



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

138121

**AKUT VE KRONİK HEPATİT B İNFEKSİYONLU HASTALARDA
HEPATİT B VİRÜSÜ X GENİNDEKİ MUTASYONLARIN İNCELENMESİ
VE KLİNİK İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

PINAR UYSAL ONGANER

DOKTORA TEZİ

138121

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe Özer

İSTANBUL – 2003

I) ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmam sırasında değerli bilgi ve görüşlerinden yararlandığım, her zaman manevi desteğini hissettiğim sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe ÖZER'e; yaptığım çalışma süresince bilimsel birikiminden faydalanma fırsatı bulduğum değerli hocam, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Beyazıt ÇIRAKOĞLU'na; laboratuvarında çalışma olanağı ve yeni bakış açıları kazanmamı sağlayan Dr. Tim HARRISON'a (UCL- İngiltere), dostluğuyla ve bilgisiyle yanımda olan sevgili çalışma arkadaşım Penelope L. MOORE'a (UCL- İngiltere), hasta serumlarını elde etmemde göstermiş oldukları yakın ilgiden dolayı Haydarpaşa Numune Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı Dr. Naz OĞUZ'a, çalışma arkadaşlarıma, bu çalışmayı maddi yönden kısmen desteklemiş olan Marmara Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkür etmeyi borç biliyorum.

Çalışmam sırasında maddi ve manevi desteğini esirgememiş olan sevgili eşim Çağ ONGANER'e, öğrenim hayatım boyunca güven ve destekleriyle bu günlere gelmemi sağlayan sevgili aileme de sonsuz sevgi ve teşekkürler...

II) İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. HBV'NİN TARİHÇESİ	4
4.2. HBV'NİN BULAŞMA YOLLARI VE RISK GRUPLARI	6
4.3. TÜRKİYE'DE HEPATİT B'NİN EPİDEMİYOLOJİSİ	8
4.4. HBV' NİN YAPISI	8
4.5. HBV'NİN GENOMİK YAPISI	10
4.6. AÇIK OKUMA ÇERÇEVELERİ (AOÇ)	11
4.7. HBV' NİN REPLİKASYONU	13
4.8. VIRAL DNA'NİN RNA'YA TRANSKRİPSİYONU	19
4.9. HEPATİT B VIRÜSÜ PROTEİNLERİ	20
4.9.1. Yüzey (S) Geni Ürünleri:	20
4.9.2. Kor Geni Ürünleri:	22
4.9.3. Polimeraz Geni Ürünleri:	23
4.9.4. X Geni Ürünü:	24
4.10. HBV GENOTİPLERİ	26
4.11. HBV MUTANTLARI	27
4.11.1. Prekor-kor bölgesi mutasyonları:	28
4.11.2. Prekor bölgesindeki diğer mutasyonlar:	31
4.11.3. Kor bölgesi mutasyonları:	31
4.11.4. Yüzey (S) geni mutasyonları:	32
4.11.5. Polimeraz geni mutasyonları:	33
4.11.6. X geni mutasyonları:	33
4.12. HBV'NİN KLİNİĞİ	34
4.12.1. Akut HBV İnfeksiyonu (AVH)	34
4.12.2. Kronik HBV İnfeksiyonu	35
5. GEREÇ ve YÖNTEM	37
5.1. KULLANILAN ALETLER	37
5.2. KİMYASAL MADDELER	38
5.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER	38
5.4. KULLANILAN PRIMERLER	40
5.5. DNA ELDESİ	42
5.6. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)	42
5.7. AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ	43
5.8. HBV GENOTİP ANALİZİ (RFLP YÖNTEMİ)	43
5.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	44
5.8.2. Agaroze Jel Elektrofözezi	45
5.8.3. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	46
5.9. DİZİ ANALİZİ	46
5.9.1. HBV Prekor-kor ve X Bölgelerinin Dizi Analizi ile İncelenmesi	46
5.9.2. PZR Ürününün Saflaştırılması	50
5.9.3. Dizi Analizi Reaksiyonu	51
5.9.3.1. Sanger Metodu	51
5.9.3.2. "Cycle Sequencing"	52
5.9.3.3. Kor / Dizi Analizi Reaksiyonu:	52
5.9.3.4. X Dizi Analizi Reaksiyonu:	53
5.9.4. Dizi Analizinde Kullanılan Elektrofözeze Sistemi	53
5.9.4.1. Jel Hazırlanması	53
5.9.4.2. Yüksek Voltaj Dizi Analizi Jel Elektrofözezi	54
5.9.5. Otoradyografi	54
6. BULGULAR	56
6.1. GENOTİP ANALİZİ	56
6.2. PREKOR-KOR BÖLGELERİNİN DİZİ ANALİZİ İLE İNCELENMESİ	60
6.3. X GEN BÖLGESİNİN DİZİ ANALİZİ İLE İNCELENMESİ	104

7. TARTIşMA VE SONUÇ.....	141
8. KAYNAKLAR.....	151
9. ÖZGEÇMİş	167



III. KISALTMALAR VE SİMGELER

aa	Aminoasit
A	Adenin
Amp	Amper
AOÇ	Açık Okuma Çerçevesi
AVH	Akut Viral Hepatit
bç	Baz Çifti
C	Sitozin
CCC	Kovalent bağlı kapalı çembersel yapı
cDNA	Komplementer DNA
dNTP	Deoksintükleotid trifosfat
ddNTP	Dideoksintükleosid trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Direkt tekrarlanan diziler
ε	Epsilon kök (stem loop) dizisi
EDTA	Disodyum etilenediamintetra-asetat
enh	“enhancer”
ER	Endoplazmik Retikulum
EtBr	Etidyum Bromid
G	Guanin
HBcAg	Hepatit B kor antijeni
HBsAg	Hepatit B e antijeni
HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni
HBxAg	Hepatit B x antijeni
HBV DNA	Hepatit B Virüs DNA’sı
HCC	Hepatosellüler Karsinoma
HDV	Hepatit Delta virüsü
HLA	İnsan histokompatibility lökosit antijen
Kd	Kilo dalton
LHBs	Hepatit B Büyük Yüzey Proteini
MHBs	Hepatit B Orta Yüzey Proteini
N	A, C, G, T nükleotidlerinden biri

NRE	Negatif Düzenleyici Eleman
mRNA	Mesajci RNA
mt	Mutant
nt	Nükleotid
PHCC	Primer Hepatosellüler Karsinoma
Pre-C	Prekor
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RE	Restriksiyon Endonükleaz
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki dönüm sayısı
S	C veya G
SHBs	Hepatit B Küçük Yüzey Proteini
T	Timin
TAE	Tris-asetat-EDTA
TBE	Tris-borat-EDTA
TF	Transkripsiyon Faktörü
UV	Ultraviyole
V	Volt
W	Watt

Tablo 3.1. Amino asit (aa) sembolleri

<u>Amino Asit</u>	<u>Üç Harfli Sembol</u>	<u>Bir Harf Sembol</u>	<u>Kodon</u>
Alanin	Ala	A	GCT, GCC, GCA, GCG
Arginin	Arg	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Asparagin	Asn	N	AAT, AAC
Aspartik asit	Asp	D	GAT, GAC
Sistein	Cys	C	TGT, TGC
Glutamin	Gln	Q	CAA, CAG
Glutamik asit	Glu	E	GAA, GAG, GAG
Glisin	Gly	G	GGT, GGC, GGA, GGG
Histidin	His	H	CAT, CAC
Izölösin	Ile	I	ATT, ATC, ATA
Lösin	Leu	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Lisin	Lys	K	AAA, AAG
Methionin	Met	M	ATG
Fenilalanin	Phe	F	TTT, TTC
Prolin	Pro	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Serin	Ser	S	AGT, AGC, TCT, TCC, TCA, TCG
Treonin	Thr	T	ACT, ACC, ACA, ACG
Triptofan	Trp	W	TGG
Tirozin	Tyr	Y	TAT, TAC
Valin	Val	V	GTT, GTC, GTA, GTG
Stop	Stop	Stop	TAA, TAG, TGA

1. ÖZET

HBV enfeksiyonunun ciddi seyirli olması, kronikleşmesi ve tedaviye yanıtı kalması konağın dışındaki etkenlerle de ilişkilendirilmektedir. Ülkemizde yaklaşık %8 oranında taşıyıcı popülasyonu bulunan HBV genomunda prekor- kor ve X bölgelerinde saptanan bazı mutasyonlar özellikle Akdeniz ülkelerinde sık görülen, HBeAg'nin sentezini önleyerek virüsün konağın bağışıklık sisteminden kurtulmasına neden olan A1896 mutasyonu bu durumlardan sorumlu tutulmaktadır. HBV genomunda oluşan her tip mutasyon virüsün yapı ve yaşam döngüsünü etkileyeceğinden enfeksiyon oluşturma sürecinden başlayarak tedavi seçeneğine kadar etkili olacağı açıktır.

Bu çalışmada, akut ve kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalar seçilerek X genine ait baz dizilerindeki olası değişikliklerin saptanması amaçlanmıştır. Genotipleri belirlenen 50 hastanın; X ve bu bölge ile üstüste gelen prekor-kor bölgeleri özgün primerler kullanılarak çoğaltılmış ve dizi analizi reaksiyonları ile baz dizileri belirlenmiştir. 42 olguda genotip D (% 84), 6 olguda ise genotip A (% 12) saptanmıştır. Genotipleri belirlenen olguların prekor-kor bölgelerinde belirlenen mutasyonlar şu şekildedir: 19 olguda (% 61) 1858. nükleotitteki sitozinin timidine (C→T) ,17 olguda (% 55) Akdeniz Ülkelerinde yaygın olarak görülen 1899. nükleotitteki guaninin adenine (G→A) dönüştüğü saptanmıştır. Sitozinin timine (C→T) değişmesiyle oluşan 1856. nükleotitteki mutasyon 5 olguda (% 16), 1862. nükleotitteki guaninin timine (G→A) dönüştüğü ise 2 olguda (% 6.4.) belirlenmiştir. 1 olguda (% 3.2) 1896. nükleotitteki guaninin adenine (G→A) dönüşmesiyle oluşan prekor stop kodon mutasyonu saptanmıştır. 1762. nükleotitteki adeninin timine (A→T) değişimi ve 1764. nükleotitteki guaninin adenine (G→A) değişimiyle belirlenen kor bölgesi mutasyonları 1 olguda (% 3.2) bulunmuştur. Dizi analizi çalışmaları sonucu genotipleri belirlenen olgularda, HBV X gen bölgesinde 12 değişik mutasyon, 4 farklı insersiyon tanımlanmıştır.

HBV'nin Türk toplumundaki heterojenitesine moleküler düzeyde açıklık getirmeyi amaçladığımız bu çalışmada, literatür ile uyumlu sonuçlara ek olarak prekor, kor ve X bölgelerinde bugüne kadar yayınlanmamış nokta mutasyonların varlığı da saptanmıştır.

2. SUMMARY

Analysis of Hepatitis B Virus (HBV) X Region Mutations From Acute and Chronic HBV Infected Patients And Investigation of Clinical Relations

The tendency of HBV to cause a more severe and chronic disease in certain cases and the reason for poor or intermittent response to therapy in those patients, have been related to facts other than that of the host. As it is common to Mediterranean countries, Turkey has a population ratio of 8 % that holds specific mutations in the precore region of HBV genome, especially at the A1896 stop codon mutation, which abolishes the synthesis of HBeAg. Thereby, causing the virus to escape from the immune system of the host. This mutation could be responsible for such cases.

The purpose of this study is to demonstrate X gene mutations in chronic and acute Hepatitis B patients. The HBV genotypes of 50 infected patients were determined. The X and the overlapping pre core- core regions have been amplified by PCR using specific primers and sequenced. Dominantly D genotype was found among the patients (42 of 50 patients, 84%). 6 out of 50 of them (12%) were A genotype. The samples that have been identified with a genotype display the following precore-core mutations: 19 of the samples (61 %) had change from cytosine to thymine (C→T) on nucleotide 1858, 17 (55%) had change from guanine to adenine (G→A) on nucleotide 1899, which is common among Mediterranean countries. A mutation on nucleotide 1856 had change from cytosine to thymine (C→T) among 5 (16 %) of them and 2 of them (6.4%) had change from guanine to thymine on nucleotide 1862. 1 sample (3.2 %) had a precore stop codon mutation from guanine to adenine (G→A) on nucleotide 1896. Also, a change from adenine to thymine (A→T) on nucleotide 1762 and another change from guanine to adenine (G→A) on nucleotide 1764 have been found on 1 (3.2 %) sample. From the samples whose genotypes have been determined by sequence analysis, 12 different mutations on HBV X gene region has been found and 4 distinct insertions have been identified.

The aim of this project has been to clarify the heterogeneity of HBV among the Turkish population using molecular techniques. In addition to the known mutations, new point mutations have been discovered in the precore, core and X regions, which have not been identified before and cause several amino acid changes.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Hepatit B virüs infeksiyonu, kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma gibi tedavisi güç, ciddi seyirli karaciğer hastalıklarına yol açmaktadır. Günümüzde kronik hepatit B virüsü taşıyıcısı yaklaşık 300 milyon kişi bulunmaktadır ve bu kişilerde siroz, bunu takiben hepatosellüler karsinoma görülme riski oldukça yüksektir. Ölümcül hastalıklar arasında 9. sırada yer alan HBV infeksiyonu, insanlık için önemli bir sağlık sorunu olma durumunu sürdürmektedir. İnfeksiyon, aşı uygulaması ile bir ölçüde engellenmekle beraber, kronik hepatit için henüz etkin bir tedavi geliştirilememiştir. Türkiye'de HBV taşıyıcılığının, bölgeler arası farklılıklar göstermesine karşın, yaklaşık % 8 olduğu sanılmaktadır. Bu nedenlerle, HBV infeksiyonu, diğer ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de halk sağlığı açısından büyük bir sorun teşkil etmektedir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. HBV'nin TARİHÇESİ

İlk kez Hipokrat tarafından tıbbi kayıtlara geçirilen viral hepatit insanlık tarihi kadar eski bir hastalıktır (11). Hastalığın ilk bilimsel tanımını 1865 yılında patalog Dr. Virchow, “Kataral iktter” olarak yapmış ve bu isimle literatüre dahil edilmiştir (60).

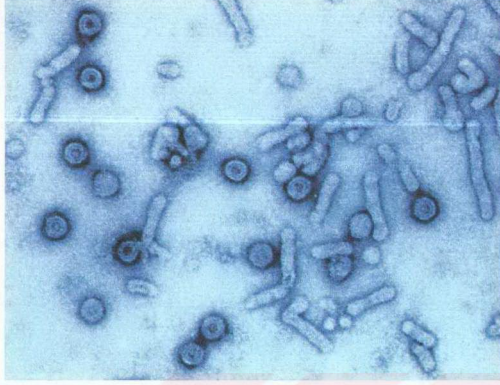
Daha sonra II. Dünya Savaşı sırasında hastalık Amerikan askeri birliklerinde epidemiyolojik bir problem olarak dikkati çekmiştir. Bu sırada hemen hemen aynı klinik tabloyu oluşturan birden fazla (o zaman için iki) viral etkenin bulunduğu ve bunların arasında kesin immunolojik farklılıklar olduğu anlaşılmıştır. Hastalığa etken mikroorganizmanın bir virüs olabileceği, 20. Yüzyılın başında kabul edilmiş olmasına rağmen, ancak 1947 yılında, epidemiyolojik özelliklere dayanarak, A ve B şeklinde tanımlanan iki farklı tablonun ayrımı yapılmıştır (12). O dönemde “serum hepatiti” olarak adlandırılan ve başlıca parenteral yoldan bulaştığı kabul edilen B tipi hepatit etkenine ait ilk bulgular 1963 yılında Blumberg ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (76). Blumberg ve arkadaşları polimorfik serum proteinleri konusunda yaptıkları çalışmayı yürütürlerken bir Avusturalya yerlisinin kanında o güne kadar tanımlanmamış yeni bir antijenin varlığını gözlemlemişlerdir (16). “Avustralya Antijeni (AuAg)” şeklinde isimlendirdikleri bu antijenin B tipi hepatitle ilişkisini ortaya koymuşlardır. 1970 yılında ise Dane ve arkadaşları immun elektron mikroskopisi tekniğini kullanarak inceledikleri hasta serumlarında, yüzeylerinde aynı antijeni taşıyan “virus -like” partikülleri saptamışlar ve bu partiküllerin “Hepatit B Virüsü (HBV)” olduğunu ileri sürmüşlerdir (6). 1973 yılına gelindiğinde Kaplan ve arkadaşları virüsün kor bölgesinde DNA'ya bağımlı DNA polimeraz varlığını saptamışlardır (40). Robinson ve arkadaşları ise HBV genomuna ait çeşitli özellikleri deneysel olarak göstermişlerdir (71).

