



Assays Used in The Analysis of Untranslated Regions of Viruses

Seda Gözel^{1,a,*}, Cüneyt Tamer^{1,b}

¹ Department of Veterinary Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye

*Corresponding author

Review Article

History

Received: 10/01/2024

Accepted: 26/02/2024

Acknowledgement

The study was presented in the form of an abstract in the 12th International Istanbul Scientific Research Congress On Health Sciences.

ABSTRACT

Untranslated regions (UTRs) of virus genomes are known to play crucial roles in the post-transcriptional regulation of gene expression, including modulation of the transport of mRNAs out of the nucleus and of translation efficiency, subcellular localisation and stability. Extensive research on the molecular profiling of various diseases has revealed that the significance of untranslated regions of messenger RNAs (mRNAs) in disease progression and susceptibility is greater than previously understood. Therefore, the methods utilised in mapping and detecting these regions have aroused significant interest. Inevitably, further research is needed to acquire a more comprehensive understanding of the mutations in these regions and their potential effects on the progression of the disease. In this review, we focused on highlighting the methodologies used for detection of untranslated regions. These tests are mainly Primer Extension Assay, S1 Nuclease Assay, RNase Protection Assay, and Rapid Amplification of cDNA Ends Assay. These assays serve the purpose of mapping the 5' and 3' termini of an RNA and quantifying the amount of RNA by extending a primer using reverse transcriptase.

Keywords: 5' UTR, 3' UTR, RACE

Protein Kodlanmayan Bölgelerin (Utr) Rolü ve Bu Bölgelerin Haritalanmasında Kullanılan Başlıca Yöntemler

Süreç

Geliş: 10/01/2024

Kabul: 26/02/2024

Teşekkür

Bu çalışma 12. Uluslararası İstanbul Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırmalar Kongresi'nde özet olarak sunulmuştur.

Copyright



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Öz

Virüs genomlarının protein kodlanmayan bölgelerinin (UTR'ler), mRNA'ların çekirdek dışına taşınmasından transkripsiyonun etkili geçmesine kadar ki süreçte ve gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde önemli roller oynadığı bilinmektedir. Birçok viral hastalığın moleküler profilinin ortaya çıkarılması, mRNA'ların protein kodlanmayan bölgelerinin predispozisyon ve patogeneizde düşünülenden daha önemli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, bu bölgelerin haritalanması ve tespitinde seçilecek yöntemler önem kazanmaya devam etmektedir. UTR'de meydana gelen mutasyonlar ve bunların hastalık oluşumuna etkileri hakkında daha detaylı bilgi edinilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, protein kodlanmayan bölgeler ve bu bölgeleri haritalandırmak için kullanılan testler anlatılmaktadır. Bu testler Primer Extension Testi, S1 Nuclease Testi, RNase Protection Testi ve Rapid Amplification of cDNA Ends Test'i içermektedir. Bu testler, bir RNA'nın 5' ve 3' terminalini haritalamak ve ters transkriptaz kullanarak bir primeri uzatarak belirli bir RNA miktarını ölçmek için kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: 5' UTR, 3' UTR, RACE

^a seda.gozel@omu.edu.tr

^b 0000-0003-2976-5245

^a cuneyt.tamer@omu.edu.tr

^b 0000-0003-3240-8425

How to Cite: Gozel S, Tamer C (2024) Assays Used in The Analysis of Untranslated Regions of Viruses, Turkish Veterinary Journal, 6(1): 17-22

Giriş

5' ve 3' protein kodlanmayan bölgeler (UTR'ler), hücrel homeostazın sürdürülmesi için gerekli olan transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinin önemli noktalarında görev almaktadır. Bu süreçler, belirli düzenleyici unsurların mutasyonu veya yanlış ifade edilmesi sebebiyle ters gittiğinde, gen ekspresyonunun sonraki aşamalarında değişimlere yol açmaktadır (Schuster ve Hsieh, 2019). Transkripsiyon sonrası süreçler, protein ekspresyonundaki varyasyonun yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır (Schwanhäusser ve ark.,2011).

5' ve 3' protein kodlanmayan bölgeler (UTR'ler), kritik transkripsiyon sonrası gen düzenleme süreçlerini kontrol eden mRNA alanlarıdır. Transkribe edilen, ancak nadiren translasyona uğrayan bölgeler olarak, 5' ve 3' UTR'ler, pre-mRNA işleme, mRNA stabilitesi ve translasyon başlatma ile ilgili sayısız düzenleyici unsur içerir.UTR'lerin gen ekspresyonunu düzenlemedeki önemi, UTR'yi değiştiren mutasyonların ciddi patolojiye yol açabileceğinin bulunmasıyla vurgulanmaktadır (Matoulova ve ark., 2012).

