma hibridizării. ARN bicatenar este apoi separat prin electroforeză în gel denaturant de poliacrilamidă.



Intensitatea semnalului obținut corespunde cantității de transcript specific prezent în zona țintă.

Fig. 3. Ribonuclease protection assay

III. Hibridizarea tisulară *in situ* - analizează în detaliu locul în care se exprimă genele în țesuturi (pe secțiuni histologice), folosind fie o sondă de ADN, fie o ribosondă antisens, marcate radioactiv sau cu fluorocromi; metoda se poate aplica și la studiul expresiei genelor într-un embrion intact sau pe culturi de celule.

Metoda folosește fie o sondă de ADN, fie o sondă de ARN (ribosondă), complementară ARNm studiat. Marcarea sondei se realizează radioactiv (P^{33} sau S^{35}), situație în care vizualizarea rezultatelor se face prin autoradiografie urmată de microscopie în câmp întunecat (dark-field microscopy), ori de microscopie în câmp luminos (bright-field microscopy) sau, mai frecvent, cu ajutorul unor fluorocromi, analiza rezultatelor fiind făcută prin microscopie cu fluorescență.

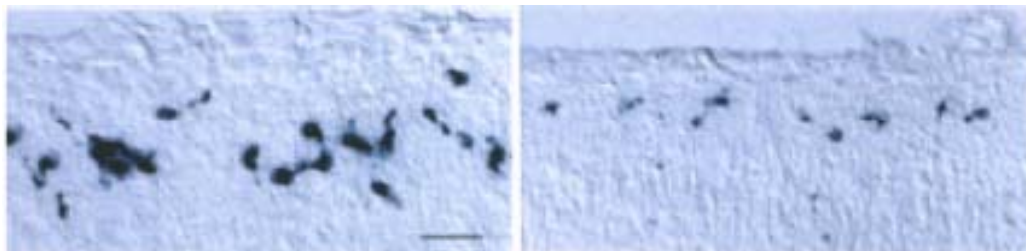
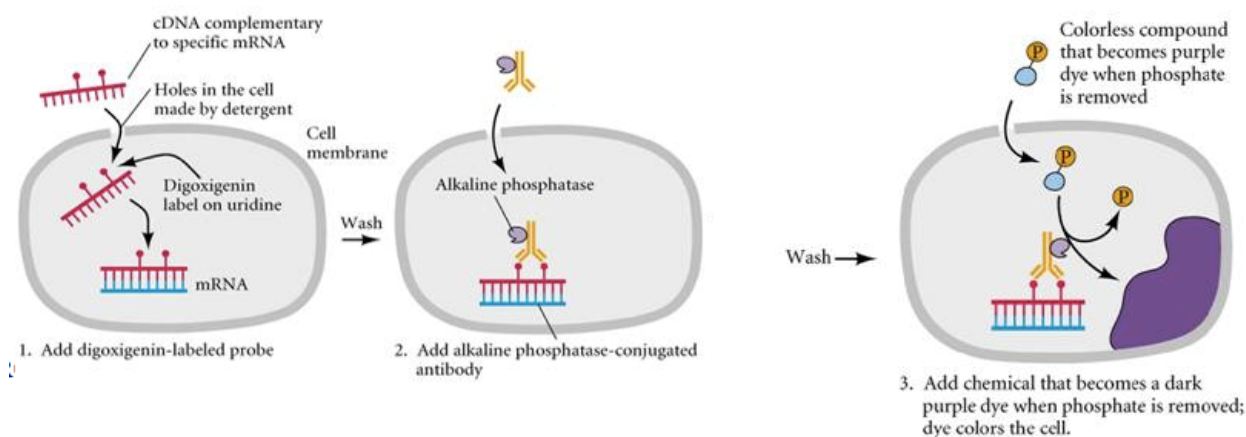