İlk bulguları takiben, HBV konusunda yoğun çalışmalar yapılmış ve geliştirilen serolojik yöntemler aracılığı ile etkenin yeryüzünde ne denli yaygın olduğu saptanmıştır(95). Zuckerman ve Ghendon'un da vurguladıkları gibi, B virüsü hepatiti dünyanın bütün ülkeleri için en önemli sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir (70). Bugün tüm dünyada yaklaşık iki milyardan fazla kişinin bu virüs ile temas etmiş olduğu; % 95'i gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere ortalama 300 milyon

kişinin HBV taşıyıcısı olduğu hesaplanmaktadır. Hastalığın kronikleşmeye eğilimli olması, kronik karaciğer hastalıklarına, siroza ve hepatosellüler karsinomaya neden oluşu dolayısı ile B virüsü hepatiti büyük bir sorun teşkil etmektedir (14). Hepatosellüler karsinoma, en sık görülen bir kaç kanser arasında yer almakta ve HBV de bunun en büyük nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. HBV taşıyıcılarında karaciğer kanserine yakalanma riskinin ortalama 200 kat daha arttığı saptanmıştır.

Etkenin doku kültürlerinde üretilmemesi ve hayvan deneylerinin sadece belirli maymun türleri ile sınırlı olması, serolojik incelemeler dışında, HBV konusundaki çalışmaların 1980'li yıllara kadar kısıtlı kalmasına yol açmıştır. Ancak bu tarihten sonra, çeşitli hayvanlarda HBV'ne benzer virüslerin gösterilmesi ve nihayet moleküler biyoloji konusundaki ilerlemeler, bu virüs ile ilgili hızlı bilgi birikimini sağlamıştır. Rekombinant DNA teknikleri kullanılarak virüsün yapısı aydınlatılmış; karaciğer ve serumda HBV'nü araştırma imkanları doğmuş ve genomun replikasyon mekanizması tam olarak açıklanmıştır.

Hepatotropizm eğilimindeki hepadna virüslerin biyolojik özellikleri konusunda yapılan çalışmalar, bu virüslerin ciddi boyutlarda hücre yıkımına yol açar tarzda sitotoksiste göstermediklerini ancak akut ya da kronik hepatit tablosunun virüs proteinlerini eksprese eden hepatositlerin konak savunma mekanizmalarına hedef olması sonucu ortaya çıktığını kanıtlamıştır. HBV'nun hangi mekanizmayla karaciğerde hasar yaptığı bilinmemektedir. Virüsün sitopatik olmadığı, infekte hepatositlere karşı gelişen immün yanıtın karaciğer hasarından sorumlu olduğu sanılmaktadır. Bu durumda konakçının immün cevabının etkinliği yanı sıra virüsün antijenik yapısındaki, antijen ekspresyonu ve replikasyon kapasitesindeki değişiklikler de karaciğer hasarının farklı görünümüne neden olabilir. Virüse ait bu faktörler doğal olarak virüsün genomik yapısındaki değişikliklerle yakından ilişkilidir. Bu nedenle HBV enfeksiyonlarının akut, kendi kendini sınırlayan hepatitten, asemptomatik taşıyıcılığa, fulminan hepatitten, kronik hepatite ve karaciğer kanserine kadar değişen farklı klinik görünümünden virüsün genomik değişikliklerinin sorumlu olup olmadığı merak edilmiştir. Moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesi virüs genomundaki değişikliklerin daha kolay ve daha geniş incelenmesini sağlamıştır. Son on yılda HBV'ne ait genetik değişiklikler ve bunların hastalığın kliniği ile ilişkileri çok sayıda araştırmanın konusu olmuştur. Şekil 4.1'de HBV'nin elektron mikrografi görünmektedir.



Şekil 4.1 Hepatit B virüsünün elektron mikrografı (H.-W. Zentgraf, Heidelberg)

4.2. HBV'nin Bulaşma Yolları ve Risk Grupları:

Hepatit B'nin yayılmasındaki en büyük etken dünyada 300 milyonluk bir rezervuar olan taşıyıcılardır. HBV'nin en yoğun bulunduğu vücut sıvıları kan, semen ve vaginal sekresyonlar olup, bu vücut sıvılarıyla bulaşma riski daha fazladır. Bunların dışında tükürük, ter, gözyaşı, süt, nazofarengeal sıvılar, asit sıvısı diğer vücut sıvıları da potansiyel olarak infeksiyözdür (8,25,70).

HBV'nin dört ana bulaşma paterni vardır: Perkütanöz (parenteral), perinatal, horizontal ve cinsel temas (Şekil 4.2).

Perkütan bulaşma paterni en çok araştırılan ve en iyi bilinen bulaşma çeşitidir. Perkütan bulaşma virüsle kontamine kan ve kan ürünleri, cerrahi aletler, iğne, enjektör, İV (damar içi) uyuşturucu kullanımı, döğme, akupunktur, kulak delme, diş fırçası, traş ve müköz membranlara sıçrama gibi nedenlerle olmaktadır. Hastanelerin diyaliz ve kan merkezleri, onkoloji-hematoloji klinikleri ve laboratuvar gibi kısımlarında hastadan hastaya, hastadan personele veya kontamine aletler yoluyla HBV bulaşı çok sık görülmektedir. Bunlara ilaveten, epidemiyolojik önemi olup olmadığı tartışılmakla beraber enfekte kan emmiş sivrisinek ve tahta kurusu gibi böcekler aracılığı ile de HBV

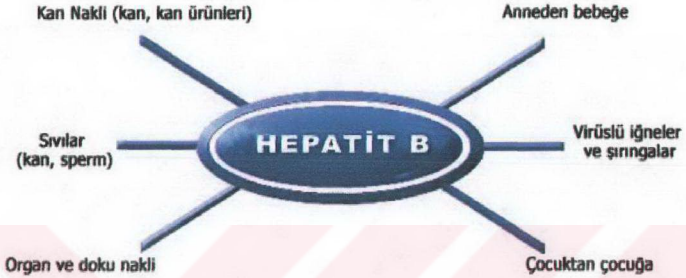
bulaşabilir. Perkütan HBV bulaşı tüm endemisite bölgelerinde görülür. Fakat perinatal ve horizontal bulaşın çok az olduğu düşük endemik bölgelerde daha önemli bir bulaş yoludur. Bu bölgelerde İV uyuşturucu bağımlıları, sağlık personeli, polis, çamaşırhane personeli ve infekte kanla sık temas eden kişiler en önemli risk gruplarını oluşturur (122).

Horizontal bulaşma paterni, Ortadoğu, Afrika ve Hindistan gibi orta yüksek endemisite bölgelerinde çocuklar ve genç yetişkinler arasında en önemli yayılma yoludur (25). Özellikle aynı evde yaşayanlar arasında geçiş önemli olup, HBV'nin zeka özürlü çocuk bakım evleri başta olmak üzere dersaneler, yatılı okul, kışla, hapisane, yurt, kreşler, anaokulu ve çocuk klüplerinde çocuklar arasında bulaşın olduğu gösterilmiştir. Kalabalık yaşam şartları, kötü hijyen ve sosyo-ekonomik durum HBV'nin bulaşma oranını arttırmaktadır (42). Horizontal bulaşma mekanizması tam olarak anlaşılamamakla beraber bu tip bulaşma yolunun kan, tükürük ve seröz sıvıların ciltteki lezyonlarla teması sonucu olduğu kabul edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde bu tip bulaş çok daha azdır.

Perinatal bulaşma paterni, taşıyıcı anneden çocuğa geçiş genellikle doğum sırasında veya doğumdan sonra HBV ile infekte maternal sıvılarla bebeğin temasıyla olur (114). Doğum sırasında bulaşma; cilt sıyrıkları, mukoza penetasyonu, vajinal kanaldan geçiş sırasında anne kanının yutulması, sezeryan sırasında anne kaniyle temas ve plasenta hasarı sonucu fetal ve maternal dolaşımın karışması gibi nedenlerle meydana gelir. İntrauterin bulaşma oranı (% 5-10) ise nadirdir (118). Perinatal bulaşma, yüksek oranda HBV taşıyıcılığına neden olduğundan çok önemlidir. Yeni doğan döneminde virüsün alınması, immun sistemin henüz olgunlaşmamış olması nedeniyle çoğunlukla kronikleşmeyle sonlanmaktadır (107,123). Anne sütünde HBsAg gösterilmiş olduğundan teorik olarak bulaştırıcı sayılmaktadır ama (7) riskli bebeklerde anne sütünün ilave bir risk oluşturmadığı tespit edilmiştir (118).

Seksüel bulaşma, HBV'nin başlıca yayılma yollarından biridir. Tüm endemisite bölgeleri için geçerli olmakla birlikte düşük endemisite bölgeleri için daha önemli bir bulaşma yoludur. Homoseksüeller arası cinsel temas HBV için en riskli seksüel bulaşma yoludur. Rektal mukoza mikrotravmalarına bağlı kan teması riski arttırmaktadır. Kandan daha az konsantrasyonlarda virüs bulunsa da, genital salgılar heteroseksüel temas sırasında da bulaşma neden olmaktadır. HBV enfeksiyonu riski partner sayısı

artmasına paralel olarak 3-11 kat, diğerk bir zührevi hastalık hikayesi varlığında da 2-3 kat artmaktadır (8).



Şekil 4.2 HBV'nin Bulaşma Yolları

<http://www.bhepatitis.com/Turkish/Html/soru.htm> sitesinden alınmıştır.

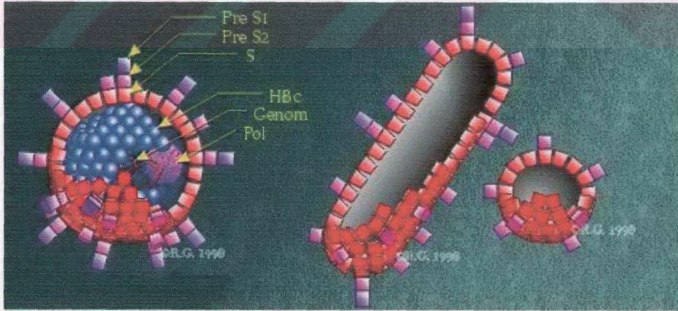
4.3. Türkiye’de Hepatit B’nin Epidemiyolojisi

Ülkemizde şimdiye kadar en çok araştırma yapılan konulardan biri hepatit B virüsü ile ilgilidir. Buna rağmen bu çalışmaların çoğu, kesin ve sağlıklı epidemiyolojik veriler elde edebilmek için yeterli değildir. Çalışmalarda kullanılan test yöntemlerinin farklı olması, sayılarının az ve özelliklerinin ortak olmaması çelişkili sonuçlar ortaya çıkarmaktadır (14,54). Gerçek prevalansı belirlemek için istatistiksel kurallara bağlı olarak ciddi ve büyük çaplı, iyi planlanmış, tek elden yönetilen çok merkezli çalışmalar yapılmalıdır. Yine de şimdiye kadar yapılan çalışmalar, orta derecede endemik bir bölgede olduğumuzu ve ülkemizde 4 milyona yakın taşıyıcı bulunduğunu göstermektedir (76).

4.4. HBV’ nin Yapısı

HBV, Hepadnaviridae ailesinde yer alan ve bulunduğu ailenin adından da anlaşılacağı üzere, hepatotropizmi bulunan bir DNA virüsüdür. Akut ve kronik hepatitli hastaların serumları, ultrasantrifüjasyonu takiben elektron mikroskopunda

incelendiğinde, üç farklı büyüklükte partiküle rastlanmaktadır. Bu partiküllerden biri, yaklaşık 42-47 nm çapında, infeksiyöz özellikte, tam bir virion yapısında, küresel Dane partikülleridir. Dane partiküllerinin 28 nm çapındaki kor bölgelerinin boş olması, Hepatit B virionunun replikatif olmadığını; dolu olması ise, virionunun replikatif olduğunun bir göstergesi sayılmaktadır. Diğeri yaklaşık 22 nm çapında (17- 25 nm-10mg/ml), içinde nükleik asit bulunmayan ve infeksiyöz olmayan küresel partiküllerdir. Üçüncüsü ise, özellikle viral replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan, yine ortalama 22 nm çapında, 50-500 nm uzunlukta nükleik asit içermeyen, infeksiyöz olmayan partiküllerdir. Küresel ve tübüler partiküller, infekte kişilerin serumlarında fazla miktarda saptanabilen (200-500 mg/ml) Hepatit B yüzey antijeni ile konak kökenli lipidlerden oluşmaktadır. Nükleik asit içermedikleri için infekte olmayan bu partiküllerin saf formları immunojeniktir. Non-efektif olan bu formlar daha fazla üretilir ve kanda dolaşan HBsAg'nin büyük bir kısmını bu küresel partiküller oluşturur. HBV'nin infeksiyöz formu olan Dane partikülünün dışında Hepatit B yüzey antijeni olarak saptanan ve viral yüzey glikoproteinini içeren lipoprotein yapısında bir zarf bulunmaktadır. İç kısmında ise zarfın non-iyonik deterjanla muamele edilmesiyle serbest hale geçen kor veya nükleokapsit partikülleri yer almaktadır. Kor partikülü, Hepatit B kor antijeni olarak saptanan kor proteininin yanı sıra viral DNA da içerir ve polimeraz aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir (Şekil 4.3) (77,120).



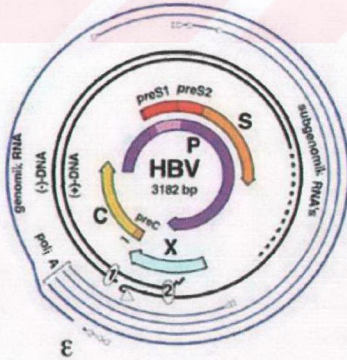
Şekil 4.3 HBV partikül tipleri: (a) HBV Dane partikülü (b) HBV filamentöz yapı
(c) HBV büyük küresel yapı

<http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV/hbvparts.htm> sitesinden alınmıştır.

4.5. HBV'nin Genomik Yapısı

Hepatit B virüsü çember şeklinde, kısmen çift iplikli ve 3200 nükleotid uzunlukta bir DNA genomuna sahiptir (128). İplikçiklerden biri tamamlanmamıştır ve HBV partikülleri bu çift iplikçik daha tamamlanmadan hücreden dışarı atıldıklarından, partiküllerde bulunan tamamlanmamış (+) iplikçik, belli bir 5' uca ve değişken bir 3' uca sahip olmaktadır. Kısa olan bu zincir, 1800- 2700 arasında değişen nükleotid içermektedir (103).

Daha uzun olan tamamlanmış zincirin (-), hem 5' ucu; hem de 3' ucu bellidir. Genomun üç iplikçik olduğu bir bölge de vardır ki, burada 9 bazlık terminal bir fazlalık bulunmaktadır. HBV DNA'nın çember şeklindeki yapısal bütünlüğü, her iki zincirin 5' uçlarından birbirlerine tutunmaları ile sağlanmaktadır. Bu iki zincirin de 5' uçlarında 11'er bazlık DR1 ve DR2 olarak adlandırılan sabit diziler bulunmaktadır (83). Negatif iplikçiğin 5' ucuna bir protein bağlıdır ve bağlanma sayesinde klasik DNA izolasyonu sırasında fenol fazına geçebilmektedir. Uzun zincirin 5' ucu 1826. nükleotitte DR1 içinde, kısa olanın 5' ucu ise 1592. nükleotitte DR2 içinde yer almaktadır (Şekil 4.4). Pozitif iplikçiğin 5' ucunda tıpkı mRNA'daki gibi 18 ribonükleotidlik bir şapka bulunmaktadır.



Şekil 4.4 HBV'nin şematik görünümü

<http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV/genome.htm> sitesinden alınmıştır.