5' ve 3' UTR'lerin nükleotid kalıpları veya motifleri spesifik RNA-bağlayıcı proteinlerle etkileşime girebilir. Bununla birlikte, DNA aracılı düzenleyici sinyallerin aksine, aktivitelerine esasen birincil yapıları aracılık eder. 5' UTR'lerin ortalama uzunluğu çeşitli taksonomik sınıflarda kabaca sabittir ve 100 ila 200 nükleotid arasında değişirken, 3' UTR'lerin ortalama uzunluğu çok daha değişkendir; bitki ve mantarlarda yaklaşık 200 nükleotidden insan ve diğer omurgalılarda 800 nükleotide kadar değişir. Hem 5' hem de 3' UTR'lerin uzunluğunun bir tür içinde bir düzine nükleotitten birkaç bine kadar çok değişkenlik göstermesi dikkat çekicidir (Pesole ve ark., 2001).

Bir mRNA'nın UTR'lerine karşılık gelen genomik bölge, 5' UTR'de 3' UTR'den daha sık olmak üzere intronlar içerebilir. Bunların doku, gelişim aşaması veya hastalık durumuna göre bol miktarda değiştiği ve gen ifadesi modelini önemli ölçüde etkileyebildiği gösterilmiştir (Grabowski ve Black, 2001).

5' ve 3' UTR dizilerinin baz bileşimi de farklıdır; 5' UTR dizilerinin G+C içeriği 3' UTR dizilerinden daha fazladır. Bu fark, G+C içeriği 5'UTR için yaklaşık %60 ve 3' UTR için %45 olan sıcakkanlı omurgalılarının mRNA'larında daha belirgindir (Pesole ve ark., 1997).

Tüm mRNA boyunca bulunan özellikler çeviri verimliliğini etkileyebilir. 5' UTR'nin yapısal özellikleri mRNA translasyonunun kontrolünde önemli bir role sahiptir. Hepsisi güçlü ve hassas bir şekilde düzenlenmesi gereken büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri veya proto-onkogenler gibi gelişimsel süreçlerde yer alan proteinleri kodlayan haberci RNA'lar genellikle 5' UTR'leri ortalamadan daha uzundur. 3' UTR, sıra ve boyut olarak değişkendir; durdurma kodunu ile poli(A) kuyruğu arasında uzanır. Daha da önemlisi, 3' UTR dizisi, mRNA dönüşümünü, stabilitesini ve lokalizasyonunu belirleyen birkaç düzenleyici motifi barındırır; bu nedenle, transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinin birçok yönünü düzenlemektedir (Kozak, 1987).

Temel olarak, 3' UTR'ler hücrelerde iki önemli işlevi yerine getirir: Birincisi, 3' UTR'ler, ortak transkripsiyonel mRNA'nın işlenme aşamasında bölünme ve poliadenilasyon oluşumunu sağlar. İkincisi ise 3' UTR'ler, hücrelerin çeşitli transkripsiyon sonrası mekanizmalar yoluyla bir mRNA'nın sonraki aşamalarda kaderini belirler. Bu süreci cis-etikili elemanlar ve mRNA stabilitesini ve translasyon etkinliğini modüle edebilen RNA bağlayıcı proteinler ile ortak bir şekilde yürütmektedir. Bölünme ve poliadenilasyon, birincil transkriptlerin olgun mRNA'ların elde edilmesi ve protein ekspresyonu için temel adımlardır (Mitschka ve ark., 2021).

5' UTR, mRNA'ya ribozomların bağlanması ve translasyonu düzenleyen mekanizmalarla ilgili birçok süreçte kritik bir role sahiptir. 5' UTR ile translasyon kontrolü, doğrudan indüksiyonla veya RNA bağlayıcı proteinlere (RBP'ler) bağlanma yeteneğini yok ederek kaynaklanabilir. Bazı RBP'lerin 5' UTR'lere veya 3' UTR'lere bağlanarak pozisyona bağlı bir şekilde UTR dizileri üzerinde farklı şekilde hareket edebileceğine dair kanıtlar vardır. Bu mekanizmanın örnekleri metazoan demir düzenleyici proteinlerdir (IRP'ler). Bunlar 5' UTR'lerle

etkileşime girdiklerinde mRNA translasyonunu inhibe ederken, 3'UTR dizisine bağlandıklarında mRNA'nın stabilitesini artırarak onu degradasyona daha az duyarlı hale getirirler (Kühn, 2015).