Fig. 4. *In situ* hybridisation

IV. Reacția de polimerizare în lanț în timp real cantitativă (qRT-PCR)

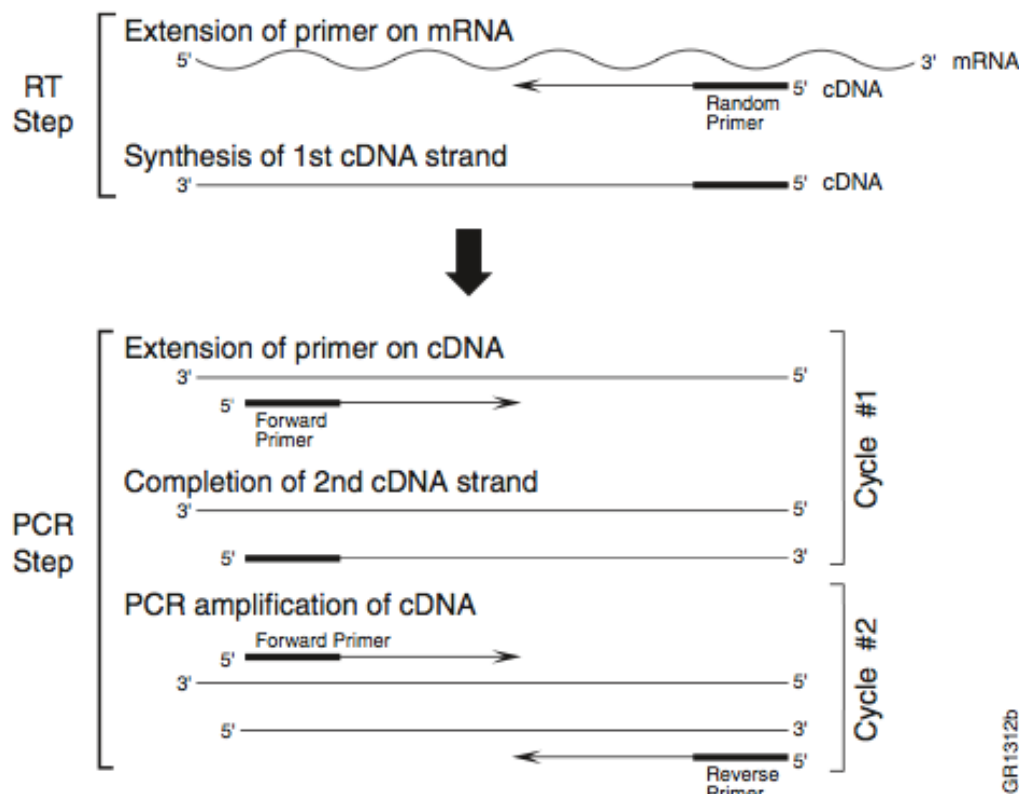
Reacția de polimerizare în lanț cantitativă este cea mai avansată tehnologie pentru detecția și cuantificarea ARNm, fiind suficient de sensibilă pentru a evalua cantitativ transcripția prezenți într-o singură celulă.

Reacția presupune inițial izolarea și purificarea ARN total (sau ARNm) dintr-un țesut sau cultura de celule. Este foarte important să nu existe ADN rezidual care să contamineze ARN-ul purificat; pentru a îndeplini această condiție, ADN-ul este degradat enzimatic (prin utilizarea DN-aze-lor).

Etape:

1. Revers-transcriptia ARN în ADN complementar monocatenar presupune utilizarea unui amestec de reacție care conține: primeri, revers-transcriptaza, ADN polimeraza, dNTPs și componente tampon.

Fig. 5. Etapele qRT-PCR



2. Reacția de polimerizare în lanț în timp real (Real-Time PCR)

În această etapă a producției PCR sunt sintetizați din ADNc utilizând un Master Mix pentru expresie genică, precum și primeri și sonde TaqMan specifice pentru fiecare țintă.