4.6. Açık Okuma Çerçeveleri (AOÇ)

Hepadnaviral genomda S, C, X, P olmak üzere 4 tane açık okunma çerçevesi (AOÇ) tanımlanmıştır (Şekil 4.5). AOÇ S'in türünü 3 adet HBs proteinidir. AOÇ C, HBsAg ve HBcAg'yi kodlar. AOÇ X'in ise bugün birden çok proteini kodladığı bilinmektedir. Ancak bu proteinlerin tamamı hakkında hala kesin bir bilgi yoktur.

Kodlanmayan bölgeler (intronlar) HBV DNA'sında bulunmaz. Bu yüzden post-transkripsiyonel kırılma Hepadnavirüslerinde görülmez.

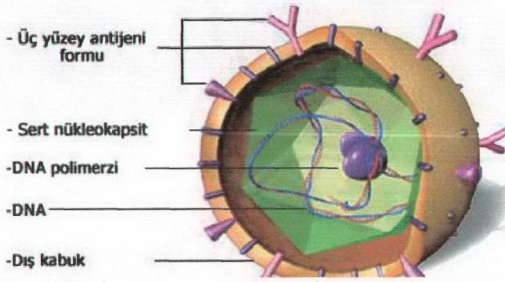
HBV genleri iç içe geçmiş durumda bulunduklarından aynı nükleotidlerin farklı proteinleri şifrelediği görülür. Genomun tüm uzunluğu en uzun AOÇ olan P'den biraz daha uzundur. AOÇ S, tamamen AOÇ P'nin içinde yer alır. AOÇ X ve AOÇ C kısmen AOÇ P ile üstüste gelmektedir. Bu kompakt organizasyon, virüsün genetik materyalini oldukça ekonomik bir şekilde kullanmasını sağlamaktadır. Böylece paketlenmiş genomda bazı bölgeler tek iplikli, çift iplikli hatta üç iplikli bile olabilmektedir. HBV genomundaki her baz çifti HBV proteinlerinden en az birini kodlamaya katılmış olur. Bir başka özellik de, kodlayıcı diziler içinde birden fazla başlangıç kodonu bulunmasıdır. Yüzey proteinlerini kodlayan S geninde üç, kor proteinlerini kodlayan C geninde ise iki başlangıç kodonu vardır. Böylece HBV DNA'daki dört genden yedi protein sentezlenmesi mümkün olmaktadır (122,146,147). Virüse ait genetik düzenleyiciler de, bahsedilen genetik elemanların üzerinde bulunmaktadır. Bu nedenlerle bir genetik bölgede meydana gelen mutasyonlar birden fazla AOÇ'de değişikliğe neden olurlar. Bir okuma alanı için avantaj teşkil edebilen bir mutasyon diğeri için ölümcül olabilir. Bu özellik nedeniyle aslında RNA virüsleri gibi yüksek oranda mutasyon sıklığına sahip olan HBV, doğal olarak çok az mutasyon geliştirir.

HBV DNA'sının negatif zincirindeki kodlayıcı dizilerden, konak hücre RNA pol II enzimi tarafından genomik ve subgenomik olmak üzere iki tür RNA kopyalanmaktadır. Viral genomdan daha büyük olan 3.5 kb'lık pregenomik RNA, hem DNA sentezinde kalıp olarak fonksiyon görür hem de preC/C ve P proteinlerini kodlayan bilgiyi taşır. Subgenomik RNA'lar ise yüzey ve X proteinlerini kodlar. Bu kopyaların hepsi aynı adenilasyon sinyalinin taşırlar. Kırılmamış olmalarına rağmen 5' uçları heterojendir. Ayrıca viral DNA'da transkripsiyon seviyesinde kontrolü gerçekleştiren, poliadenilasyon bölgesini belirleyen ve özgül kopyanın nükleokapsidin içine paketlenmesini sağlayan genetik elemanlar da bulunur (73). Viral genlerin

transkripsiyonu dört promotor (preS1, preS2, kor ve X) ve iki “enhancer” eleman (enh I ve enh II) tarafından kontrol edilir. Kor ve pregenomik RNA promotorları; kor, e, polimeraz ve pregenomik RNA transkriptlerinin düzenlenmesinde görevlidir (83). Bu kopyalar aynı zamanda hem her iki viral ““enhancer”” dizisi, hem de negatif düzenleyici eleman (NRE) tarafından kontrol edilir. “CCAAT/ “enhancer”” bağlama proteini (C/EBP), HNF-3, HNF-4, SP1 gibi hücrel faktörler de, bu bölgenin transkripsiyonunun pozitif regülasyonunda etki yaparlar. S AOC’nde ise preS1 ve preS2 promotorları sırası ile, 2.4 kb’lık ve 2.1 kb’lık RNA’nın transkripsiyonunu düzenlerler. Oct-1, HNF-1, HNF-3; preS1 promotorunu, C/EBP ve NF- γ ise preS2 promotorunu aktive eden yani bu bölgelerin pozitif regülasyonundan sorumlu transkripsiyon faktörleridir (74). X genini kodlayan bölgenin transkripsiyonunun düzenlenmesinde de, diğer bölgelerde de etkili olan HNF-3, HNF-4, EF-C, NF-1 transkripsiyon faktörleri ile, enh I ve enh II elemanları görev alır. Transkripsiyon faktörlerinin çoğu ve enhance diziler özellikle enh II sadece karaciğerde fonksiyoneldir ve bu da viral tropizmi açıklamaktadır. HBV’nin organ ve doku özgüllüğünü esas belirleyen karaciğerdeki transkripsiyon faktörleridir. HBV X proteini ile konak hücre genomuna integre olmuş viral DNA dizilerinden sentezlenen bir ucu kesilmiş M proteini de birçok transkripsiyon faktörünü aktive ederek genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (47).

HBV DNA’sının uzun ipliğinin 5’ ucunda polimeraz geni ürünü olan ve viral replikasyon sırasında primer olarak görev yapan terminal bir protein, kısa ipliğin 5’ ucunda aynı işlevi gören bir RNA oligomeri bulunmaktadır. Bunun yanı sıra viral genomda tüm Hepadnavirüslerde korunmuş olan ve “epsilon kök yapılanma (ϵ -stem loop)” olarak adlandırılan bir fazlalık (redundant) R bir bölge bulunur. Bu dizilerin virüsün kapsitlenmesinden ve ters transkriptazın bağlanmasından sorumlu olduğu belirlenmiştir.

Hepatit B virüsünün genomik düzeni bu aileyi diğer virüslerden ayırır. Paketlenmiş genomun alışılmadık yapısı nedeniyle virüsün replikasyonu, bilinen korunmuş DNA replikasyon modeli ile gerçekleşmez.



Şekil 4.5 HBV Genomu'nun şematik görünümü

<http://www.bhepatitis.com/Turkish/Html/soru.htm> sitesinden alınmıştır.

4.7. HBV' nin Replikasyonu

HBV'nin konak hücreye bağlanmasında rol oynadığı düşünülen fibronektin, transferrin reseptörü, apolipoprotein H, polimerize insan serum albumini, preS2 glikan, HBV bağlayan faktör gibi birçok reseptör adayı tanımlanmıştır (12,110). Son yıllarda S proteinine özgü bazı reseptörlerin (endonexin II, siyaloglikoprotein gibi) varlığı gösterilmiş olsa da, HBV'nin hepatositlere tutunmasında L ve M proteinlerinin de önemli olduğu saptanmıştır. preS1 ve preS2'de karaciğere spesifik tutunma bölgeleri *in vitro* çalışmalarla tanımlanmıştır (131,150).

PreS1 ürünü olan L protein, karaciğer membranına ve mononükleer hücrelere bağlanabilir. Mononükleer hücrelerde saptanmakla birlikte, HBV'nin bu hücrelerde aktif olarak replike olduğuna dair bir kanıt yoktur. L ve M proteinleri hepatoblastoma hücrelerine direkt olarak tutunabilmektedir (16). Hapadnavirüslerin replikasyonu ile ilgili bilgilerin çoğu hayvan modelleri üzerinde yürütülen çalışmalar sonucu elde edilmiş olup viral replikasyonda üç önemli özellik vardır (164):

1. DNA sarmallarının sentezi sırasında negatif iplikliğin sentezi pozitif iplikliğin sentezinden önce tamamlanmalıdır.
2. Viral polimeraz aynı zamanda ters transkriptaz olarak iş görür.

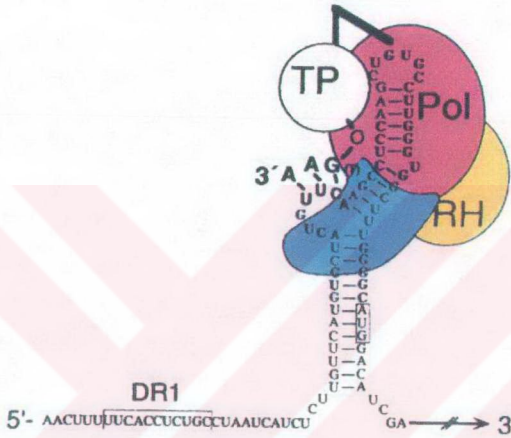
3. Negatif iplikliğin sentezinde 5' ucuna kovalent olarak bağlı terminal protein sentez edilirken, pozitif iplikliğin sentezi viral genomik RNA'dan türetilen bir oligoribonükleotittir.

Hepatosite bağlanan virüsün konak hücre çekirdeğine nasıl ulaştığı tam olarak aydınlatılamamıştır. HBV muhtemelen reseptöre bağlı endositoz yoluyla hücre içine girmekte, viral DNA ile nükleokapsit viriondan ayrılmakta ve işlenmeden konak hücre çekirdeğine taşınmaktadır. Kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA'nın kısa sarmalının eksik olan bölümü endojen DNA polimeraz tarafından tamamlanmaktadır. Bu sırada uzun sarmalın 5' ve 3' uçları arasındaki açıklık da onarılmış ve sonuçta tümüyle çift sarmallı, süper kıvrımlı, uçları kapalı, sirküler yapıda bir HBV DNA (cccDNA) meydana gelir. Replikasyonun normal seyri sırasında HBV DNA'nın konak genomuna integrasyonu görülmez. HBV ile infekte bazı kişilerin serumunda nadir olarak HBcAg'nin varlığı gösterilmiş olsa da, bu antijen viral replikasyon sırasında konak hücre çekirdeğinde sıklıkla tespit edilebilmektedir. Bu nedenle HBcAg'nin nükleusa girmesinin cccDNA'nın ortaya çıkmasından önce olduğu tahmin edilmektedir (12,164,169).

Hepatit B virüs replikasyonu RNA pregenomunun ters transkripsiyonunu içermesi açısından diğer virüslerin replikasyonuna benzemez. Birçok laboratuvarda yapılan çalışmalar sonucunda HBV'nin yaşam döngüsü için bir model oluşturulmuştur. (128,146,147,161). Bu modele göre, kalıp olarak cccDNA'dan konak hücre RNA polimerazın (RNA polimeraz II) yardımı ve viral düzenleyicilerin (4 adet promotor ve 2 adet "enhancer") etkisiyle viral RNA'lar sentezlenir. HBV RNA'ların hepsinin 3' uçları nükleotitte (1934. nükleotid)'tir. Bunlar C genine ait AOC'den gelen sinyalin özelliğine göre ya mRNA ya da pregenom görevi yaparlar.

Pregenomik RNA ayrıca viral DNA sentezinde kalıp olarak fonksiyon görür. Genomik RNA kalıbının paketlenmesi ve kapsit oluşumu (enkapsidasyon) viral DNA replikasyonunun başlangıç aşamasını oluşturur. Kapsit oluşumu ve paketlenme birbirinden bağımsız olarak gerçekleşir. Kor partiküllerinin yapılması için kor proteinine gereksinim vardır. RNA paketlenmesinde ise kor proteini yanında polimeraz proteini de gereklidir. Bu aşamada çekirdekte bulunan birçok RNA arasından doğru olanı, yani pregenomik RNA'yı seçmek önemlidir. Pregenomik RNA'nın uç kısımlarında bulunan epsilon dizileri doğru RNA'nın paketlenmesini sağlayan

paketlenme sinyali içerir. Epsilon dizileri pregenomik ve subgenomik RNA'ların uç kısımlarında bulunan fazlalık dizilerdir. Ancak, sadece pregenomik RNA'nın 5' ucunda bulunan ϵ dizisi paketlenmede fonksiyoneldir. Epsilon dizilerinin kök yapılanma olarak tanımlanan bölgesi polimeraz proteini tarafından tanınır. Oluşan p- ϵ kompleksi kor alt ünitesi ile organize olur (Şekil 4.6).



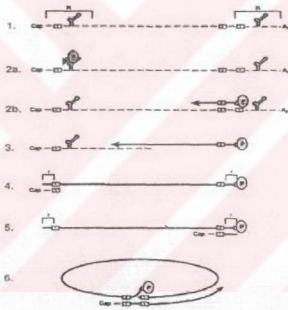
Şekil 4.6 HBV yaşam döngüsünde polimeraz proteini ile ϵ dizileri arasındaki ilişki

Pregenomik RNA'nın kor partikülleri ile enkapsidasyonu tamamlandıktan sonra viral polimeraz tarafından RNA'dan ters transkripsiyon ile negatif iplik sentezlenir. Primerin işlevini yerine getirmesi için gereken kalıp ϵ bölgesindeki dizilerdir (81).

DR1 ve ϵ dizileri pregenomik RNA kalıbı içerisinde uçlarda olmak üzere iki kere temsil edilir. Bu açıdan sentez süresince hangi kopyanın yer aldığı önem kazanır. ϵ dizilerinin 3' kopyası bu sürece katılmaz. Pregenomik RNA'da 5' DR1 ve 3' DR2 olarak adlandırılan bu diziler viral DNA'dan negatif ipliğin 5' ucunda DR1, pozitif ipliğin 5' ucunda ise DR2 olarak ifade edilir. Negatif iplikçiğin sentezi işlemi; DR1'in 3' ucundaki terminal proteinin bulunduğu yerden başlar. Sentez ilerledikçe RNA otomatik olarak RNaz H etkisiyle tahrip edilir. Kısa zincirin sentezinde kalıp olarak uzun sarmal kullanılır. Sentez DR2'nin 3' ucundan başlar ve uzun zincirin 5' ucundaki

terminal protein geçilinceye kadar devam eder. Bazı durumlarda RNaz tarafından kesilen primerler transloke olamaz. Replikasyon sonucunda tamamen çift iplikli lineer DNA molekülleri sentezlenir. Daha sonraki yaşam döngülerinde bu lineer diziler konak hücre genomuna integre olabilir.

Genomun sirkülasyonu (-) iplikçiğin 3' ucundaki 9-10 nükleotidlik terminal artık sayesinde olur. Kısım çift sarmallı sirküler yapıdaki kor kısmının kılıf proteinleri tarafından çevrelenmesi ve aynı zamanda polimerazın da tüketilmesi nedeniyle kısa zincirin sentezi tamamlanamaz ve bu sarmal eksik kalır. Pozitif ve negatif ipliklerin 3' uçlarındaki (r) dizileri benzer olduğunda uçlar yapışır ve genom sirküler forma dönüşür (Şekil 4.7). Pozitif ipliğin uzamasıyla gevşek, sirküler ve çift iplikli viral DNA oluşur (139,157).