Mikrodizilerin ortaya çıkışı ve güçlü biyoinformatik analiz, yalnızca yeni genlerin keşfedilmesine yol açmamış, aynı zamanda mevcut genlerin analizi için araçlar da sağlamıştır. Bu derlemedeki amacımız ise yukarıda anlatılmış olan protein kodlanmayan bölgelerin haritalandırılmasında kullanılan testler hakkında kısaca bilgi vermektir.

Primer Extension Testi

Primer extension analizi ilk olarak P.K. Ghosh ve S.M. Weissman tarafından keşfedilmiştir. Yeni bir gen için başlangıç bölgesini belirlemek amacıyla kullanılabilecek bir yöntem olarak önermişlerdir (Ghosh ve ark., 1978).

Primer extension analizi, RNA transkriptlerinin 5' uçlarını haritalamak, RNA seviyelerini ölçmek ve az yoğunlukta olan RNA türlerini tespit etmek için kullanılmaktadır. Yöntem, RNA'ya bağımlı DNA polimeraz olarak da bilinen ters transkriptazı kullanır. Tüm DNA polimerazları gibi, bu enzim de hem kopyalanacak bir şablona hem de genişletilecek bir primere ihtiyaç duymaktadır (Shumaker ve ark., 1996).

Primer extension testi, RNA yapısını ve ekspresyonunu analiz etmek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikle RNA analizi dört temel adımı içerir; (1) ilgilenilen transkriptleri tamamlayıcı radyoaktif olarak işaretlenmiş bir primerin seçilmesi ve hazırlanması, (2) bu primerin RNA'ların tamamlayıcı bölgesine hibritlenmesi, (3) RNA'yı şablon olarak kullanarak reverse transkriptaz ile katalize edilen primerin uzatılması ve (4) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve ardından otoradyografi kullanılarak uzatılmış DNA ürünlerinin analizi. Primerin 5' ucundan şablonun sonuna kadar olan nükleotit sayısı, bir jel üzerindeki genişletilmiş DNA'ların göç hızından belirlenebilir. Primer, bu RNA transkriptlerinin yoğunluğunun doğru bir şekilde ölçülmesini sağlamak için tamamlayıcı RNA'dan fazla olmaktadır (Boorstein ve Craig, 1989).

Primer extension testindeki en büyük zorluk, ters transkriptazın duraklamasına veya sonlanmasına neden olan RNA bölgeleriyle karşılaşılmasıdır. Ortaya çıkan "kısa duraklar", jel üzerinde orta büyüklükte bantlar olarak ortaya çıkar hem yorumlamayı güçleştirir hem de tamamen uzatılmış primerin verimini azaltır. Bu tür sonlandırma bölgelerine, geniş G-C bakımından zengin RNA uzantıları veya RNA içindeki ikincil yapılar neden olabilir (Carey ve ark., 2013).

S1 Nükleaz Testi

Aspergillus oryzae'den izole edilen S1 nükleaz, tek sarmallı nükleik asitleri 5'-fosfat ve 3'-hidroksil grupları ile mono ve oligonükleotitlere spesifik olarak hidrolize eden bir endodeoksiribonükleaz ve bir endoribonükleazdır. Bazı çiftli DNA ve RNA sarmallarının fosfodiester bağları, tek sarmallı nükleik asitlere göre daha yavaş parçalanır (Berk, 1989).

Temel S1 nükleaz haritalama tekniği, bir RNA ile etiketli bir DNA probunun o RNA türüyle hibridize edilmesinden ve hibridize olmayan bölgeleri parçalamak için S1 nükleazın kullanılmasından oluşmaktadır. S1 nükleaz, eşleşmemiş DNA ve RNA'yı parçalayarak, transkripsiyonel başlangıç bölgesinden ilk ekzon bölgesine kadar RNA'nın uzunluğuna karşılık gelen bir parça ortaya çıkaracaktır (Smith, 1993).

Bu teknik, RNA transkriptlerini ölçmek ve haritalamak için kullanılır. Özellikle intronları ve kopyalanan gen bölgelerinin 5' ve 3' uçlarını haritalayabilir. mRNA miktarını ölçebildiğinden dolayı hücredeki genin transkripsiyon seviyesini belirleyebilir. Bunun dışında çift sarmallı RNA'nın varlığını algılayabildiği için RNA girişimini de belirleyebilir (Clark ve Pazdernik, 2013).