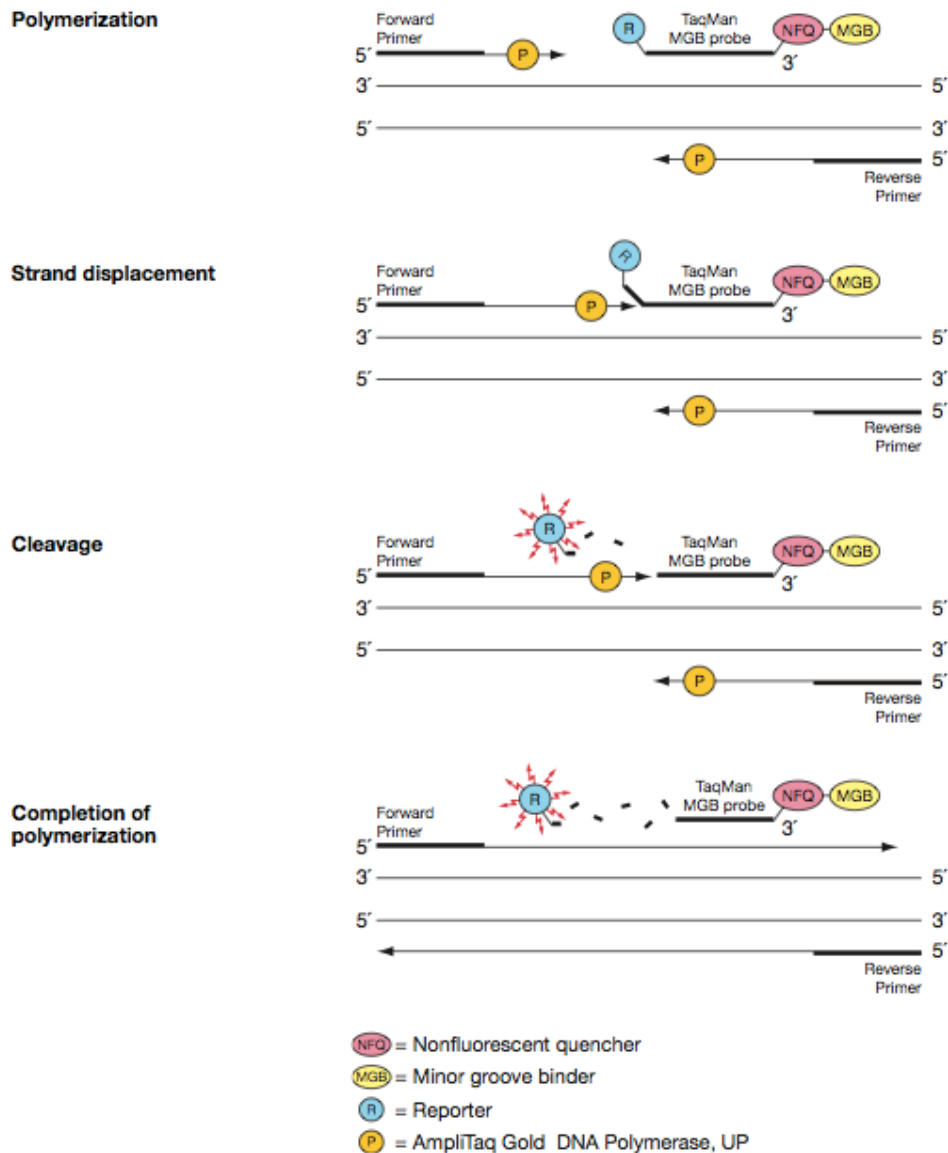
Master Mix-ul pentru expresie genică conține ADN polimeraza, glicozilaza Uracil-ADN (UDG), deoxiribonucleotid trifosfați (dNTPs) cu deoxiuridin trifosfat (dUTP), referință pasivă, precum și componente tampon optimizate pentru îmbunătățirea sensibilității, preciziei, specificității și reproductibilității.

Sondele TaqMan MGB sunt reprezentate de un oligonucleotid specific țintei ce cuprinde:

- un colorant reporter legat la capătul 5' al sondei;
- un ligand atașat la scobitura mică a ADN (MGB – minor groove binder), care crește temperatura de topire (T_m) fără a crește lungimea sondei;
- un colorant non-fluorescent de anihilare a reporterului (nonfluorescent quencher) localizat la capătul 3' al sondei.

Reacția PCR utilizează activitatea 5' exonucleazică a Taq ADN polimerazei ce clivează sonda TaqMan în timpul PCR. În timpul reacției, clivarea sondei separă colorantul reporter de colorantul de anihilare, producând o fluorescență crescută a reporterului. Acumularea produsilor PCR este detectată direct prin monitorizarea creșterii fluorescenței colorantului reporter. Atunci când sonda este intactă, proximitatea colorantului reporter de colorantul anihilator se traduce în

suprimarea fluorescenței colorantului reporter datorită transferului de energie de tip Förster. În timpul PCR, dacă este prezentă ținta de interes, sonda se leagă specific la țintă. Activitatea 5' – 3' exonucleazică a ADN polimerazei AmpliTaq Gold determină clivarea sondei între reporter și anihilator numai dacă sonda este hibridizată la țintă. Fragmentele sondei sunt astfel îndepărtate de țintă, continuând polimerizarea catenei. Capătul 3' al sondei este blocat pentru a preveni extensia sondei în timpul PCR. Acest proces are loc în fiecare ciclu și nu interferă cu acumularea exponențială a produșilor. Creșterea semnalului fluorescent este detectată numai dacă secvența țintei este complementară cu sonda și dacă este amplificată în timpul PCR. Astfel, amplificarea nespecifică nu este detectată.