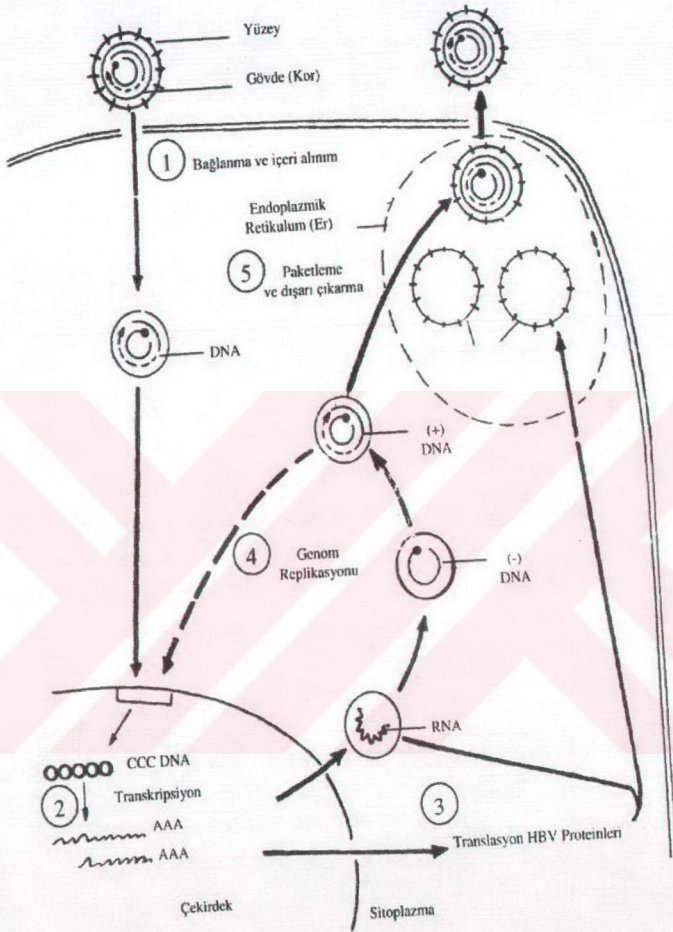
Şekil 4.7 HBV'nin negatif ve pozitif ipliğinin sentezlenmesi

Bu süreç pozitif DNA ipliğinin sentezi tamamlanmadan zarf yapısı kazanması ve Dane partikülü olarak dışarı salınması ile tamamlanır. Muhtemelen kor partiküllerindeki yapısal bir değişiklik veya transkripsiyon sonrası bir modifikasyon pozitif iplik sentezindeki bir eşik nokta ile ilgilidir. Bu takdirde eşik nokta, kor partiküllerinin zarfla çevrilmesinin işareti olabilir. Ayrıca hücreden salınacak olgun virion ile kor partiküllerinin bir kısmı çekirdeğe geri dönerek çekirdekteki kopya sayısını artırır. Geri kalan kor partikülleri ise endoplazmik retikulumda zarf proteinleri ile organize olduktan sonra tomurcuklanma ile dışarı salınır. Nükleusta cccDNA'nın sentezlenmesi ile

başlayan kor partiküllerinin oluşum süreci sitoplazmada viral gen ürünleri birikinceye kadar devam eder. Viral gen ürünleri birikince çekirdekte cccDNA sentezi durur, fakat kor partiküllerinin dışarı salınması devam eder. Dışarı salınan olgun virion uygun hücreyi infekte etmek üzere yeni enfeksiyon döngüsü başlatır (155).

HBs proteinleri, endoplazmik retikulumda öncelikle transmembran proteinleri olarak sentezlenir. Oligomerizasyon, molekül içi ve moleküller arası disülfid köprülerinin oluşmasıyla olgunlaşır, tomurcuklanma sırasında membran lipidleri ile birlikte kor partiküllerini çevreleyip hücre dışına çıkarlar. Transgenik farelerde ve hücre kültürleri üzerinde yürütülen çalışmalarda preS1'in hücre içinde birikmesinin HBsAg sekresyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Ancak preS1/HBsAg oranının HBsAg'nin dışarı atılımındaki rolü kesin olarak bilinmemektedir. HBsAg, cccDNA formasyonunu inhibe ettiğinden bunun HBV replikasyonunda negatif kontrol mekanizması olduğu kabul edilir (97).

Viral polimeraz enziminin integraz aktivitesi yoktur. Bu yüzden normal süreçte konağa integrasyon söz konusu değildir. Ancak birçok döngüden sonra (kronik enfeksiyon) viral genom konak hücre genomuna integre olabilir (Şekil 4.8). İntegrasyon sırasında ise viral ve konak hücre dizilerinde kanser gelişiminde önemli olabilecek yeni düzenlemeler gerçekleşebilir (153,154).



Şekil 4.8 HBV'nin replikasyon şeması

4.8. Viral DNA'nın RNA'ya Transkripsiyonu

Hücrel RNA Polimeraz II yardımıyla DNA'nın çift ipliklerinden biri RNA'ya transkribe olur. Enzimin tek bir DNA zincirinin belli bir bölgesini terminasyon sinyaline kadar transkribe etmesi, bazı pozitif faktörlerin enzime bağlanması ile mümkün olmaktadır. Transkripsiyon faktörlerinin enzime bağlanmasında rolü olan iki tane DNA dizi elemanı vardır ki bunlar, promotör ve "enhancer" dizileridir. Promotorlardan biri olan TATA kutusu, önce TFIID ile ardından da enzim ile birleşir ve bu bağlanma noktasının 30 baz ilerisinden transkripsiyon başlar. Diğer DNA dizileri olan "enhancer"ler ise, belli bir promotordan transkripsiyonun başlamasını hızlandırırlar; ancak promotör gibi yapısal bir genin başlangıcında değil de, genin herhangi bir yerine yerleşmişlerdir ve eksprese olacak gen ile aynı iplikte bulunduklarından promotörler gibi, *cis*-etkiyen (*cis*-acting) elemanlardır.

"Footprinting" çalışmaları HBV'nin 4 adet promotörü ile 2 adet "enhancer" dizisi olduğunu göstermiştir (74). Bu promotörler, HBc/e, LHBs, M/SHBs ve HBx geninin başlangıcında bulunurlar. Bunlardan sadece LHBs promotörü tipik bir TATA kutusuna sahiptir ve sadece LHBs proteinini kodlayan mRNA'nın belirgin bir 5'ucu vardır. TATA kutusunun bulunmadığı diğer promotörlerde ise, birden fazla başlama noktası bulunur. Bu nedenle de X genine ve HBc, HBe, SHBs, MHBs'ye ait mRNA'lar 5' uçları farklı olan fakat 3' uçları aynı olan proteinleri kodlarlar.

HBV RNA'nın transkripsiyonunun *enh I* olmadan son derece düşük olduğu saptanmıştır. Bu elemanın karaciğer hücrelerinde transkripsiyonun başlamasını 10-50 kat, karaciğer dışı hücrelerde ise daha düşük oranlarda arttırdığı bilinmektedir. *Enh II*'nin etkisi ise karaciğere özgüdür (145).

Hangi sırayla HBV genlerinin transkribe oldukları tam olarak bilinmemekle birlikte, ilk ortaya çıkan proteinin HBx proteinini olduğu ve bunun da "enhancer" dizilerini aktive ettiği ve hücrel transkripsiyon faktörlerine bağlanarak transkripsiyonu hızlandığı bilinmektedir. HBx proteinini, diasilgliserol oluşumunu aktive etmekte, bu da, transkripsiyon faktörü AP1'i fosforilleyecek olan Protein Kinaz C'yi harekete geçirmektedir. Fosforillenmiş AP1 ise, HBV "enhancer"lerini ve *c-myc*, *c-fos* gibi hücrel proto-onkogenlerin promotörlerini aktive etmektedir (156).

Birbirleri ile üstüste gelen (overlap eden) genlere sahip olan kompakt bir genomdan, farklı translasyon ürünlerinin elde edilebilmesi, sadece HBV ye özgüdür ve

bu işlem, çok promotörlü, tek ortak sinyalli, son derece akıllı bir strateji sayesinde gerçekleşmektedir.

Transkripsiyonu takiben, RNA'lar, 3' uca metillenmiş bazların eklenmesi 5' uca Poli A kuyruğunun takılması suretiyle değişime uğramaktadırlar. Potansiyel kesim noktaları bulunmakla birlikte, HBV genlerinin peşpeşe olması ve genler arası intronların bulunmaması nedeni ile, olgun HBV mRNA'ların oluşumunda kırılmanın (splicing'in) yeri yoktur. Ancak, PHCC örneklerinde kesime uğramış HBV mRNA'lara rastlanılmaktadır ve ortaya çıkan bu füzyon genlerin ürünleri olan füzyon proteinlerin, hepatokarsinogenezde rol alabileceği de düşünülmektedir (62).

4.9. Hepatit B Virüsü Proteinleri

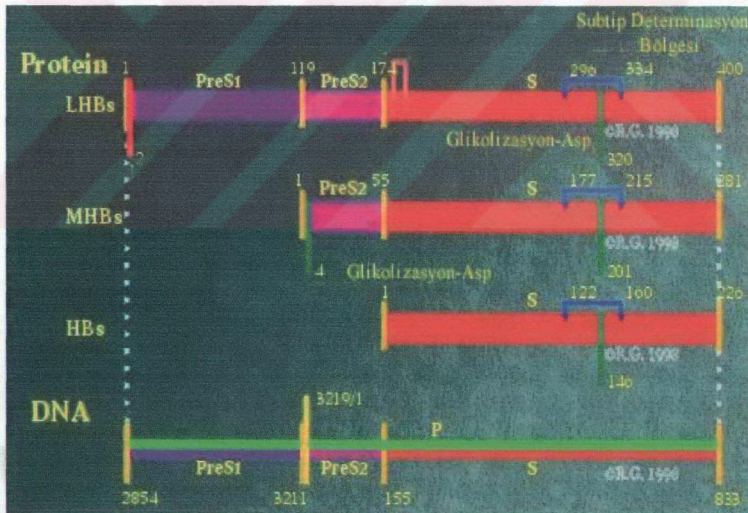
4.9.1. Yüzey (S) Geni Ürünleri:

HBV-S geni tarafından kodlanan kılıf (yüzey) proteinleri, hem Dane partiküllerinin yüzeyinde hem de infekte hastaların karaciğer ve serumlarında saptanan küresel ve tübüler partiküllerin yapısında bulunmaktadır. Bu gen ürünü glikolize ve non-glikolize altı farklı polipeptidin değişik oranlarda bir araya gelmesiyle oluşur (135). Yüzey (S) geni, 3 başlangıç kodonu taşıdığından preS1, preS2 ve S olmak üzere üç farklı açık okuma çerçevesi içerir (Şekil 4.9). S açık okuma çerçevesi diğerlerinden bağımsız olarak eksprese edilir ve küçük yüzey proteini kodlanmış olur (51,52). SHBs, üç tip HBV partiküllerinin arasında en fazla bulunan polipeptittir. LHBs'lerin diğerlerine oranı, HBs partiküllerinin morfolojisini belirlemektedir. HBs partikülleri endoplazmik retikulum (ER) zarlarında sentezlenip bir araya getirilmekte (121) ve daha sonra vesiküller halinde ER'dan atılmalarıdır. Buradaki sentez aşamasında LHBs'lerin SHBs'lere göre daha fazla yapılması filamentöz partiküllerin oluşmasına yol açmaktadır. Filamentöz partiküller ise küresel partiküller kadar kolayca dışarı atılamazlar. ER'da birikmeye başlarlar ve böylece ışık mikroskopunda hepatositler HBV enfeksiyonu için buzlu cam görünümü elde ederler (94).

SHBs dizisi, AOC'nin üçüncü AUG kodonundan başlar ve AOC'nin stop kodonuna kadar devam eder. SHBs'ler hidrofobik aminoasitlerden ve sisteinden son derece zengindir (83). Majör protein olarak adlandırılan SHBs, S bölgesinin kodladığı 226 aminoasitten meydana gelmektedir. 96.-168. aminoasitleri arasındaki bölge, B lenfositleri için epitopik bölge olup HB yüzey antijenini oluşturmaktadır. 24 kD.luk bu protein bazı durumlarda glikozillenmiş olarak da bulunur (15, 122).

MHBs; SHBs'yi kodlayan S bölgesine ek olarak 55 aminoasitlik Pre-S2 bölgesinden meydana gelen (140) toplam 281 aminoasitlik bir proteindir. Pre-S2 bölgesi, S bölgesinden daha fazla immunojeniktir (102). Bu özelliği bakımından sentetik olarak elde edilerek aşı olarak da kullanılır. Pre-S2'nin orta kısmı, serum albuminine bağlanma özelliğine sahiptir. Bu bölgenin virüsün hepatosite bağlanmasında etkin olduğu sanılmaktadır (157).

LHBs; HBs proteinlerinin en büyüğüdür. Pre-S1, Pre-S2 ve S tarafından kodlanmaktadır. LHBs proteini, MHBs proteininden 108-128 aminoasit daha uzundur ve glikolize olup olmamasına göre adlandırılmaktadır. LHBs'yi kodlayan bölgelerden biri olan Pre-S1 bölgesi HBV genomunun en değişken bölgesidir (41, 98) ve hepatosit yüzeyindeki IgA reseptörleri aracılığı ile virüs-konak ilişkisini kurmada görevlidir. LHBs'nin ayrıca hepatosellüler karsinomunun oluşumunda da etkin olduğu düşünülmektedir (52).



Şekil 4.9 HBs geni ve proteinleri

<http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV/hbsags.htm> sitesinden alınmıştır.

4.9.2. Kor Geni Ürünleri:

Hepatit B virüs genomu C geninde AOÇ bulunmasına rağmen, gen üzerinde okuma işleminin başladığı iki farklı kodon (nt 1816 ve nt 1903) yer almaktadır. Bu nedenle preC ve C olmak üzere iki bölgeye ayrılan C geni, antijenik özellikleri farklı iki değişik protein (HBeAg ve HBcAg) sentezleme yeteneğine sahiptir (Şekil 4.10). Nükleotid 1816 ve 1903 arasında yer alan preC bölgesi 29 aminoasitlik bir peptidin üretiminden sorumludur. Nükleotid 1903 ile 2452 arasında yer alan C bölgesi ise, 183 aminoasitten meydana gelen bir polipeptid sentezler.

Her iki bölgeye ait stop kodon aynı nükleotitte (nt 2452) bulunur. Bu yüzden protein sentezi sırasında okuma işlemi hangi başlangıç kodonundan başlarsa başlasın aynı ortak noktada sonlanır. PreC'den başlayan okuma işleminde her iki bölge de okunarak 212 (29+183) aminoasitten oluşan 25kD molekül ağırlığında bir polipeptid sentezlenir. Bu protein NH₂ ucundaki sinyal peptidi aracılığı ile endoplazmik retikulumla transloke olur (109). NH₂ ve COOH uçları kesildikten sonra Hepatit B e antijeni (HBeAg) olarak salınır. Serumda HBeAg'nin varlığı infekte hastalar için iyi bir serolojik gösterge iken, prekor proteininin viral yaşam döngüsündeki rolü halen bilinmediğinden viral replikasyon için gerekli olmadığı düşünülmektedir (131). Her iki gen ürünü de pregenomik 3.5kb'lık mRNA'dan kodlanan yapısal proteinlerdir (32,169).

4.9.2.a. HBc Proteinini

HBc proteini enfekte hücrenin sitoplazmasında sentezlenmektedir. Virüsün yaşam döngüsünde viral polimerazın hücresel bir protein olan kinazın kor partikülleri içinde paketlenmesiyle ilgili önemli bir rolü vardır. HBcAg, 22kD. ağırlığındadır (165). Yüksek titrelerde anti-HBc sentezine yol açmakta olup immunojenik özelliği yüksek bir polipeptittir (30,31). Kor partiküllerini oluşturma özelliği HBc proteinlerinin ilk 147 aminoasitine özgüdür (56,58).

4.9.2.b. HBe Proteinini

AOÇ C'nin ilk AUG kodonunda translasyon başlarsa ve daha sonra da kor bölgesini de içine alacak şekilde devam ederse, ortaya HBe'nin perkürsörü P25 çıkacaktır (129,168).

Protein

PreC 20 214

e

Sinyal Dizisi

HBc

DNA

2214 1901

IX

DR1 E

Poli A Sinyali

ORF. 1998

Postforile Sinyal

170 172 185

ORF. 1998

Nükleik Asit

Bağlanma Bölgesi

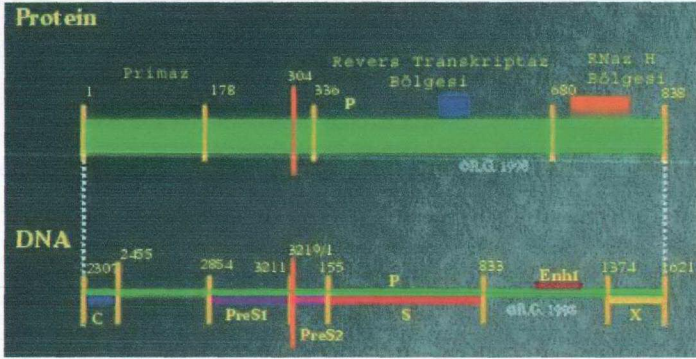
2435

P

ORF. 1998

4.9.3. Polimeraz Geni Ürünleri:

P proteininin immunojen özelliği olup hasta serumunda bulunan anti-DNA polimeraz antikorları sentetik peptid antijenleri ile gösterilebilmektedir (20).



Şekil 4.11 HBV polimeraz geni ve proteini

<http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV/hbvpoly.htm> sitesinden alınmıştır.