Testin mantığı şu şekildedir: Toplam hücresel RNA gibi karmaşık bir RNA numunesi, kodlama dizisinin tümünü veya bir kısmını içeren, radyoaktif olarak işaretlenmiş, saflaştırılmış bir DNA parçasına hibridize edilir. Hibridizasyonun özgülüğünden dolayı, DNA "probu" kompleks karışımda yalnızca tamamlayıcı RNA'ya hibritlenir. Hibridizasyonun ardından reaksiyon ürünleri, hibrit yapıları stabilize eden tuz ve sıcaklık koşulları altında nükleaz S1 ile parçalanır. S1 hem bir ribonükleaz hem de bir deoksiribonükleaz olduğu için hibritleşmemiş RNA da parçalanır. S1 dirençli RNA etiketli DNA hibritleri daha sonra etanol çöktürmesi ile geri kazanılır (Smith, 1993).

Reaksiyon sonunda, kalan DNA-RNA hibritleri daha sonra jel elektroforezi ile ayrılır ve otoradyografi ile görselleştirilir. Yöntem, RNA'ları ölçmek, intronların konumlarını haritalamak ve klonlanmış DNA şablonları üzerindeki mRNA'ların 5' ve 3' uçlarının konumlarını belirlemek için kullanılabilir (Green ve Sambrook, 2021).

S1 nükleaz bazen RNA/DNA hibridinin uçlarını hafifçe bozabilir veya tek sarmallı bölgeleri tam olarak parçalamayabilir. Sonuç olarak, S1 nükleaz yöntemi, primer extension testi kadar doğru sonuç vermeyebilir. Bununla birlikte, primer extension testi bir transkriptin 3' ucunu tespit edemez ve bunun için en iyi yol S1 nükleaz haritalamasıdır.

RNASE Protection Testi

RNase Protection testi, 1980'lerin başında, belirli bir nükleotitte başlatılan mRNA transkriptlerinin nicelleştirilmesinin tespiti için geliştirilmiştir. Metodun daha sonraki yıllarda transkripsiyon başlangıç yerlerini tanımlamak için de yararlı olduğu kanıtlanmış ve ayrıca RNA 3' uçlarının tasviri için de kullanılabilirliği tespit edilmiştir (Gilman, 1993).

RNase protection testi (RPA) sadece düşük yoğunlukta ve dokuya özgü mRNA ekspresyonunun kantasyonu için değil, aynı zamanda ekzon – intron sınırlarının haritalanması, transkripsiyon başlatma ve sonlandırma yerlerinin tespiti için de kullanılan bir yöntemdir. RPA nispeten basit, yüksek oranda tekrarlanabilir ve son derece hassastır. En önemlisi, hedef mRNA seviyelerinin tespiti ve miktarının belirlenmesi için en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir. RPA'nın bir diğer önemli

avantajı, çoklu mRNA transkriptlerini aynı anda saptama ve niceme kapasitesi olmasıdır. Aynı numunede birkaç mRNA'nın eşzamanlı ölçümü, gelişimsel olarak düzenlenen gen ekspresyonu çalışmaları ve koordineli hücre içi sinyal yollarının transkripsiyonel kontrolünün anlaşılması için yararlı bir araç sağlamaktadır (Emery, 2007).

RNase (RPA), spesifik hücresel mRNA'ların hızlı tespiti, haritalanması ve miktarının belirlenmesi için önemli bir teknik olarak kullanılmaktadır. Bu teknik, ribonükleazların, aynı kökenli hedef mRNA'ya hibridize edilmiş bir radyo-etiketli antisens RNA probunu bozulmamış halde korurken, bir hücresel mRNA havuzundan hibritleşmemiş tek sarmallı RNA'yı indirgeme yeteneğine bağlıdır (Belin, 1996).

İlgili geni veya bunun bir kısmını içeren bir DNA segmenti, antisens RNA'nın sentezine yol açan bir plazmid vektörünün klonlama bölgesine klonlanır. Plazmid, bir restriksiyon enzimi ile ayrılır ve lineerleştirilmiş plazmid daha sonra uygun bakteriyofaj polimeraz ile kopyalanır. Dahil edilmemiş radyoetiket, amonyum asetat varlığında tekrarlanan etanol çöktürmesi ile RNA probundan çıkarılır. Antisens radyoetiketli RNA probunun fazlası daha sonra hücresel mRNA'ya hibridize edilir. Hibritleşmemiş RNA, serbest probu çıkarmak için bir RNase A ve T1 karışımı ile parçalandıktan sonra, radyo-etiketli RNA:RNA hibriti, denatüre edici poli-akrilamid jel elektroforezi ve otoradyografi ile tespit edilir (Carey ve ark.,2013).