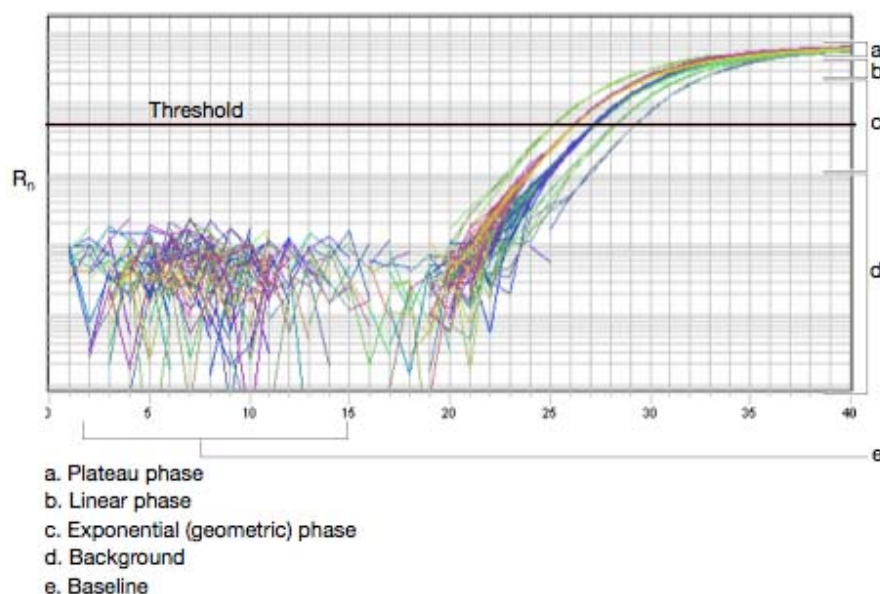


Fig. 6. Reacția de polimerizare în lanț în timp real (Real-Time PCR)

V. Tehnicile *microarray*

Tehnologiile *microarray* oferă noi mijloace care reorganizează modul în care sunt conduse experimentele științifice. Principalul avantaj al tehnologiilor *microarray* comparativ cu metodele tradiționale se referă la scara la care se analizează genele: în loc să se desfășoare experimente bazate pe rezultatele obținute în urma analizei unui număr mic de gene, tehnologiile *microarray* permit analiza simultană a *sute sau mii de gene*.

Tipul de *microarray* depinde de materia de pe suport: ADN - ADN-*microarray*; ARN - ARN-*microarray*; proteina - proteina-*microarray*; țesut - țesut-*microarray*. Din moment ce probele sunt aranjate într-o anumită ordine, datele obținute în urma *microarray* pot fi reanalizate pentru fiecare probă în parte. Acest lucru înseamnă că genele utilizate la *microarray* sunt direct accesibile. Numărul probelor ordonate într-un *microarray* este de sute de mii. Cel mai utilizat tip de *microarray* este ADN-*microarray*.

Tehnica ADN-*microarray* funcționează prin cercetarea abilității unei molecule de ARNm de a se lega sau de a se hibridiza cu matrița de ADN din care a luat naștere. Prin realizarea unui array care conține multe sonde de ADN se pot determina nivelurile expresiei unui număr mare de gene prin măsurarea cantității de ARNm care se leagă la fiecare loc din array.

Microarray-urile ADN sunt suporturi solide, mici, pe care sunt atașate în locații fixe secvențe ale miilor de gene. Suporturile pot fi reprezentate de lame de sticlă microscopice, chip-uri de silicon sau membrane de nylon. ADN-ul este imprimat sau sintetizat direct pe suport.

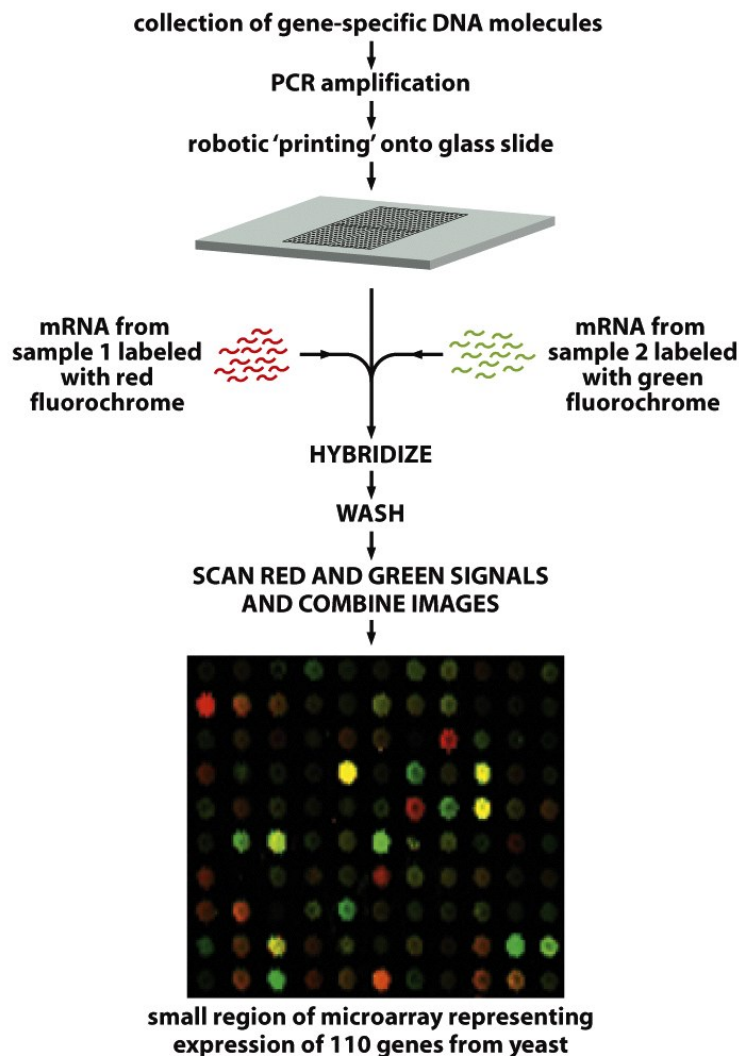


Figure 8-73 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fig. 7. ADN-microarray utilizat pentru evaluarea expresiei a mii de gene simultan