4.9.4. X Geni Ürünü:

X geni HBV genomunda 1376 ile 1838. nükleotidler arasında yer alan en küçük gen bölgesidir (Şekil 4.12). X genini ürünü 154 aminoasitlik bir protein olup hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. *In vitro* mutagenез çalışmaları fonksiyonel bir X geni bulunmayan virüsün *in vivo* olarak enfeksiyona yol açmadığını göstermiştir (59). Bu da X gen ürününün viral replikasyonda etkin olduğunun göstergesidir (30,50). HBX proteininin aminoasit dizilimi, bu proteinin belirgin bir intrasellüler transport sinyaline sahip olmadığını işaretler. HBX sitozolik bir proteindir (49). Ancak; açıklanamamakla beraber HBV taşıyıcılarının serumunda da X proteinine rastlanmıştır. Kor partiküllerinin içinde bulunabileceği ve replikasyonda da görev alabildiği sanılmaktadır (55,36).

HB X proteininin, *in vivo* fonksiyonu hala net değildir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, mekanizması henüz bilinmemekle birlikte, bir çok genin transkripsiyonunu aktive ettiği saptanmıştır (62,64,74). Üç tane AUG kodonu genotipler arası korunmuştur. Transaktive edilen genler arasında; HBV "enhancer"lar, HBV X ve kor promotorları sayılabilir. Ayrıca; *c-myc* ve *c-fos* da transaktive edilen genler arasındadır (45,80).

HBxAg kronik taşıyıcıların hepatositlerinin sadece sitoplazmalarında bulunmuştur. Sitoplazmik HBxAg'nin protein kinaz C tarafından düzenlenen sinyal iletimini aksattığı düşünülmektedir (143). Sirozlu hastaların çoğunda da HBxAg hepatosit çekirdeklerinde

bulunmuştur. Bu lokalizasyon HBX'in transkripsiyonel olarak transaktivatör görevi olduğuna işaretir (86,92).

Transgenik çalışmalarda ve fare karaciğer hücre kültürü çalışmalarında HBX proteinin önemli bir yan etkisi de tümörjenik aktivitesidir (117,130,135). Karaciğer hücrelerinin çekirdeklerinde bulunarak transkripsiyon faktörlerine veya hücrel onkogenlere bağlanarak transforme fenotipe yol açtıkları düşünülmektedir. Öncelikle hücrel gen ekspresyonunu aktive ettikten sonra bir tümör baskılayıcı gene bağlanarak bu genin ürününde mutasyona yol açmadığı ve böylelikle hepatosellüler karsinomaya neden olduğu da düşünülmektedir (160).

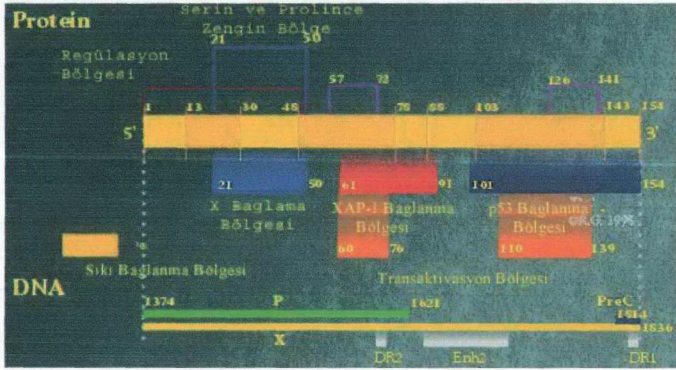
HB X gen ürününün hepatosellüler karsinomaya neden olduğuna ilişkin bir başka görüş de HB X geninin HBV genomunun 3' ucunda yer alması ile ilgilidir. Bu bölge aynı zamanda da onkogenik retrovirüslerde transforme edici genin bulunduğu pozisyona eşittir (140,153).

HBV DNA'nın kromatinine entegrasyonu esnasında X geninin 3' ucunun çoğunlukla delesyona uğradığı saptanmıştır. Bu mutant X geninin de, yabani tip X genine oranla daha yüksek oranlarda transaktivasyon fonksiyonu bulunduğu gösterilmiştir (65,156).

Ayrıca; HBxAg'nin divalent katyonlarla dimer oluşturabilme yeteneğinin de bulunması hepatokarsinoma oluşumunda önemli bir rolü olduğunun göstergesi sayılmaktadır.

HBxAg'nin, p53 ile birleşerek sitoplazmada birikme eğilimi içinde olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda HBxAg, tümör baskılayıcı gen ürünleri ile heterodimer oluşturdıkları saptamıştır. Böylece, hücrel büyüme ve gelişmeyi etkileyebileceği gibi hiperfosforillenme yolu ile de p53'ü inaktive edebildiği bilinmektedir (22,160).

HBx proteininin (veya proteinlerinin) translasyonu, AOC X'in başlama kodonuna sahip olan veya olmayan mRNA'lardan olmaktadır (99). Bu proteinlerin doğal uzunlukları henüz bilinmemekle birlikte, sitozolik bir fosfoprotein olduğu, çekirdekte sadece siroz ve PHCC gibi durumlarda bulunduğu, yarılanma ömrünün 20 dakika gibi kısa olduğu ve hızla oligomerize olduğu veya başka proteinlere bağlandığı bilinmektedir (34,104)



Şekil 4.12 HBV X geni ve proteini

<http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV/hbvX.htm> sitesinden alınmıştır.

4.10. HBV Genotipleri

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda, HBV genomları arasında farklılıklar olduğu saptanmış ve birbirlerine benzerlik oranı % 92 ve daha fazla olan HBV suşları aynı grupta toplanarak 8 farklı genotip belirlenmiştir (100,112). Bu genotipler ile HBsAg subtipleri arasındaki ilişkilerin saptanması amacıyla pregenom S dizileri ile S geni dizileri karşılaştırılmış, S geni düzeyinde genotip farklılık sınırı % 4 olarak tespit edilmiştir. Buna göre de genotip-subtip dağılımı yapılmıştır (38,39,116).

HBV taşıyıcılık oranları dünyanın değişik bölgelerinde önemli farklılıklar gösterir (87,88). HBV prevalansının düşük olduğu Kuzeybatı Avrupa ve ABD'deki persistan taşıyıcılar arasında genotip A baskındır. Amazon bölgesi ve Peru gibi HBV taşıyıcılığının yüksek olduğu ülkelerde ise genotip F olarak belirlenmiştir (149). HBV bulaşında vertikal geçişin ilk sırada olduğu Doğu Asya ülkelerinde genotip B ve C'nin prevalansı yüksektir. Bu durum kısmen vertikal geçişten sorumlu olan HBeAg pozitif dönemin daha uzun oluşu ile açıklanır. Genotip A ve D'nin dominant olduğu Akdeniz, Sahra altı Afrika ülkelerinde horizontal geçiş önemlidir. Genotip G Fransa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde görülmüştür. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla özellikle Meksika'nın da içinde bulunduğu Latin Amerika ülkelerinde yeni bir genotip daha tespit edilmiştir. H olarak adlandırılan bu genotipin F'ye benzediği belirlenmiştir (134).

Farklı HBV genotiplerinin dünya üzerinde coğrafi bölgelere göre değişik dağılım gösterdikleri, klinik seyri etkileyebildikleri ve tedaviye alınan yanıtsızlıktan sorumlu olabildikleri bilinmektedir (Tablo 4.1 (141,167)).

Tablo 4.1 HBV Genotip ve Subtiplerinin Coğrafi Dağılımı

<u>Genotip</u>	<u>Subtip</u>	<u>En Sık Görüldüğü Ülke</u>
A	adw ₂ adw ₁	Kuzey Batı Avrupa Sahra altı Afrika
B	adw ₂ adw ₁	Endonezya, Çin Vietnam
C	adw ₂ adrq ⁺ adrq ⁻ ayr	Doğu Asya, Japonya, Kore, Çin, Fransız Polinezyası, Vietnam
D	ayw ₂ ayw ₃	Akdeniz Bölgesi, Hindistan, Pakistan, Yakın Doğu
E	ayw ₄	Batı ve Sahra altı Afrika
F	ayw ₄ q ⁻	Orta Amerika, Şili, Arjantin, Peru, Amazon Bölgesi
G		Fransa ve Amerika Birleşik Devletleri
H		Latin Amerika

4.11. HBV Mutantları

HBV genomik yapısı çok özel olup bahsedilen bu genetik elemanlar arasında büyük oranda üst üste binmeler (overlap) vardır. Ancak okuma alanları birbirinden farklı olduğu için farklı amino asit dizilerinin sentezini sağlarlar. Virüse ait genetik düzenleyiciler de bahsedilen genetik elemanların üzerinde bulunmaktadır (1). Bu nedenlerle bir genetik elemanda meydana gelen mutasyon birden fazla bölgede

değişikliğe neden olur. Bir okuma alanı için avantaj teşkil edebilen bir mutasyon diğeri için ölümcül olabilir. Bu özellik nedeniyle aslında diğeri RNA virüsleri gibi yüksek oranda mutasyon sıklığına sahip olan HBV, doğal olarak çok az mutasyon geliştirir (4).

Mutasyonların doğal olarak bulunmaları meydana gelme hızlarına ve virüse sağladığı avantaja bağlıdır. HBV ters transkriptaz'ı da diğeri virüslerde olduğu gibi kontrol fonksiyonuna sahip değildir. Yani replikasyon sırasında yanlış giren nükleotidlerin düzeltilmesi mümkün olmamaktadır. Bunun için yüksek oranda mutasyon gelişme ihtimali vardır. Ancak yukarıda söz edilen nedenden dolayı ancak yılda baz başına 2×10^{-4} değişiklik söz konusu olmaktadır. Bu oran retrovirüslerden 10-100 misli daha azdır (24).

Mutasyonlar başlıca 3 tür olabilir:

1. Nokta mutasyonları: Bir nükleotidin yerine diğeri bir nükleotid geçmektedir.
 - a) Tranzisyon: Bir pürin yerine diğeri pürinin veya pirimidin yerine diğeri bir pirimidinin geçtiği en sık rastlanan mutasyonlardır.
 - b) Transversiyon: Pürinin pirimidin ile değiştiği veya tersinin görüldüğü nokta mutasyonlarıdır.
2. Yeniden düzenlenme mutasyonları (rearrangements): Büyük bölgelerde, insersiyon veya delesyon şeklinde olan mutasyonlardır. Translokasyonlar ve inversiyon'lar da bu grupta incelenir.
3. Çerçeve Kayması (Frameshift) mutasyonlar: Tek bir nükleotidin insersiyon veya delesyonu ile okuma alanında değişiklik meydana gelmesidir.

4.11.1. Prekor-kor bölgesi mutasyonları:

HBV'nun ilk tespit edilen ve üzerinde en çok durulan mutasyonları bu bölgede yerleşen mutasyonlardır.

Kronik B hepatitinin aktif dönemlerinde virüs replikasyonunun devam ettiği bilinmektedir. Serumda HBV-DNA'sının tespiti ve HBeAg varlığı HBV'nun replike olduğunu gösteren parametrelerdir (10,58). Bu nedenle kronik aktif karaciğeri hastalığı olan HBV enfeksiyonlarında HBV-DNA ve HBeAg pozitif olarak saptanır. Bazı karaciğeri hastalarında, karaciğeri aktif nekroinflamatuvar süreç ve serumda HBV-DNA pozitifliğine rağmen HBeAg'nin negatif olduğu saptanmıştır. Bu hastaların serumlarından izole edilen HBV-DNA'sının incelenmesinde HBeAg'nin kodlandığı

prekor bölgesinde 28. kodonda TGG kodonunun TAG dönüşümü gösterdiği yani triptofan kodonu yerine stop kodon meydana geldiği tespit edilmiştir (46).

Kor geninin bir stop kodonu olduğu halde iki başlatma kodonu vardır. Translasyon ikinci başlatma kodonundan başladığında ortaya çıkan polipeptid, kor proteini denilen ve nükleokapsidi oluşturan proteindir. Eğer translasyon birinci başlama kodonundan başlarsa meydana gelen polipeptid hücre içinde bazı süreçlerden geçip karboksil ve amino bölgelerinden kırılmalar göstererek sonuçta HBeAg'ini oluşturur. Prekor bölgesindeki 28. kodon ikinci başlama kodonundan iki önceki kodon olduğu için HBeAg translasyonu durdurulduğu halde virüsün en önemli yapısal proteinlerinden olan kor proteini (HBcAg) sentezi eksiksiz gerçekleşir (19).

HBeAg sentezi olmadığı halde virüs canlılığını, patojenitesini ve büyük ihtimalle infektivitesini kaybetmemektedir. Büyük ihtimalle virüse karşı oluşan immün toleransta, dolayısıyla enfeksiyonun devamlılığında HBeAg'nin rolü olduğu düşünülmektedir. Prekor stop kodon mutasyonu ilk önce ağır karaciğer hastalığı olanlarda ve fulminan hepatitli hastalarda tespit edildiği için araştırmacılar fulminan B hepatitinin etken ve etyolojisini bulduklarını düşünmüşlerdir (119). HBeAg immün tolerojen olarak düşünüldüğü için, bu proteinin kaybının agresif bir immün saldırıya ve dolayısıyla fulminan veya ağır seyirli bir karaciğer hastalığına neden olduğu iddia edilmiştir. Ancak hemen arkasından yapılan geniş araştırmalar stop kodon mutantının asemptomatik taşıyıcılarda da tespit edildiğini göstermiştir (111). Amerika Birleşik Devletleri'nden yapılan yayınlarda fulminan B hepatitli hastalarda prekor stop kodon mutantlarının seyrek olarak bulunduğu bildirilmiştir (43,79, 85).

Bu durumda hastalığın klinik görünümü ile prekor mutantının ilişkili olduğu görüşü tehlikeye girmiştir. "Prekor stop kodon mutasyonu ağır klinik tablonun sebebi değil sonucudur." görüşü ağırlık kazanmıştır. Hatta mutantlarla infekte hastalarda akut alevlenmeler geliştiğinde, yükselen HBV-DNA titresinden çoğunlukla yabani tip "wild type" sorumlu tutulmuştur (72, 91). HBeAg hepatositlerin yüzeyinde sitotoksik T hücrelerinin cevap geliştirdiği en önemli antijenik yapılardandır. Bu antijenin olmaması virüsün immün sistemden kaçmasına ve enfeksiyonun devamlılığına neden olmaktadır. "wild tip" virüse karşı gelişen immün saldırı, "wild tipin" temizlenip HBeAg(=) süşun (prekor stop kodon mutantının) seçilmesini sağlamaktadır (44). Bunlara rağmen, bugün için henüz hastalığın kliniği ile HBeAg(=) mutantların ilişkisi tam olarak

anlaşılamamıştır. Muhtemelen HBeAg'inin immün hedef antijen olma özelliği ile immün tolerojen olma özelliği arasındaki denge hastalığın aktivitesini belirlemektedir. Hastalığın erken evrelerinde tamamen HBeAg(+) suşların varlığında immün toleranstan dolayı genellikle hastalık aktivitesi az ve transaminaz düzeyleri düşük olmaktadır. Halbuki "wild tipin" temizlendiği ve HBeAg(-) mutantların hakim olduğu dönemde HBeAg(+) virüslerdeki replikasyon artışları dönemlerinde, zeminde immün tolerojen bu maddenin bulunmaması, fakat HBeAg'inin hepatositlerin yüzeyinde eksprese olması yeni bir immün saldırıya, dolayısı ile alevlenmelere neden olmaktadır. Bu saldırının arkasından HBeAg(-) virüsler var olmaya devam etmektedirler. Tamamiyle HBeAg(-) virüslerin tüm popülasyona hakim olduğunda yine hastalık genellikle inaktif veya hafif transaminaz yüksekliği ile seyretmeye devam etmektedir (23).

Mutantların hastalığın tedavi cevabıyla ilişkisi de çeşitli araştırmalara konu olmuştur. İlk araştırmalar mutantların interferona cevabının daha kötü olduğunu göstermiştir (68). Ancak sonraki araştırmaların vardığı ortak sonuç, tedavi sonu cevap açısından mutantlarla "wild tip" infeksiyonları arasında fark olmadığı yönündedir (1). Fakat mutant virüs infeksiyonlarında nüks oranı çok daha yüksek bulunmaktadır (9). Kronik B hepatiti seyri esnasında görülen kriyoglobulinemi gibi ekstrahepatik belirtiler, örneğin, ile prekor mutantları arasında ilişki olduğu da bildirilmiştir (89, 96).