Bu tekniğin, parvovirüsler tarafından üretilen çeşitli alternatif olarak eklenmiş RNA'ları haritalamak ve ölçmek, alternatif ekleme ve alternatif poliadenilasyon arasındaki bağlantıları anlamak için kolay bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Enfeksiyon sırasında parvovirüsler tarafından üretilen pre-mRNA'ların alternatif eklenmesi ve poliadenilasyonunun incelenmesi için RPA'lar kullanılmaktadır (Venkatesh ve ark., 2012).

RNase protection prosedürü, primer extension testine bir alternatif olarak önerilmektedir. Primer extension ve RNase protection testi farklı prensiplere dayandığından ve farklı tipte den-eyisel ürünlere duyarlı olduğundan, bir transkripsiyon başlangıç yerinin belgelenmesi için genel-likle her ikisinin de kullanılması önerilmektedir. RNase protection testi, primer extension testinden daha fazla zaman alır, ancak 5' Rapid Amplification of cDNA Ends testi (RACE) haricinde, genellikle başlangıç yeri lokalizasyonu için en hassas yöntemdir (Ma ve ark., 1996).

RNase protection testi prosedürünün birincil dezavantajı, hibridizasyon ve parçalama koşullarının ampirik olarak belirlenmesi gerektiğinden, yeni bir gen için tahlilin oluşturulmasının zor olabilmesidir. Ayrıca radyo-etiketli prob, istenmeyen RNase'a dirençli ürünler üretebilen kararlı ikincil yapıların oluşumuna karşı hassastır. Son olarak, yüksek spesifik aktiviteye sahip radyoaktif işaretli proplar, hızla radyolize maruz kalma eğiliminde olduklarından yalnızca birkaç gün kullanılabilir. Bunun aksine, primer extension testi için işaretlenmiş oligonükleotit primerleri genellikle bir aya kadar kullanılabilir (Zhao ve ark., 2020).

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) Testi

RACE testini 1988 yılında Frohman ve arkadaşları geliştirmiştir. Bir cDNA molekülündeki tek bir kısa sekans ile bunun bilinmeyen 3' veya 5' ucu arasındaki bölgenin amplifikasyonu ve klonlanmasını sağlayan bu tekniğin bir uygulamasını tasarlamışlardır. Burada, "cDNA uçlarının hızlı amplifikasyonu" (RACE) olarak adlandırılan bu stratejinin faydasını, erken fare embriyosunda düşük yoğunlukta eksprese edilen int-2 geninin transkriptlerini temsil eden klonları elde etmek için kullanarak göstermişlerdir (Zhang ve Frohman, 1997).

RACE, sırasıyla mRNA ve cDNA ile başlayan transkriptlerin uçlarını çoğaltmak için öncelikle RT-PZR (Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) reaksiyonlarını kullanır. RACE gerçekleştirmek için ilgili mRNA'nın kısmi veya tam dizisi bilinmelidir. Bu, amplifikasyonlar için kullanılacak Gene Spesifik Primerleri (GSP'ler) oluşturmak için gereklidir. Mesajın bilinmeyen ucundan 3' ucunun bilinen bölgesine uzanan ikinci bir primer seti, poli (A) kuyruğu (veya ekli bir homopolimer) tarafından sağlanırken, 5' sonu ekli homopolimer kuyruğu için kullanılır. "Klasik" ve "yeni" RACE arasındaki ilk ve belki de en önemli fark burada yatmaktadır. Klasik RACE'de, homopolimer, mRNA ters kopyalanırdan sonra eklenirken, "yeni" RACE'de homopolimer, ters transkriptaz reaksiyonundan önce eklenir. Bu basit fark, tam uzunlukta olmayan ürünlerin amplifikasyonunu ortadan kaldırır ve bu da transkripsiyon başlangıç yerlerini belirleme yeteneğini büyük ölçüde geliştirir. mRNA, cDNA'ya ters transkribe edildikten sonra, 5' ve 3' uçları, gene özgü primerler ve RNA oligonükleotid dizisinden (eklenmiş homopolimer) türetilen primerler kullanılarak iki nested PZR kullanılarak amplifiye edilir. Ardışık nested PZR kullanılması istenmeyen ürünlerin amplifikasyonunu azaltmak için önemlidir, çünkü her reaksiyonda primerlerden sadece biri ilgilenilen gene özgüdür ve diğeri başlangıç karışımında bulunan tüm cDNA'lara bağlanır (Yeku ve Frohman, 2011).