ADN-microarray este utilizat pentru a determina:

- nivelurile expresiei genelor într-o probă (profilul expresiei);
- secvența genelor într-o probă, fenomen numit minisecvențiere când sunt analizate secvențe scurte de nucleotide și analiza mutațiilor sau analiza SNP (single nucleotide polymorphism) când se analizează un singur nucleotid.

Cea mai răspândită aplicație a microarray-urilor este reprezentată de **monitorizarea nivelului de expresie al genelor**. Acest tip de studiu, numit studiul profilului expresiei, poate fi utilizat pentru a determina funcția unor gene în timpul unui status particular, cum ar fi nutriția, temperatura, mediul chimic. Rezultatele sunt notate ca up-regulation, down-regulation sau nemodificate în timpul unor condiții particulare. Microarrayurile au fost utilizate pentru a realiza harta localizării celulare, regionale sau tisulare a genelor și proteinele codificate de acestea. Microarray-urile au fost utilizate: la nivel subcelular pentru cartografierea genelor care codifică proteinele membranare sau citosolice; la nivel celular pentru cartografierea genelor care diferențiază diferitele tipuri de celule ale sistemului imun; la nivel tisular pentru identificarea genelor exprimate

în diverse țesuturi. Studiile farmacologice au utilizat microarray-uri pentru a diferenția mecanismele de acțiune ale agenților terapeutici și ca un corolar pentru a obține noi agenți terapeutici.

De asemenea tehnica microarray poate fi utilizată pentru a monitoriza progresia replicăției ADN-ului în celulă; când este utilizată împreună cu imunoprecipitarea poate indica fiecare poziție din genom ocupată de o proteină reglatoare. Microarray-urile pot fi utilizate și pentru identificarea agenților microbieni prin hibridizarea ADN-ului din țesuturile infectate la un array ce conține secvențe din ADN-ul genomic al unui număr mare de agenți patogeni.

Una din cele mai interesante arii de aplicare a microarray-urilor este *diagnosticul afecțiunilor clinice*. Capacitatea de a identifica celule canceroase bazată pe expresia genelor reprezintă o metodă care are beneficii reale. În cazurile dificile, în care un marker morfologic sau antigenic nu este disponibil sau nu este suficient de sigur pentru a deosebi tipurile de celule canceroase, studiul profilului expresiei genelor cu ajutorul microarray-ului poate fi extrem de valoros. O aplicație recentă a microarray-ului a fost aceea de a realiza *analize genomice comparative (arrayCGH)*. În aceste analize microarray-urile au fost utilizate atât pentru a caracteriza genele unui organism (*genomica structurală*) cât și pentru a determina dacă acele gene sunt exprimate într-un mod similar într-un anumit organism (*genomica funcțională*).

Microarray-urile SNP sunt realizate pentru a detecta prezența unei diferențe de un nucleotid între probele genomice. Polimorfismul unui singur nucleotid apare cu o frecvență de aproximativ 1:1000 de baze și subliniază diferențele genomice între indivizi. Cartografierea și obținerea frecvențelor SNP-urilor identificate oferă o bază genetică pentru identificarea genelor implicate în apariția bolilor, prezicerea efectelor mediului și răspunsul la agenții terapeutici. Minisecvențierea, extensia primerilor și hibridizarea diferențială au fost dezvoltate pe o platformă de microarray.

Modalități de blocare a translației. siRNA. Evidențierea rolului unei gene într-o linie celulară și modele animale.

Interferența ARN are roluri deosebit de importante în biologia celulară, de la controlul expresiei genelor până la structura cromozomilor. Interferența ARN a permis cercetătorilor să dezvolte experimente prin care este blocată aproape orice genă. Aceste tehnici, realizate în linii celulare și uneori pe modele animale, au revoluționat abordările genetice în biologia celulară și moleculară. De asemenea, ARN de interferență (RNAi) are un potențial deosebit în tratarea unor afecțiuni. Deoarece numeroase boli sunt caracterizate de o expresie anormală a genelor, capacitatea de a bloca aceste gene utilizând molecule de ARN de interferență mic (siRNA) reprezintă o abordare promițătoare a tratamentului acestor boli.