İlk tespit edildikleri zamandan itibaren, prekor stop kodon mutasyonlarının Akdeniz çevresi ülkelerde ve Uzak Doğu'da daha fazla rastlandıkları dikkati çekmiştir. Bunun nedeni HBV'nun genotiplerinin farklı coğrafi dağılımıdır. Prekor stop kodon mutasyonu ancak virüs genomunun 1858. nükleotidinde timin bulunan genotiplerde (genotip C ve D) meydana gelebilmektedir. Halbuki aynı numaralı nükleotitte sitozin bulunduran genotip A'da C1858T mutasyonu olmadıkça hiçbir zaman stop kodon mutasyonu meydana gelmemektedir (84, 132). Bunun nedeni prekor bölgesinde yerleşen ve regülatör bir bölge olan epsilon enkapsidasyon sinyal dizisinin sekonder yapısıdır. Epsilon enkapsidasyon sinyal dizisinin sekonder yapısı çeşitli baz eşleşmeleri ile stabil hale gelmektedir. Bu sekonder yapıda 1858 ve 1896 numaralı nükleotidler karşılıklı gelmektedirler. Genotip A'da eğer stop kodon mutasyonu meydana gelirse C1858 ile G1896 arasındaki mevcut baz eşleşmesinin kırılması gerekmektedir. Bu da sekonder yapının stabilitesini bozar ve virüs için avantaj kaybına neden olur. Halbuki 1858. nükleotitte T bulunduran genotip C ve D'de G1896A mutasyonu iki nükleotid

arasındaki baz eşleşmesini sağlayıp yapıyı daha stabil hale getirmektedir (17, 90) ve belki de virüsün replikasyon yeteneği artmaktadır. Moleküler yapıdaki bu özellik dünyanın bazı bölgelerinde stop kodon mutantlarının daha sık görülmesini açıklamaktadır. Ülkemizde kronik B hepatitli replikatif hastaların %60-70'inde HBeAg negatiftir, yani büyük oranda mutant virüs infeksiyonu vardır (76). İsveç'ten yapılan bir çalışmada HBeAg(=) olduğu halde stop kodon mutasyonu bulundurmayan virüslerle olan infeksiyonların, stop kodon mutasyonu bulunduranlardan daha ağır seyrettiği iddia edilmiştir (88).

Sonuç olarak HBeAg(-) prekor mutantlarının klinik açıdan asemptomatik taşıyıcılıktan fulminan hepatite kadar farklı klinik tablolarda infeksiyonlarla birlikte olduğu görülmektedir. Siroza ilerleme ve kanser gelişimi açısından da HBeAg(-) ve HBeAg(+) infeksiyonlar arasında fark görünmemektedir.

4.11.2. Prekor bölgesindeki diğer mutasyonlar:

Prekor bölgesinde 1896. nükleotitteki G→A değişimi dışında da bazı mutasyonlar rapor edilmiştir. Bunlardan en sık rastlanana 1899. nükleotitteki G→A değişimi olup bu mutasyon sıklıkla 1896 mutasyonu ile birlikte görülmektedir. İki mutasyonun bir arada bulunmasının hastalığın kliniğini ağırlaştırdığı iddia edilmiştir (148, 151).

4.12.3. Kor bölgesi mutasyonları:

Kor geni, 183. kodondan sentezlenmeye başlayıp, HBcAg'nin sentezinden sorumlu bölgedir. İmmün sistem için en önemli hedef antijenlerden biridir. Bu nedenle hastalığın aktivitesi ve tedavi cevabında bu antijene ait değişikliklerin önemli olabileceği belirtilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda kor geninde mutasyon sayısı fazla olanlarda tedavi cevabı daha kötü bulunmuştur (106, 126). Sonraki daha geniş kapsamlı çalışmalar bu mutasyonların hastalığın prognozu veya tedavi cevabıyla ilişkisinin olmadığını ortaya koymuştur (137). Kor geni mutasyonları HBeAg serokonversiyonu döneminde ve sonrasında daha fazla tespit edilmektedir (3, 18). Kor geninde delesyona sahip olan virüsler defektif virüsler olup mutlaka “wild tip”in varlığına ve yardımına ihtiyaç gösterirler (2). Genellikle HBeAg/AntiHBe serokonversiyonundan sonra ortamdan uzaklaştırıldıkları görülmüştür. Delesyona sahip mutantların tedavi cevabıyla da ilişkisi bulunmamıştır (93).

Kor geninde belirgin ve hep aynı özellikte tanımlanmış bir mutasyon yoktur. Daha çok hastalığın seyri ilerledikçe ve alevlenmeler geliştikçe sayıca artan mutasyonlardan bahsedilmektedir. Mutasyonların B hücresi, CD4(+) T hücreleri ve sitotoksik T hücrelerinin tanıdığı epitoplarda yoğunlaşmaları bu mutasyonların immün sistemin tanımasından kaçmayı sağladığı (escape mutants) ve bu nedenle immün ataklar sonrasında seçildiklerini düşündürmektedir.

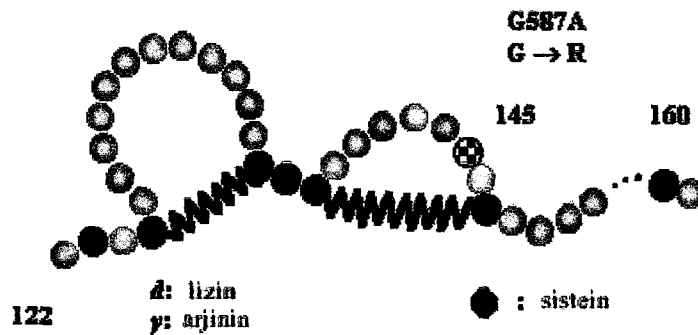
4.11.4. Yüzey (S) geni mutasyonları:

Zarf proteinleri hümoral ve hücrel immün cevap için hedef teşkil eden antijenler içerirler. Anti-HBs cevabın nötralizan bir aktiviteye sahip olması nedeni ile zarf proteinleri HBV profilaksisinde kullanılırlar (28).

Bazı zarf mutantları yüzyıllar boyunca HLA baskısıyla seçilerek HBV'nun farklı fenotiplerini meydana getirmektedirler (17,27,53). 122. ve 160. amino asitlerde lizin veya arjinin bulunmasına göre d/y veya w/r subtipleri ayırtedilmektedir (Şekil 4.12).

Son yıllarda bunların dışında da yüzey (zarf) proteinlerinde mutasyonlar tanımlanmaktadır. Özellikle aşılansmış çocuklarda HBsAg pozitifliğinin saptanması üzerine yapılan araştırmalarda HBsAg a determinantında öncelikle 144. amino asitte glisin-arjinin yer değiştirmesi saptanmıştır (113,163). Bu da aşının geliştirdiği anti-HBs antikorunun tanımasından kaçan bir mutasyon oluşumuna neden olmaktadır (29,82).

Yüzey geni mutantlarının aşının korumasından kaçabilen, HBsAg negatif HBV enfeksiyonlarına yol açabilen, fulminan seyirle ilişkisi olabilen virüsler meydana getirebildiği gösterilmiş olmasına rağmen halen pratikte önemleri olduğu kuşkuludur (78,127).



Şekil 4.13 Aşıdan sonra HBsAg'nin a determinantında bildirilen bazı mutasyonlar

http://www.vhsd.org/slayt_seti/hepatit_b_05.htm sitesinden alınmıştır.

4.11.5. Polimeraz geni mutasyonları:

Polimeraz geni HBV'nun en büyük geni olup diğer 3 genle de üst üste gelmektedir. Bu nedenle gen üzerindeki değişiklik daima diğer genlerde de değişikliğe neden olmaktadır. Bunun için doğal olarak polimeraz mutasyonlarına çok az rastlanır (67, 125). Geçmiş yıllarda polimeraz geninde bazı delesyonlar tanımlanmışsa da önemleri anlaşılamamıştır. Bugün için polimeraz geni mutasyonları dendiğinde akla nükleozid analoglarına karşı direnç sağlayan mutasyonlar gelmektedir (10,124, 144). Mutant virüslerin patojenitesinin “wild tipten” az olup olmadığı veya bu virüslerin interferon tedavisine cevapları konusunda henüz bilgi yoktur.

4.11.6. X geni mutasyonları:

HBV X proteininin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Diğer bir hepadnavirüs olan ördek hepatit virüsünde de X geni bulunmamaktadır. X geninin DNA'ya bağlanma özelliği olmadığı için transaktivasyon etkisini muhtemelen diğer proteinlerle etkileşerek veya bazı sinyal iletim sistemleri aracılığı ile etkileşerek yapmaktadır (5,152). HBV serolojik göstergeleri negatif olan bazı diyaliz hastaların serumlarında HBV DNA polimerazın bulunması sonucunda yapılan araştırmalarda X geninde delesyonlarla giden bazı mutasyonlara rastlanmıştır (99). X proteininin viral replikasyonda rolü olabileceğini gösteren bulgular tespit edilmiştir. Bu nedenle bu gendeki mutasyonların virüsün replikasyonunda ve diğer bazı genlerin ekspresyonunda değişiklikler yapması ve atipik serolojilere neden olması beklenebilir. HBsAg(-) bazı HBV infeksiyonlarında X geni delesyonlarının bulunması atipik serolojilerle X geni mutasyonları arasında ilişki kurulmasına neden olmuştur (48). Ayrıca X geninin polimeraz ve prekor genleri ile üstüste binmesi, HBV “enhancer” II'nin ve prekor ve kor promoterlarının X geni içerisinde yer almaları X geni bölgesindeki mutasyonların çok yönlü etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Kor promoter bölgesi mutasyonları geniş olarak ele alınmış mutasyonlardandır. HBeAg(-) bütün hastalarda prekor stop kodon mutasyonunun olmaması üzerine yapılan açıklamalardan biri de bu hastalarda HBeAg ekspresyonunun azalmasına yol açan kor promoter mutasyonlarıdır (68,115). Kor promoter bölgesindeki AT tekrarlamalarından zengin bölgede yer alan iki mutasyon üzerinde durulmuştur (A1762T ve G1764A). Bu mutasyona sahip virüslerde HBeAg

ekspresyonu azalırken HBcAg ekspresyonunda artma olduğu bildirilmiştir. Bu iki mutasyonun fulminan hepatitle ilişkili olduğu iddia edilmektedir (13).

X geni ürününün hepatokarsinogeneziste rolü olduğu kabul edilmektedir. Bazı karaciğer kanseri hücrelerinde X geni delesyonlu HBV mutantları tespit edilmiştir (15,62). Bunlar genellikle 128-132. kodonlar civarında çerçeve kaymasına (frameshift) ve normalden 20 amino asit kısa X proteinlerinin meydana gelmesine sebep olan mutasyonlardır. HBx proteinin apoptozisi p53'ten bağımsız bir yolla indüklediği ve hücrelerin klonal aşırı çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (142). Ayrıca HBe ekspresyonunun hücre siklusünün geç G1 fazını bloke edip apoptozise gidiş öncesinde de hücre bölünmesini durdurduğu gösterilmiştir. HBV X geni mutantlarının HBx'in apoptozisi indükleyici ve G1'de bloklayıcı tesirini ortadan kaldırdığı, bu şekilde hepatosellüler kanser gelişmesinin kolaylaştığı iddia edilmektedir.

Hepatosellüler kanser oluşumunda HBx mutasyonlarının rolüne dair ortaya atılan bir diğer hipotez de HBx proteininin hücrenin hasarlı DNA'sına bağlanma özelliğinde olduğu, böylece DNA tamirini engellediği şeklindedir (26). Aynı çalışmada hasarlı DNA'ya bağlanan HBx'in bu DNA'yı ultraviyole ışığının kırılma yapıcı tesirine hassas hale getirdiği de düşünülmektedir.

4.12. HBV'nin Kliniği

4.12.1. Akut HBV Enfeksiyonu (AVH)

Kuluçka dönemi ortalama 70-80 (28-180) gün olan enfeksiyonun kronikleşme riski %10'dur (83). Preikterik, ikterik ve postikterik olmak üzere üç evresi bulunan hastalığın klinik formları ise, ikterik, anikterik, kolestatik, subfulminan ve fulminan'dır.

İkterik formun 1-2 haftalık prodrom döneminde, baş ağrısı, halsizlik, çabuk yorulma, artralji, iştahsızlık, bulantı, kusma, ateş, ürtiker, migren gibi yakınmaları olan hastalarda tüm belirtiler sarılığın ortaya çıkışı ile kaybolur. Bu ikterik dönemde idrar koyulaşır ve dışkı rengi açılır. 2-4 hafta süren bu dönemde hepatomegali olur ve splenomegali, lenfadenomegali ve kaşıntı olabilir. Postikterik dönemde sarılık geriler ve hasta 1-2 hafta içinde kendisini iyi hissetmeye başlar. Klinik biyokimyasal ve histopatolojik açıdan tam olarak iyileşme 6 ayda olur.

Anikterik formda klinik açıdan belirti ve bulgular son derece silik olduğundan, çoğunlukla gözden kaçır. Kronikleşme bu olgularda daha sıktır. Kolestatik formda

bilirubinemi % 20 mg'ı aşabilir ve sarılık 8-29 hafta sürebilirse de, prognoz çok iyi ve iyileşme tamdır.

Subfulminan formda bazı AVH olgularında, iyileşme görülmez; sarılık, ateş ve sindirim şikayetleri devam eder. Prognoz kötüdür ve sıklıkla 3-10 hafta içinde ölüm görülür veya 1-3 yıl içinde siroz gelişir.

Fulminan formda 1-2 hafta içinde ağır karaciğer yetmezliği ve ensefalopati geliştiğinden AVH'lı olguların çoğu kaybedilmektedir (75).

4.12.2. Kronik HBV Enfeksiyonu

Kronikleşme sıklıkla, subklinik latent HBV enfeksiyonunu izlerse de, kronikleşen olguların çoğunda akut hepatit öyküsü bulunmamaktadır. Erişkinlerde % 10 olan kronikleşme riski, çocuklarda % 50, yenidoğanlarda ise % 90'dır (12). Erkeklerde ve bağışıklık sistemi bozuk olanlarda kronikleşme daha sıktır. Altı aydan daha uzun süreyle HBsAg pozitif olan kronik hepatitli olgular, klinik açıdan üç grupta değerlendirilmektedir: kronik asemptomatik taşıyıcılar, kronik persistan hepatit ve kronik aktif hepatit.

Kronik asemptomatik taşıyıcılar, HBV enfeksiyonu için büyük bir kaynak oluşturmaları, PHCC gelişimi ve HDV süperenfeksiyonu gibi riskler taşımaları nedeniyle klinik açıdan önemlidir.

Kronik persistan hepatit, selim seyirli olup, prognozu iyidir; kronik aktif hepatite dönüşme riski ise oldukça düşüktür (108).

Kronik aktif hepatit, ilerleyici bir seyre sahip olup, prognozu kötüdür ve yüksek oranda siroza dönüşmektedir. Kronik olarak HBsAg pozitif olan olgular, farklı antijen ve antikor sistemlerinin varlığına bağlı olarak da üç grupta değerlendirilmektedir.