Başlangıç mRNA karışımı, shrimp alkalin fosfataz (SAP) ile defosforile edilir. Bu, bozulmuş ve kapaksız mRNA'ları defosforile ederek, metillenmiş "G" başlıkları bozulmamış tam uzunluktaki mRNA'ları bırakır. Metillenmiş "G" başlığı daha sonra tütün asidi pirofosfataz (TAP) ile çıkarılır. TAP ile yapılan işlem, mRNA'nın fosforile edilmiş 5' ucunu açığa çıkarır ve onu bağlayıcıya veya homopolimere ligasyon için hazırlar. Doğrusallaştırılmış bir plazmidin in vitro transkripsiyonu ile hazırlanan kısa bir sentetik RNA, T4 RNA ligaz kullanılarak kapaksız 5' ve 3' uca bağlanır. Bozunmuş veya diğer tam uzunlukta olmayan mRNA, fosforile edilmedikleri için sentetik oligonükleotid ile bağlanmayacaktır. mRNA-RNA oligonükleotid hibritleri daha sonra bir GSP kullanılarak ters kopyalanır. Önceki adımdan üretilen tam uzunluktaki cDNA daha sonra 5' ve 3' uçlarında tam uzunluktaki cDNA uçlarını çoğaltmak için kullanılabilen spesifik diziler içerir. Tam uzunluktaki cDNA ürününü yüksek özgüllükle çoğaltmak için iki Nested PZR kullanılır (Frohman, 1990).

Klasik RACE; 3' uç kısmi cDNA klonları oluşturmak için, mRNA, 17 nt oligo (dT) ve ardından birçok raporda bir "anchor" primeri olarak gösterilen özgün bir 35 bazlı oligonükleotid dizisi içeren bir "hibrit" primer kullanılarak ters transkripsiyona tabi tutulur. Daha sonra amplifikasyon, artık her bir cDNA'ya 3' ucunda bağlanan bu sekansın (Qo) bir kısmını içeren bir primer ve ilgili genden türetilen bir primer (GSP1) kullanılarak gerçekleştirilir (Fromont-Racine ve ark., 1993). Daha sonra spesifik olmayan ürünlerin amplifikasyonunu bastırmak için "nested" primerler (Qr ve GSP2) kullanılarak ikinci bir amplifikasyon döngüsü gerçekleştirilir. 5' uçlu kısmi cDNA klonları üretmek, birinci sarmal ürünleri oluşturmak için gene özgü bir primer kullanılarak ters transkripsiyon gerçekleştirilir. Ardından, terminal deoksiniükleotidiltransferaz (TdT) ve deoksiadenozin trifosfat (dATP) kullanılarak bir poli (A) kuyruğu eklenir. Amplifikasyon daha sonra, cDNA'nın ikinci sarmalını, Qo primerini ve ters transkripsiyon için kullanılan yukarıda gene spesifik bir primeri oluşturmak için hibrit primer QT kullanılarak gerçekleştirilir. Son olarak, özgüllüğü artırmak için nested primerler (Qr ve GSP2) kullanılarak ikinci bir PZR döngüsü seti gerçekleştirilir (Frohman, 1994).

Yeni RACE, "anchor" primerinin ters transkripsiyon adımından önce mRNA'nın 5' ucu-na bağlanmasıyla Klasik RACE'den ayrılır; dolayısıyla anchor sekansı, ancak ve ancak ters transkripsiyon ilgili mRNA'nın tüm uzunluğu boyunca ilerlerse birinci sarmal cDNA'ya dahil olur. Yeni RACE'e başlamadan önce, mRNA, buzağı bağırsak fosfatazı (Crp) kullanılarak bir fosforilasyon adımına tabi tutulur. Bu adım aslında uçlarında metil-G başlıkları bulunan tam uzunluktaki mRNA'lara hiçbir şey yapmaz; ancak uçlarında kapaksız olan bozulmuş mRNA'ları defosforile eder. Bu, sonraki ligasyon adımı sırasında bozulmuş RNA'yı biyolojik olarak inert hale getirir, çünkü reaksiyonu yürütmek için fosfat grubu gereklidir. Tam uzunluktaki mRNA'lar daha sonra tütün asidi pirofosfataz (TAP) kullanılarak açılır ve bu da onları aktif ve fosforile edilmiş bir 5' ucuyla bırakır. T4 RNA Ligaz kullanılarak, bu mRNA daha sonra lineerleştirilmiş bir plazmidin in vitro transkripsiyonu ile üretilmiş kısa, sentetik bir RNA oligo'ya bağlanır. RNA oligo-mRNA hibritleri daha sonra birinci iplikçikli cDNA'yı yaratmak için gene özgü bir primer veya rastgele primerler kullanılarak ters kopyalanır. Son olarak, 5' cDNA ucu, ilave gen-spesifik primerler ve RNA oligo dizisinden türetilen primerler kullanılarak iki nested PZR ile amplifiye edilir (Volloch ve ark., 2011).