Moleculele de ARN necodant reglează expresia genelor

Moleculele de ARN îndeplinesc numeroase roluri în celule, în afară de acela de a servi drept purtători intermediari ai informației genetice (ARNm). Studiile recente au demonstrat faptul că moleculele de ARN necodificante sunt mult mai importante decât se preconiza în reglarea expresiei genice.

De o importanta deosebita sunt molecule mici de ARN necodant numite *microARN* (*miRNA*). La om se exprima mai mult de 400 de tipuri diferite de miRNA, ce par sa regleze cel putin o treime din toate genele structurale. Odata sintetizat, miRNA formeaza legaturi de hidrogen intre bazele complementare cu ARNm si ii regleaza astfel stabilitatea si translatia. Precursorii miRNA sunt sintetizati de catre ARN-polimeraza II si sufera apoi un proces de poliadenilare. miRNA trece printr-o serie de etape speciale de procesare, dupa care este asamblat cu un set de proteine pentru a forma un complex de inducere a silentiozitatii (*RNA - induced silencing complex - RISC*). In urma formarii, RISC isi cauta ARNm tinta prin cautarea secventei de nucleotide complementare. Aceasta cautare este facilitata de proteina *Argonaute*, componenta a RISC, ce se leaga la capatul 5' al miRNA. Legaturile intre bazele complementare includ de obicei 7 perechi de nucleotide si de obicei se realizeaza in regiunea 3' UTR (untranslated region) a ARNm.

In urma legarii miRNA la ARNm doua evenimente devin posibile:

5. daca legarea complementara a miRNA la ARNm este realizata intre un numar mare de baze, ARNm este degradat;
6. daca legarea complementara a miRNA la ARNm se realizeaza pe o distanta mai mica, ARNm nu este degradat, in schimb translatia este represata si ARNm este destabilizat.

Anumite caracteristici ale miRNA le determina de fie reglatori utili ai expresiei genice. In primul rand, o singura molecula de miRNA poate regla diferite molecule de ARNm deoarece moleculele de ARNm au o secventa comuna in regiunile UTR. In al doilea rand, reglarea expresiei genice de catre miRNA poate fi combinatorica; atunci cand legarea complementara a miRNA la ARNm nu reuseste sa declanseze degradare ARNm, legarea suplimentara a altor molecule de miRNA la acelasi ARNm conduce la reduceri suplimentare ale translatiei. In al treilea rand, miRNA ocupa relativ putin "spatiu" in genom comparativ cu o proteina; acesta este si motivul pentru care miRNA au fost descoperite recent.