1. HBeAg (+) olan ve viremi bulunan kronik karaciğer hastaları
2. HBeAg (-), anti-HBe (+) olmasına karşın viremi bulunan, ciddi seyirli, ilerleyici karakterde kronik karaciğer hastalığı bulunanlar
3. Anti-HBe (+) olan ve viremi ile karaciğer hastalığı bulunmayanlar

Birinci ve ikinci grubu birbirlerinden ayıran noktanın HBeAg varlığı ve yokluğu olduğu dikkate alınacak olursa, bu antijenin hastalığın seyrini etkileyebilecek nitelikte olduğu açıkça görülmektedir. İkinci grup olgulara özellikle Akdeniz ve Uzakdoğu

lkelerinde rastlanmaktadır ve olaydan HBV genomunun pre-kor bölgesindeki mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır. nc grubun ise, ya birinci grupta iken serokonversiyona uğramış veya akut hepatitten kronik karaciğer hastalığı gelişmeden basit bir taşıyıcı durumuna geçmiş olguları içerdiği düşünülmektedir (95).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

GEREÇ:

5.1. Kullanılan Aletler

Agaroz jel elektroforez düzeneği, ATTO (Japonya)

Agaroz jel elektroforez düzeneği, Bio-Rad (ABD)

β -Sayacı, Tech. Assos (ABD)

Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)

DNA Sequencer ABI 3100 (İngiltere)

Derin Dondurucu -20° C, Philco (Türkiye)

Derin Dondurucu -70° C, So-Low (ABD)

Developer cihazı, Kodak (İngiltere)

Dizi analizi cihazı, Base Runner (ABD)

Etüv, Heraus (Almanya)

Fotoğraf makinası, Vilber Lourmat (Fransa)

Güç kaynağı, ATTO (Japonya)

Güç kaynağı, IBI-MPE 3000E (ABD)

Hassas terazi, Mettler AT261 (İsviçre)

Hassas terazi, PJ6000 (İsviçre)

Isı bloğu, Techne DB-ZA (İngiltere)

Isı Kontrol Cihazı PTC100 (İngiltere)

Jel okuyucu, IBI (ABD)

Karıştırıcı, Lab Line Orbit (ABD)

Kırık buz makinası, Scotsman (ABD)

Laminar akımlı kabin, Özge A.Ş. (Türkiye)

Manyetik karıştırıcı, Cole-Parmer (ABD)

Mikrosantrifüj, Heraus (Almanya)

Mikrosantrifüj, IEC-Micro (ABD)

Otoklav, All American (ABD)

Otomatik pipet, Gilson (Fransa)

Pastör fırını, Elektro-Mag (Türkiye)

pH metre, Corning (ABD)
Rotor, Sorvall, Beckman (İngiltere)
Santrifüj, Heraeus Digifüj GL (Japonya)
Soğutmalı santrifüj, Hettich 30 RF (Almanya)
Su banyosu, Dedeoğlu (Türkiye)
Su banyosu, Kottermann (Fransa)
Su saflaştırma cihazı, Milli Q (JS19 UF) Millipore (ABD)
Terazi, Mettler PE2000 (İsviçre)
Termal döngü cihazı, BiometraUNO (Almanya)
UV kaynağı, Vilber Lourmant (Fransa)
Vakum Manifolder, Promega (ABD)
Vorteks, IKA MSI (ABD)

Film:

Polaroid/Siyah-beyaz 667 Kodak (ABD)

5.2. Kimyasal Maddeler

Restriksiyon enzimleri [Alw I, Nci I, Ear I, Nla IV (New England BioLabs, İngiltere), Hph I (MBI, Litvanya)] ve markerlar (ϕ X 174, DNA ladder Promega, ABD) dışındaki tüm kimyasal maddeler Sigma'dan (Almanya) temin edilmiştir.

5.3. Kullanılan Çözeltiler

TE:	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)
TBE Solüsyonu:	Tris, 54.7 g, Borik asit, 27.5 g, 0.5 M EDTA (pH 8.0)
TAE Solüsyonu:	Tris, 242 g, Asetik asit, 57.1 g, 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Agaroz Jel Yükleme Tamponu:	6X yükleme tamponu, % 25 Bromofenol mavisi, % 25 Ksilen siyanol, % 30 Gliserol
Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ortamı:	10X PZR Tamponu, 200 mM (25 mM) MgCl ₂ , 200 μ M (25 mM) dNTP, 1 ünite

(5 u/ μ l) Taq Polimeraz, 20 pmol
(100 pm/ μ l) B935, B939, CPRF1, CPRR2,
HBVF1, HBVF2, HBVR2, MDC1, MF16,
MF24, Xbeg, Xend primerleri

Dizi Analizi Reaksiyonu Tamponları:

20 X TTE:

Tris 261 g, Tawrine 72 g,
Na₂EDTA2H₂O 4 g,
1000 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Dizi Analizi Jeli

Üre 50.4 g, Akrilamit: Bisakrilamit, 19:1,
18 g, 20 X TTE 6 ml, H₂O 50 ml
Üre çözündükten sonra, H₂O ile 120 ml ye
tamamlanır ve AMPS 262 μ l, TEMED
64.3 μ l.

Jel Sabitleme Solüsyonu:

Asetik asit 50 ml, H₂O 1950 ml,
(Asetik asit 200 kat sulandırılır.)

5.4. Kullanılan Primerler

Dış Primerler

HBVF1 (ileri)

5'- CCC TGC TGG TGG CTC CAA GTT C – 3'

55-76 baz dizileri

HBVR2 (geri)

5' AAG CCA AAC AGT GGG GGA AAG C – 3'

708-730 baz dizileri

ürün uzunluğu: 675 bp

İç Primerler

HBVF2 (ileri)

5'- GTC TAG ACT CGT GGT GGA CTT CTC TC – 3'

246-271 baz dizileri

HBVR2 (geri)

5'- AAG CCA AAC AGT GGG GGA AAG C – 3'

708-730 baz dizileri

ürün uzunluğu: 485 bp

Dış Primerler

B935 (ileri)

5'- GCG CTG CAG AAG GTT TGT GGC TCC TCT G – 3'

1233-1260 baz dizileri

MDC1 (geri)

5' TGG ATA AGA TAG GGG CAT TTG – 3'

2304-2324 baz dizileri

ürün uzunluğu: 1091 bp

İç Primerler

CPRF1 (ileri)

5'- CAA TGT CAA CGA CCG ACC – 3'

1678-1695 baz dizileri

CPRR1 (geri)

5'- GAG TAA CTC CAC AGT AGC TCC – 3'

1928-1948 baz dizileri

ürün uzunluğu: 270 bç

MF24 (ileri)

5'- AGC GAC TGC GTG GAA CCT – 3'

1228-1446 baz dizileri

MF16 (geri)

5'- TGG ATA AGA TAG GGG CAT TTG – 3'

1903-1919 baz dizileri

ürün uzunluğu: 691 bç

B935 (ileri)

5'- GCG CTG CAG AAG GTT TGT GGC TCC TCT G – 3'

1233-1260 baz dizileri

B936 (geri)

5'- GCG CTG CAG GCT TGA ACA GTG GGA CAT – 3'

1852- 1878 baz dizileri

ürün uzunluğu: 645 bç

Xbeg (ileri)

5'- GCC TGA ATT CCA TGG CTG CTC GGT TGT GC - 3'

1385- 1413 baz dizileri

Xend (geri)

5'- CAT GAA CTC GAG ATG ATT AGG CAG AG – 3'

1877-1903 baz dizileri

ürün uzunluğu: 518 bç

Yöntemler:

5.5. DNA ELDESİ

Çalışmamıza, Haydarpaşa Numune Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarından serolojik markerlarına [(HBsAg (+) -AntiHBcIgG (+) veya HBsAg (+) -AntiHBcIgM (+)] göre seçilen 187 olgu dahil edilmiştir. Serumdan HBV DNA izolasyonu amacıyla kullanıldı.

Fenol-Kloroform Yöntemi

100 µl serum, 100 µl %0.5 SDS, 5 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 8.0), 2 µl Proteinaz K içeren solüsyon ile 3 saat süre ile 70°C'de bekletildi. Üzerine eş hacim (200 µl) fenol-kloroform eklenerek hafifçe vortekslendikten sonra 5 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi. Üst faz steril bir tüpe aktarıldı ve fenol-kloroform işlemi tekrarlandı.

Steril bir tüpe aktarılan üst faza 10 µl 3 M sodyumasetat (NaAc) ve %100 lük etanolden 2 hacim eklenerek, 1 saat -70°C'de bekletildi ve 4°C'de 15 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi. Üst sıvı alınarak pellet havada kurutulduktan sonra, 20 µl dH₂O ile çözülerek -20°C'de saklandı (159).

5.6. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) DNA'nın yüksek ısı ile tek iplikli hale getirilmesini takiben özel olarak hazırlanan oligonükleotid primerlerin kalıp DNA ile eşleşmesi ve DNA polimeraz tarafından sentezin gerçekleştirilmesi temel prensibine dayanan ve belirli bir DNA bölgesinin yaklaşık bir milyon kat çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir.

Bir döngü sistemi olan PZR üç basamaktan oluşur. Birinci basamakta çift iplikli DNA 94°C' de tek iplikli forma dönüşür, genellikle 37-55°C arasında gerçekleşen ikinci basamakta ise çoğaltılması istenen bölgeye özel oligonükleotid primerler bağlanır. Üçüncü basamakta ısıya dayanıklı *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılarak yeni zincirin sentezlenmesi sağlanır. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve ortalama 30 kez (25-40) tekrarlanan döngüler sonunda DNA, ısısal döngü cihazında katlanarak (eksponansiyel) çoğaltılır.

Standart bir PZR'da, 0,1-1 µl kalıp DNA, 20 pmol P₁(ileri) ve P₂ (geri) primerler, her bir dNTP'den 50 µM, 1,5 mM MgCl₂ ve 2 ünite *Taq* polimeraz kullanılmaktadır. PZR'nun etkinliğinin artırılmasındaki önemli etkenlerden biri de primer bağlanma ısısı optimizasyonudur. Çift iplikli DNA'nın ayrılma ısısı olan T_m derecesinin 2-3 derece fazlası primer bağlanma ısısı olarak kullanılır [T_m(°C): 2(A+T)+4(G+C)]. Bu yöntem ile 3 kb'a kadar olan DNA bölgesinin etkin bir şekilde çoğaltılması mümkündür. Çoğaltılan hedef bölge agaroz jel elektroforezi yapılarak gözlenir (159).

5.7. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Agaroz jel elektroforezi DNA parçalarının ayrılması, tanımlanması ve saflaştırılması amacı için kullanılan bir yöntemdir. Agaroz jel elektroforez yöntemi ile birkaç yüz ile ~ 20 kb aralığındaki DNA parçalarının ayrılması sağlanır. DNA'nın elektroforetik göç uzaklığı, aynı anda jele yüklenen ve bant uzunlukları bilinen marker DNA'nın elektroforetik göç uzaklığı ile kıyaslanmaktadır. Boylarına göre ayrıştırılmış bu bantların görünebilmesi için, DNA'nın baz çiftleri arasına bağlanarak onu UV ışığı altında görünür hale getiren etidyum bromür (EtBr) boyasından yararlanılmaktadır (159).

5.8. HBV GENOTİP ANALİZİ (RFLP YÖNTEMİ)

Restriksiyon enzimleri (RE) çift sarmal DNA'yı belirli bölgelerden kesen enzimlerdir. Bakterilerden izole edilen bu enzimler DNA'da özgün kısa dizileri tanır ve kesme işlemini, enzime göre değişmek üzere, tanıma yerinde gerçekleştirir. Kesim sonucu küt veya yapışkan uçlu DNA parçaları oluşur. RE'lerin tanıma yüzeyleri genellikle 4-6 baz çifti uzunluğundadır.

Bugün 100'den fazla kesim yüzeyine sahip 400'ü aşkın restriksiyon enzimi bilinmektedir. Her bir bakteri türünde farklı diziyi tanıyan bir restriksiyon enzimi bulunmakla birlikte bazı bakterilerde birden fazla restriksiyon enzimi vardır. Aynı bakteriden, birden fazla enzim izole edildiği takdirde I, II, III gibi kısaltmalar isminin sonuna eklenmektedir.

Restriksiyon enzimlerinin DNA üzerindeki aktiviteleri için bazı optimal koşullara gereksinimleri vardır. Aksi halde enzimlerin aktivitesi azalır. Mezofilik

bakterilerden elde edilen RE'leri, genellikle 37°C-40°C arasında aktif olmasına karşın, termofiliklerde optimal ısı 70°C kadar çıkabilir.

RE'leri dışarıdan giren DNA dizileri üzerinde etkili olmasına karşın, o bakterinin kendi genomu için zararsızdır. Bakteri hücrelerini yabancı DNA'ya karşı dirençli kılan bu enzimler, DNA molekülünde yalnız belirli baz dizilerine özgün olduklarından gen aktarma işleminde ve çeşitli DNA moleküllerinin birincil yapılarının incelenerek baz dizilerinin saptanmasında önemli rol oynarlar. Restriksiyon nükleazlarının dizi özgünlüğü, kırıdıkları DNA moleküllerinden yalnızca belirli uzunluk ve sayıda DNA parçaları ortaya çıkmasını sağlar.

Çalışmamızda kullanılan RE'leri ve tanıma yüzeyleri aşağıda belirtildiği şekildedir.

NlaIV	5'-GGN ^N NCC.....-3'
BspLI	5'-GGN ^N NCC.....-3'
EcoRI	5'-CTCTTC(N) ^N ...-3'
AluI	5'-GGATC(N) ^N-3'
HphI	5'-GGTGA(N) ^N-3'
NciI	5'-CC ^N SGG.....-3'

5.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

HBV DNA izolasyonunun ardından Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), HBV DNA'nın S bölgesini çoğaltmak amacıyla kullanıldı. HBV DNA S bölgesine ait özel primerler ile semi-nested PZR yöntemine dayanarak iki tur olarak çoğaltıldı.

HBVF1 → ileri

I ctcaccact ttcacaaaa cttctcaaga tcccagagtc agggccctgt acctccctgc
61 **tggtggctec aagttcggaa cagtgagccc tgctcagaat actgtctctg ccatactgtc**
121 **aatcttatcg aagactgggg accctgtgcc gaacatggag agcatcgcac caggactcct**
181 **aggacccctg ctcgtgttac aggcgggggtt ttcttggtg acaaaaatcc tcacaatacc**

HBVF2 → ileri

241 **acagagteta gactcgtggt ggaattctet caattttcta gggggaacac ccgtgtgtct**
301 **tggccaaaat tcgcagtccc aaatctccag tcactcacca acctgtgtgc ctccaacttg**

361 tcctggttat cgtggatgt gtcgcggcg tttatcatc ttctctgca tcctctgct
421 atgctcatc ttctgttg ttctctgga ctatcaagg atgtgcccg ttgtctct
481 aattccagga tcatcaacca ccagcacggg accatgcaag actgacacag ctctgtctca
541 aggaacctct atgttcct catgttctg tacaaaacct acggacggaa actgcacctg
601 tattcccatc ccatcatctt gggcttcgc aaaataccta tgggagtggg cctcagtcg
661 ttctcttg ctcagttac tagtgccatt tgtcagtg ttctagggc ttcccccac
721 tgtctggctt tcagttatat ggatgatgtg gtttggggg ccaagtctgt acaacatctt
481 aattccagga tcatcaacca ccagcacggg accatgcaag actgacacag ctctgtctca
541 aggaacctct atgttcct catgttctg tacaaaacct acggacggaa actgcacctg
601 tattcccatc ccatcatctt gggcttcgc aaaataccta tgggagtggg cctcagtcg
661 ttctcttg ctcagttac tagtgccatt tgtcagtg ttctagggc ttcccccac
721 tgtctggctt tcagttatat ggatgatgtg gtttggggg ccaagtctgt acaacatctt
geri ← HBVR1

PZR da ilk tur, her bir örnek için; 1X (10X) PZR tamponundan, 2 mM (25 mM) $MgCl_2$ 'dan ve 25 mM dNTP karışımından 2.5 µl, 10 pM HBVF1 ve HBVR2 primerlerinden 1 µl, Taq DNA Polimeraz'dan (5 unite/µl) 0.1 µl alındı ve 8.15 µl distile su ile 15 µl e tamamlandı. Hazırlanan karışım, 10 µl alınan HBV DNA örneklerinin üzerine eklendi ve pipetle karışmaları sağlandıktan sonra buharlaşmayı önlemek için 40 µl mineral yağı ile kapatıldı.

Tüpler termal döngü cihazına konarak PZR'na başlandı. PZR 95 °C'de 2 dakika ön denatürasyon ile başladı. 94 °C 'de 15 saniye denatürasyon, 60 °C 'de 45 saniye yeniden bağlanma ve 72 °C 'de 45 saniye uzama aşamalarından oluşan PZR programı 25 döngü olacak şekilde yapıldı. İlk tur PZR ürününden 2.5 µl alınarak yine aynı reaksiyon şartları ve programı kullanılarak sadece ileri primeri değiştirilerek 2. tur PZR yapıldı.

5.8.2. Agaroze Jel Elektroföze

PZR ürünlerini görüntülemek için %1.5 luk agaroz jel elektroföze yapıldı. Örnekler, 100 V, 40 Amp'de 1.5 saat yürütüldü. Her bir örnek için jele 5 µl DNA, Bromofenol mavisi ile karıştırılarak yüklendi.