Yeni RACE yaklaşımı ayrıca 3' cDNA uçları oluşturmak için kullanılabilir ve özellikle poliadenile olmayan RNA'lar için yararlıdır. Kısaca, sitoplazmik RNA fosforile edilir ve yukarıda açıklandığı gibi kısa, sentetik bir RNA oligo'ya bağlanır. Oligonun RNA'nın 5' ucuna bağlanması yukarıda vurgulanmış olmasına rağmen, RNA oligoları aslında sitoplazmik RNA'ların her iki ucuna da bağlanır. Ters transkripsiyon adımı için, RNA oligo dizisinden türetilen bir primer kullanılır. Sitoplazmik RNA'ların 3' ucuna bağlanan RNA oligolarının ters transkripsiyonu, 3' ucuna eklenmiş RNA oligo dizisine sahip cDNA'ların yaratılmasıyla

sonuçlanır. 5'ten 3' yönüne yönlendirilmiş gene özgü primerler ve Yeni RACE primerleri, 3'ü çoğaltmak için nested PZR kullanılabilir (Tessier ve ark., 1986, Liu ve Gorovsky 1993).

RACE klonlaması birkaç nedenden dolayı avantajlıdır. İlk olarak, cDNA kitaplıklarının taranması, tek tek cDNA klonlarının elde edilmesi ve eksik dizinin mevcut olup olmadığının saptanması için klonların analiz edilmesi haftalar alır; bu metot kullanılarak, bu tür bilgiler birkaç gün içinde üretilebilir. Sonuç olarak, tam uzunluktaki cDNA'lar üretilip gözlemlenene kadar RNA hazırlama veya ters transkripsiyon koşullarını değiştirmek pratik hale gelir. Ek olarak, genellikle bir ila birkaç cDNA klonunun geri kazanıldığı kitaplık ekranlarının aksine, RACE kullanılarak esasen sınırsız sayıda bağımsız klon üretilebilir (Wang ve Young, 2003).

Sonuç

Sonuç olarak, mRNA'ların protein kodlanmayan bölgeleri gen düzenlemesinin birçok noktasında önemli rollere sahiptir. Belirli bir genin düzenlenmesinde rol oynayan faktörlerin anlaşılması, moleküler tedaviler tasarlanırken veya bir genin ekspresyonunu belirlerken büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple bu bölgelerin haritalandırılması, tespit edilmesinde kullanılan yöntemler gün geçtikçe daha da önem kazanmaya devam etmektedir. Dolayısıyla yukarıda bahsedilen testler bu bölgelerde meydana gelen mutasyonlar ve hastalığın oluşumu üzerine etkilerini belirlemek için kullanılacak metotlardır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Kaynaklar

Bartlett & D. Stirling (Eds.). PCR Protocols, Humana Press., Totowa, NJ. 105-115.

Belin, D. (1996). The RNase protection assay. In Basic DNA and RNA Protocols, Springer, 131-136.

Berk, A. J. (1989). Characterization of RNA molecules by S1 nuclease analysis. In Methods in Enzymology, Academic Press, 334-347. doi: 10.1016/0076-6879(89)80110-7.

Boorstein, W. R., Craig, E. A. (1989). Primer extension analysis of RNA. In Methods in Enzymology, Academic Press, 347-369. doi: 10.1016/0076-6879(89)80111-9.

Carey, M. F., Peterson, C. L., Smale, S. T. (2013). The primer extension assay, Cold Spring Harb Protoc, 164-173. doi:10.1101/pdb.prot071902.

Clark, D. P., Pazdernik, N. J. (2013). Chapter 19 - Analysis of Gene Expression. In D. P. Clark, N. J. Pazdernik (Eds.), Molecular Biology (Second Edition), 581-614, Academic Press, Boston.

Emery, P. (2007). RNase Protection Assay. In E. Rosato (Ed.), Circadian Rhythms: Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 343-348.

Frohman, M. A. (1990). RACE: rapid amplification of cDNA ends. PCR protocols. A guide to methods and applications, 28.