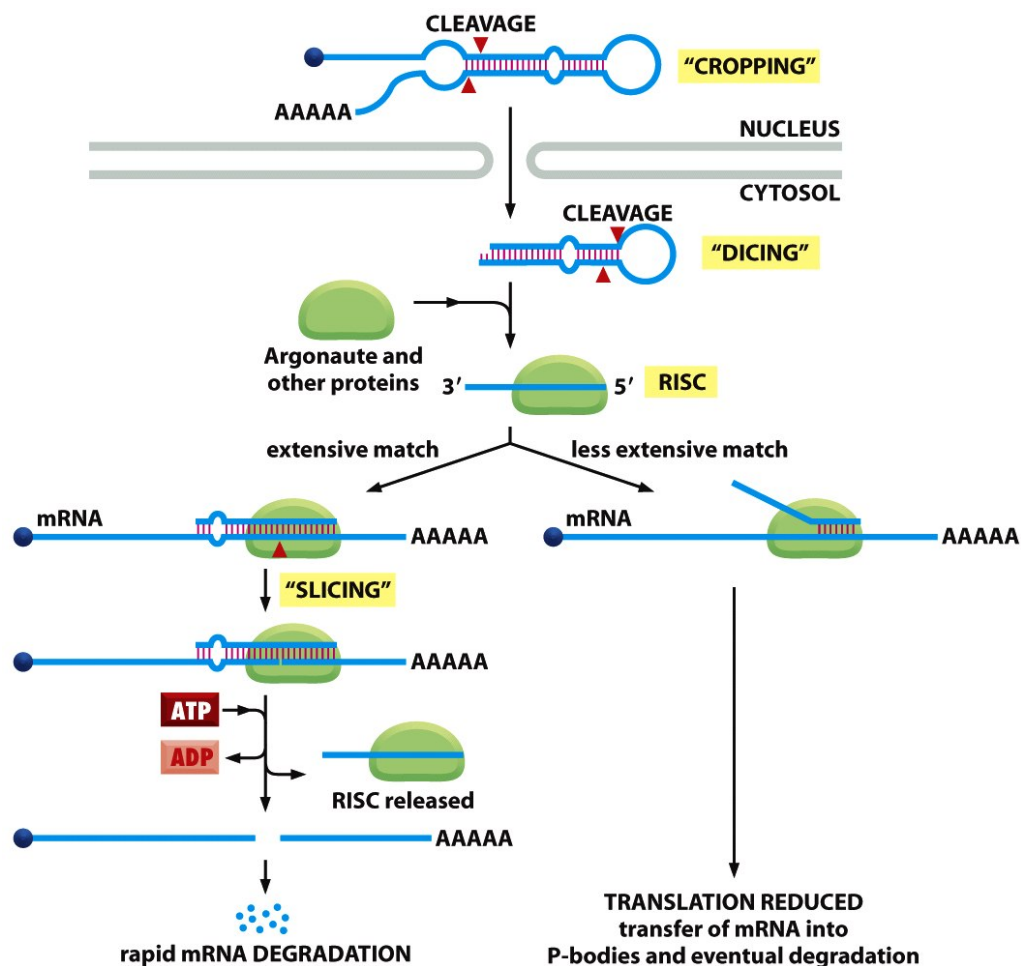


Figure 7-112 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fig. 1. Procesarea si mecanismul de actiune al miRNA

ARN de interferenta

Numeroase proteine care participa la mecanismele de reglare prin miRNA au si un rol de aparare: ele participa la degradarea ARNm non-self, in special daca acesta este prezent in forma dublu-catenara. Numit *interferenta ARN (RNAi)*, acest mecanism este intalnit la o varietate de organisme, incluzand fungi, plantele si viermii, sugerand faptul ca este un mecanism ancestral. Numeroase elemente genetice transpozabile si virusuri produc ARN dublu-catenar cel putin tranzitor in ciclul de viata, iar RNAi ajuta la controlul acestor invadatori potential daunatori. Dar RNAi sta totodata la baza unor tehnici experimentale de blocare a expresiei genelor individuale.

Prezenta ARN-ului dublu catenar in celule declanseaza RNAi prin atragerea unui complex proteic (ce contine *Dicer*, aceeasi nucleaza care proceseaza miRNA). Acest complex proteic cliveaza ARN-ul dublu-catenar in fragmente mici (aproximativ 23 de nucleotide pereche) numite *ARN de interferenta mic (siRNA)*. Aceste molecule de siRNA sunt apoi legate de Argonaute si alte componente ale RISC si o catena a siRNA este degradata. siRNA monocatenar ramas directioneaza RISC catre moleculele de ARN produse de virus sau elementele transpozabile, conducand la distrugerea sa rapida.

De fiecare data cand RISC cliveaza o noua molecula de ARN, este eliberat; astfel, ca si in cazul miRNA, o singura molecula de ARN poate actiona catalitic pentru a distruge mai multe molecule complementare de RNAi.