Fromont-Racine, M., Bertrand, E., Pictet, R., Grange, T. (1993). A highly sensitive method for mapping the 5' termini of mRNAs. Nucleic Acids Res 21, 1683-1684. doi:10.1093/nar/21.7.1683.

Ghosh, P., Reddy, V., Swinscoe, J., Lebowitz, P., Weissman, S. (1978). Heterogeneity and 5'-terminal structures of the late RNAs of simian virus. Journal of molecular biology, 126(4), 813-846. doi:10.1016/0022-2836(78)90022-0.

Gilman, M. (1993). Ribonuclease protection assay. Current protocols in molecular biology, 24(1), 4.7. 1-4.7. 8. doi:10.1002/0471142727.mb0407s24.

Grabowski PJ, Black DL. (2001). Alternative RNA splicing in the nervous system. Prog Neu-robiol, 65, 289-308. doi:10.1016/S0301-0082(01)00007-7.

Green, M. R., Sambrook, J. (2021). Mapping RNA with Nuclease S1. Cold Spring Harb Pro-toc, 2021(5). doi:10.1101/pdb.prot101824.

Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic acids research, 15(20), 8125-8148. doi:10.1093/nar/15.20.8125.

Kühn, L. C. (2015). Iron regulatory proteins and their role in controlling iron metabolism. Metallomics, 7(2), 232-243. doi:10.1039/c4mt00164h.

Liu, X., Gorovsky, M. A. (1993). Mapping the 5' and 3' ends of Tetrahymena thermophila mRNAs using RNA ligase mediated amplification of cDNA ends (RLM-RACE). Nucleic Acids Res, 21, 4954-4960. doi:10.1093/nar/21.21.4954.

Ma, Y. J., Dissen, G. A., Rage, F., Ojeda, S. R. (1996). RNase protection assay. Methods, 10(3), 273-278. doi:10.1006/meth.1996.0102

Matoulikova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. RNA Bio-logy, 9(5), 563-576. doi:10.4161/rna.20231.

Mitschka, S., Fansler, M. M., & Mayr, C. (2021). Chapter Eighteen - Generation of 3'UTR knockout cell lines by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. In B. Tian (Ed.), Methods in Enzymology, Vol. 655, pp. 427-457. doi:10.1016/bs.mie.2021.03.014.

Tessier, D. C., Brousseau, R., Vernet, T. (1986). Ligation of single-stranded oligodeoxyribo-nucleotides by T4 RNA ligase. Anal Biochem, 158, 171-178. doi:10.1016/0003-2697(86)90606-8.

Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S. (2001). Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. Gene, 276, 73-81. doi:10.1016/S0378-1119(01)00674-6.

Pesole G, Liuni S, Grillo G, Saccone C. (1997). Structural and compositional features of untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Gene, 205, 95-102. doi:10.1016/S0378-1119(97)00407-1.

Schuster, S. L., Hsieh, A. C. (2019). The Untranslated Regions of mRNAs in Cancer. Trends in cancer, 5(4), 245-262. doi:10.1016/j.trecan.2019.02.011.

- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., ... & Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347), 337-342. doi:10.1038/nature10098.
- Shumaker, J. M., Metspalu, A., Caskey, C. T. (1996). Mutation detection by solid phase primer extension. *Human mutation*, 7(4), 346-354. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1996)7:4<3C346::AID-HUMU9%3E3.0.CO;2-6.
- Smith, D. R. (1993). *S1 Nuclease Protection Mapping. Transgenesis Techniques: Principles and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 363-372.
- Venkatesh, L. K., Fasina, O., Pintel, D. J. (2012). RNAse mapping and quantitation of RNA isoforms. *RNA Abundance Analysis*, Springer, 121-129.
- Volloch, V., Schweitzer, B., Zhang, X., Rits, S. (1991). Identification of negative-strand complements to cytochrome oxidase subunit III RNA in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10671-10675. doi:10.1073/pnas.88.23.10671.
- Yeku, O., Frohman, M. A. (2011). Rapid amplification of cDNA ends (RACE). In *RNA*, Springer, 107-122.
- Zhao, J., Tang, J., Elfman, J., Li, H. (2020). RNase Protection Assay. In *Chimeric RNA*, Springer, 109-116.
- Zhang, Y., Frohman, M. A. (1997). Using rapid amplification of cDNA ends (RACE) to obtain full-length cDNAs. In *cDNA library protocols*, Springer, 61-87.
- Wang, X., Scott Young, W. (2003). Rapid Amplification of cDNA Ends. In J. M. S.