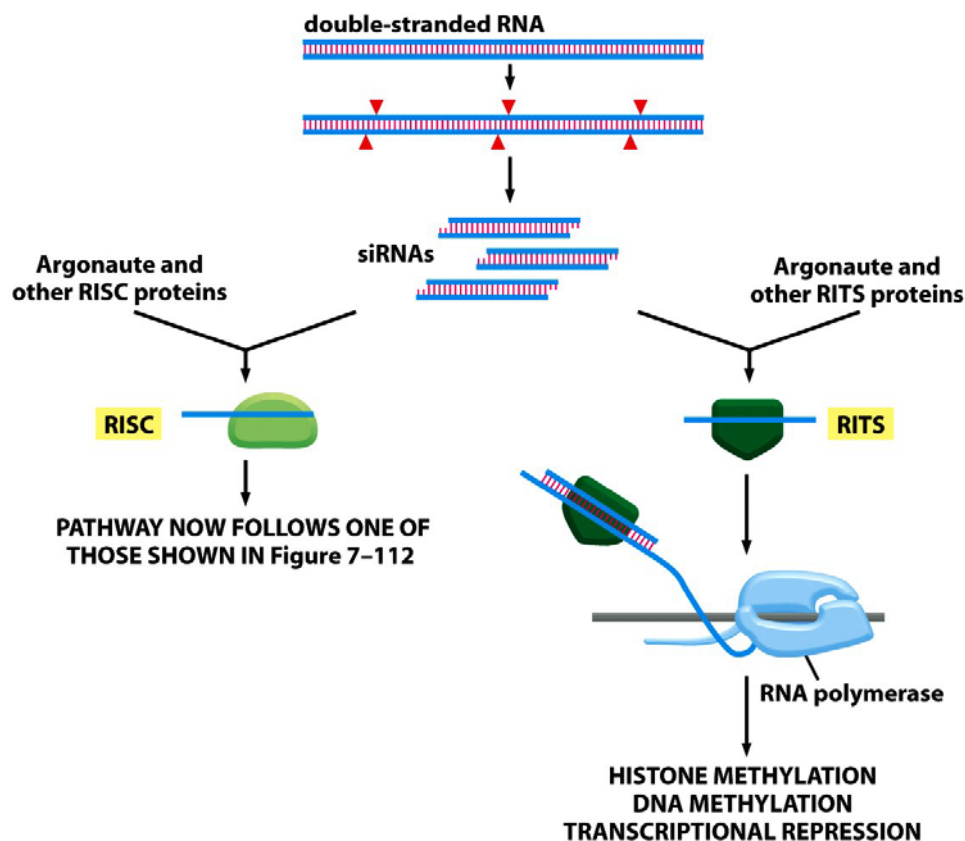


Figure 7-115 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fig. 2. Formarea heterocromatinei mediata de siRNA

RNAi poate directiona formare heterocromatinei

Nu intotdeauna mecanismul de interferenta descris conduce la degradarea unei molecule de ARN tinta. In unele cazuri, sistemul de interferenta ARN poate conduce la blocarea sintezei ARN-ului tinta. Pentru ca acest mecanism sa se produca, siRNA produse de proteina Dicer sunt asamblate cu un grup de proteine (inclusiv Argonaute) pentru a forma complexul RITS (RNA-induced transcriptional silencing). Prin utilizarea siRNA monocatenar drept secventa de ghidare, acest complex leaga transcriptii ARN complementari imediat ce acestia sunt generati de catre ARN-polimeraza II. Astfel complexul RITS atrage proteine care modifica histonele si directioneaza formarea heterocromatinei pentru a preveni initierea transcriptiei. In unele cazuri, complexul RITS induce metilarea ADN care reprezinta si mai mult expresia genica. Deoarece formarea heterocromatinei si metilarea ADN se pot auto-propaga, un semnal interferential initial continua sa supreseze expresia genica mult timp dupa evenimentul initial.

Acest mecanism este important pentru mentinerea heterocromatinei in jurul centromerilor. Secventele de ADN centromerice sunt transcrise in ambele directii, producand transcripti ARN complementari care pot forma ARN dublu catenar prin complementaritatea bazelor. Aceste molecule de ARN dublu catenar initiaza mecanismul de interferenta ARN si stimuleaza formarea

cromatinei la nivelul centromerilor; heterocromatina este necesara pentru segregarea precisa a cromozomilor in mitoza.

Utilizarea RNAi pentru testarea functiilor genelor

Interferenta ARN (RNAi) exploateaza mecanismul natural utilizat de plante, animale, fungi si protozoare de a se proteja impotriva unor virusuri si elemente genetice transpozabile. In aceste tehnici se introduce intr-o celula sau organism o molecula de ARN dublu catenar a carui secventa de nucleotide este complementara cu o regiune a genei ce se doreste a fi inactivata.

Dupa procesarea ARN, acesta hibridizeaza cu ARNm produs de gena tinta si ii directioneaza degradarea. Ca urmare, celula utilizeaza fragmente mici de ARN degradat pentru a produce mai mult ARN dublu catenar, care directioneaza inlaturarea continua a ARNm tinta. Deoarece aceste fragmente scurte de ARN pot fi transmise generatiilor urmatoare, RNAi poate determina modificari transmisibile ale expresiei genice.

Exista si un al doilea mecanism prin care RNAi poate inactiva stabil genele. Fragmente de ARN produse prin degradare in citosol pot patrunde in nucleu si interactiona cu gena tinta, directionandu-i impachetarea intr-o forma a cromatinei ce reprima transcriptia (heterocromatina).

Existenta acestor doua mecanisme de control al expresiei genice fac din RNAi o unealta utila de a bloca genele.

RNAi este frecvent utilizat pentru a inactiva genele la *Drosophila* si in culturi de celule mamifere. RNAi este de asemenea utilizat pentru studierea functiei genelor la nematodul *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*); pentru introducerea ARN-ului dublu catenar in animal, acesta poate fi fie direct injectat in intestinul viermelui, sau viermele poate fi hranit cu *Escherichia coli* (*E. coli*) care a fost modificat pentru a produce ARN. Recent, o tehnica similara a fost utilizata la soareci. In acest caz sunt utilizate tehnologiile ADN recombinant pentru a genera animale transgenice care sa exprime RNAi de la un promotor indus. Adesea acesta este un ARN special creat pentru a forma regiuni dublu-catenare intre secvente nucleotidice din aceeasi molecula, care sa fie recunoscut de catre sistemul RNAi. Acest proces inactiveaza doar genele care corespund perfect secventei de RNAi. In functie de promotorul utilizat, RNAi poate fi produs doar de anumite tesuturi sau doar in anumite momente ale dezvoltarii, permitand analiza detaliata a functiilor unor gene tinta.