5.8.3. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

2. tur 20 µl PZR ürünü 10 X enzim tamponu ve 10 ünite restriksiyon enzimi [Alw I, Nci I, Ear I, Nla IV (New England BioLabs) Hph I (MBI Fermentas)] ile 3 saat 37°C bekletildi. *Hph I* enzimi genotip F için, *Nci I* genotip E için, *Alw I* genotip C için, *Ear I* genotip B için, *Nla IV* genotip A ve D için kullanıldı. Kesim sonuçları % 3.0' lük nusieve GTG (3:1) agaroz jel üzerinde görüntülenerek genotip tayini yapıldı.

5.9. DİZİ ANALİZİ

Dizi analizi DNA'nın belirli bir bölgesinin baz dizilerinin saptanmasını sağlayan bir yöntemdir. İlk olarak 1970'lerde ortaya konmuş, daha sonraları prensip olarak birbirinden farklı olan iki orijinal DNA Dizi Analizi metodu tanımlanmıştır. Sanger'in enzimatik veya dideoksi zincir sonlanması metodu; DNA polimeraz ile tek iplikli bir kalıptan bir DNA ipliğinin sentezini içerir. Maxam ve Gilbert'in kimyasal yıkım metodu ise; orijinal DNA'nın kimyasal olarak parçalanmasını içerir. Radyoaktivite içeren polinükleotidler poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıldığında, orijinal DNA'nın nükleotid dizisi jelin bir otoradyografisi ile direkt olarak okunabilir. PZR metodunun ortaya konması ile daha basit ve daha güçlü yeni dizi analizi yöntemleri (cycle sequencing) ortaya konmuştur.

5.9.1. HBV Prekor-kor ve X Bölgelerinin Dizi Analizi ile İncelenmesi

5.9.1.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

5.9.1.1.1 Kor Bölgesi

Genotipleri belirlenen 50 örnek, prekor bölgeleri ve ve kor promotor dizileri incelemek amacıyla nested-PZR işlemine tabi tutuldu.

B935 → ileri

```
1201 actggttggg gcttggccat aggccatcag cggegetgea gaaggtttgt ggteetctg
1261 ccgatccata ctgcggaact cctagccgct tgttttctc gcagcaggtc tggggcaaaa
1321 ctcatcgga ctgacaattc tctcgtgctc tcccgcaagt atacatcctt tccatggctg
1381 ctaggctgtg ctgccaactg gatcctgcgc gggacgtcct ttgtttacgt cccgtcggcg
1441 ctgaatcccg cggacgaccc ctcccggggc cgcttggggc tctaccgccc gcttctccg
1501 ctgttgtacc gaccgaccac ggggcgcacc tctctttacg cggactcccc gtctgtgcct
1561 tctcatctgc cggaccgtgt gcacttcgct tcacctctgc acgtcgcag gagaccaccg
```

CPRF1→ ileri

1621 tgaacgccca caggaacctg cccaaggtct tgcataagag aactcttgga cttcageaa
1681 **tgtaacgac cgacctgag** gcatacttca aagactgtgt gtttactgag tgggaggagt
1741 tgggggagga ggtaggtta atgactttg tactaggagg ctgtaggcac aaattggtgc
1801 gttcaccagc accatgcaac ttttcacct ctgcctaata atctctgtt catgtcctac
1861 tgttcaagcc tccaagctgt gccttgggtg gcttgggac atggacattg acccgataa
1921 agaatttga **gtactgttg agttactctc** tttttgcct tctgacttct ttctgtctgt

geri ← CPRR1

1981 tctgagcttc ctgcacaccg cctctgctct gtatcgggag gccttagagt ctccggaaca
2041 ttgtcacct caccatacgg caatcaggca agctattctg tgttgggtg agttgatgaa
2101 tctagccacc tgggtgggaa gtaatttga agatcaagca tccagggact tagtagtcag
2161 ctatgtcaac gttaatatgg gcctaaaatt cagacaacta ttgtggttc acatttctg
2221 tcttacgtt gggagacaaa ctgttcttga atatttggtg tccttggag tgtggattcg
2281 cactctctct gcatatagac **caccaaagc ccctatctta** tcaacacttc cggaaactac

geri ← MDC1

PZR ilk tur, her bir örnek için; 1X (10X) PZR tamponundan ve 25 mM dNTP karışımından 5 µl, 10 pM B935 ve MDC1 primerlerinden 2.5 µl, Taq DNA Polimeraz'dan (5 unite/µl) 1 µl alındı ve 29 µl distile su ile 45 µl ye tamamlandı. Hazırlanan karışım, 5 er µl alınan HBV DNA örneklerinin üzerine eklendi ve pipetle karışımları sağlandıktan sonra buharlaşmayı önlemek için 40 µl mineral yağı ile kapatıldı. Tüpler termal döngü cihazına konarak PZR'na başlandı.

PZR 95 °C'de 5 dakika ön denatürasyon ile başladı. 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 50 °C'de 30 saniye yeniden bağlanma ve 72 °C'de 90 saniye uzama aşamalarından oluşan PZR programı 30 döngü olacak şekilde yapıldı. 72 °C'de 10 dakika daha uzama aşaması ile PZR sona erdi.

İlk tur PZR ürününden 5 µl alındı ve aynı reaksiyon şartlarında primerler değiştirilerek (CPRF1 ve CPRR1) 2. tur PZR için reaksiyon karışımı hazırlandı. 95 °C'de 5 dakika ön denatürasyon ile PZR başladı. Denatürasyon 94 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 30 saniye yeniden bağlanma ve 72 °C'de 30 saniye uzama aşamalarından oluşan PZR programı 30 döngü olacak şekilde yapıldı. Son uzama aşaması olan 72 °C'de 10

dakika ile PZR tamamlandı ve elde edilen ürünlerin 5 µl si % 1 lik agaroz jel elektoroforezinde görüntülendi. Elektroforezde 1 X TAE yükleme tamponu kullanıldı.

5.9.1.2. X Bölgesi

50 örnek X gen bölgelerinin dizileri incelenmek amacıyla PZR işlemiyle çoğaltıldı. Bu işlem için ilk önce MF24 ve MF16 primerleri kullanıldı. Oldukça az sayıda örnekte zayıf bantların görülmesi sonucu B935 ve B936 primerleriyle PZR yapıldı. Çoğaltılabilen örnek sayısının azlığı nedeniyle aynı örneklerle Xbeg ve Xend primerleriyle de PZR uygulandı

MF24 → ileri

1201 actggttggg gcttgccat aggccatcag cgactgcgtg gaacctttgt gtctcctctg

B935 → ileri

1201 actggttggg gcttgccat aggccatcag cggegcgtga gaaggtttgt ggctcctctg

1261 ccgacccata ctgcggaact cctagccgtc tgtttgctc gcagcaggtc tggggcaaaa

1321 ctcacggga ctgacaattc tgcgtgctc tcccgcaagt atacatcctt tccatggctg

Xbeg → ileri

1381 ctatggtga attccatggc tgctcggtg tgeggacct ttgttacgt cccgtcggcg

1441 ctgaatccc cgacgaccc ctcgggggc cgttggggc tctaccgcc gcttcctgcg

1501 ctgtgtacc gaccgaccac ggggcgcacc tctcttacg cggactcccc gtctgtgcct

1561 tctcatctgc cggaccgtgt gcattcgtc tcacctctgc acgtcgcag gagaccaccg

1621 tgaacgccc caggaacctg cccaaggtct tgcataagag aactcttga cttcagcaa

1681 tgtcaacgac cgacctgag gcatactca aagactgtgt gttactgag tgggaggagt

1741 tgggggagga ggtaggtta atgactttg tactaggagg ctgtaggcac aaattggtgc

1801 gttcaccagc accatgcaac ttttcacct ctgcctaac atctcttgt catgtccac

1861 tgttcaagcc tgcagcgct gccttgggtg gcttgggac atggacattg acccgataa

geri← B936

1861 tgttcaagcc tccaagctct gccttgggtg gcttgggac atggacattg acccgataa

geri← MF16

1861 tgttcaagcc tccaagctct gcctaactcat ctcaggttca tgagacattg acccgataa

geri← Xend

Her bir örneğe PZR uygulaması için, 1X (10X) PZR tamponundan ve 2 mM (25 mM) MgCl₂'dan 5 µl, 10 pM MF16 ve MF24 primerlerinden 2 µl alındı ve 24.8 µl

distile su ile tamamlandı. Hazırlanan karışım, 5 er µl alınan HBV DNA örneklerinin üzerine eklendi ve pipetle karışmaları sağlandıktan sonra tüpler termal döngü cihazına konarak PZR'na başlandı. 94 °C'de 5 dakika ön denatürasyonun ardından termal döngü cihazı durdurularak 25 mM dNTP karışımından 5 µl, *Taq* DNA Polimeraz'dan (5 unite/µl) 0.2 µl alınarak hazırlanan karışım her bir tüpe dağıtıldı. Örneklerin buharlaşmasını önlemek için 40 µl mineral yağı tüplerin üzerine konarak PZR işlemine devam edildi.

94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55 °C'de 1 dakika yeniden bağlanma ve 72 °C'de 2 dakika uzama aşamalarından oluşan PZR programı 40 döngü olacak şekilde yapıldı. Hot-spot olarak yapılan PZR'dan elde edilen ürünlerin 5 µl si % 1.5 luk agaroz jel elektroforezinde 90 V, 45 Amp'de görüntülendi. Elektroforezde 1 X TBE yükleme tamponu kullanıldı.

B935 ve B936 primerleri kullanılarak yapılan PZR'da, her bir örnek için; 1X (10X) PZR tamponundan ve 25 mM dNTP karışımından 5 µl, primerlerden 10 pM 2.5 µl, *Taq* DNA Polimeraz'dan (5 unite/µl) 1 µl alındı ve 29 µl distile su ile 45 µl e tamamlandı. Hazırlanan karışım, 5 er µl alınan HBV DNA örneklerinin üzerine eklendi ve pipetle karışmaları sağlandıktan sonra buharlaşmayı önlemek için 40 µl mineral yağı ile kapatıldı. Tüpler termal döngü cihazına konarak PZR'na hazır duruma getirildi.

PZR'na 94 °C'de 5 dakika ön denatürasyon ile başladı. 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 30 saniye yeniden bağlanma ve 72 °C'de 30 saniye uzama aşamalarından oluşan PZR programı 30 döngü olacak şekilde yapıldı. Örneklerin, 72 °C'de 10 dakika ve 22 °C'de 5 dakika daha tutulmasının ardından PZR sona erdi. 30 döngü halinde yapılan PZR işleminden sonra örnekler %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Pozitif örnekler %1 lik düşük ısıli jel elektroforezine yüklendi ve jelden kesilerek temizlendikten sonra dizi analizi işlemine geçildi.

Her bir örnek için; 1X (10X) PZR tamponundan ve 25 mM dNTP karışımından 5 µl, Xbeg ve Xend primerlerinden 10 pM 2.5 µl, *Taq* DNA Polimeraz'dan (5 unite/µl) 1 µl alındı ve 29 µl distile su ile 45 µl e tamamlandı. Hazırlanan karışım, 5 er µl alınan HBV DNA örneklerinin üzerine eklendi ve pipetle karışmaları sağlandıktan sonra buharlaşmayı önlemek için 40 µl mineral yağı ile kapatıldı. Tüpler termal döngü cihazına konarak PZR'na başlandı.

PZR'na 94 °C'de 5 dakika ön denatürasyon ile başladı. 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C' de 30 saniye yeniden bağlanma ve 72 °C'de 30 saniye uzama aşamalarından oluşan PZR programı 30 döngü olacak şekilde yapıldı. Örneklerin, 72 °C'de 10 dakika ve 22 °C 'de 5 dakika daha tutulmasının ardından PZR sona erdi. 30 döngü halinde yapılan PZR işleminden sonra örnekler %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Pozitif örnekler %1 lik düşük ısıli jel elektroforezine yüklendi ve jelden kesilerek temizlendikten sonra dizi analizi işlemine geçildi.

5.9.2 PZR Ürününün Saflaştırılması

DNA dizi analizi reaksiyonuna alınacak PZR ürünleri, primer, dNTP ve tuz fazlalıklarından arındırmak amacıyla çeşitli temizleme yöntemleri kullanılarak saflaştırılmaktadır. Elektroforez işlemi sonrası amplifiye edilen örneklerin tamamı (45 µl) bu kez % 1 lik düşük ısıli (melting agarose) agaroz jele yüklenerek, 60 V da yaklaşık 2 saat yürütüldü. UV ışık altında jelden kesilen bantlar ependorf tüplerine konarak 70 °C lik su banyosunda 5 dakika kadar bekletilerek jelin erimesi sağlandı. PZR ürünleri, Promega Wizard® DNA Purification system kullanılarak temizlendi. Bu işlem için, kitin içinden çıkan filtreli kolon ve şırıngalar, vakum manifolda yerleştirildi. 1 ml resin solüsyonu eklenen, ependorfların içindeki erimiş jel ve DNA karışımı pipet yardımıyla şırıngalara kondu ve musluk açılarak şırıngalardaki bütün sıvının filtreden geçmesi sağlandı. Bu kez de 2 şer ml % 80 izopropil alkol kondu ve yine musluk açıldı. Bütün sıvının süzülmesinin ardından, musluk kapatılarak kolonlar temiz ependorf tüplerinin içine kondu. 13000 rpm de 2 dakika santrifüjün ardından, yeni ependorfların içine alınan kolonlara 50 şer µl distile su eklendi ve 1 dakika bekletildikten sonra 1 dakika daha 13000 rpm de santrifuj edildi. Temizlenen PZR ürünleri ependorf tüpün içinde saklanarak dizi analizi işlemine başlandı.



Şekil 5.1 Vakum Manifold sistemi

5.9.3 Dizi Analizi Reaksiyonu

5.9.3.1. Sanger Metodu

Sanger metodu (zincir sonlanması, dideoksi veya enzimatik metot) kalıp olarak tek iplikli bir DNA molekülünü kullanan, bir DNA polimeraz enzimi ile yeni bir DNA ipliğinin sentezine dayanan enzimatik bir yöntemdir. *In vitro* koşullarda komplementer bir DNA sentezlenmektedir. Çift iplikli moleküller DNA dizi analizi için kullanılabilir ancak; öncelikle yapılması gereken çift iplikli DNA'nın tek iplikli forma getirilmesi yani denatüre edilmesidir. Sentez; oligonükleotid primerin kalıba bağlandığı noktadan itibaren başlamaktadır. DNA sentezine izin vermeyen bir başka nükleotid analogunun diziyeye bağlanmasıyla sonlanmaktadır. Sanger'in Dizi Analizi Metodu dideoksiribonükleosittrifosfat (ddNTP) 'ların bilinen dNTP'ler ile aynı yönde büyüyen zincir içine dahil olmasına bağlıdır. Ancak önemli olan; ddNTP'lerin dNTP'lerden farkı zincir uzaması için gerekli olan 3'-OH grubunun eksik olmasıdır. İşte bu dizi sonlandırıcı nükleotid analogları ddNTP'lerdir. Bir ddNTP yeni ipliğin içine dahil olduğunda hidroksil grubunun olmaması dNTP varlığında gerçekleşen bir fosfodiester bağının kurulmasını önler ve zincir uzaması bu noktada sonlanır. Bir reaksiyona DNA polimeraz ile dört ddNTP'den biri ve bilinen dört dNTP doğru oranlarda uygulanmalıdır. ddNTP'nin reaksiyona katılması keyfidir ve çeşitli uzunluklarda polinükleotid zincir popülasyonu oluşturur. Sentez kalıba oligonükleotid primerin eşleştiği noktadan başlar ve her zincir kullanılan ddNTP'ye bağlı olarak spesifik bir bazda sonlandırılır. Dört farklı reaksiyonda dört farklı ddNTP kullanılır, polinükleotidlerin dört popülasyonu, orijinal DNA'nın baz kompozisyonuna göre farklı büyüklükte moleküllerin bir karışımından oluşur. Tamamlanan dizi bilgisi bir

poliakrilamid jelde reaksiyon karışımının elektroforezi ile elde edilebilir. Bilinen dizi analizlerinde dNTP'lerden biri radyoaktivite ile işaretlidir. Genellikle [α -³⁵S] dATP, [α -³²P] dATP veya [α -³³P] dATP kullanılır. Bu şekilde poliakrilamid jelde dört farklı reaksiyonun elektroforezi ile kazanılan bilgi otoradyografi ile görünür hale getirilebilir.

5.9.3.2 "Cycle Sequencing"

"Cycle Sequencing" teknik olarak basit olması yanında oldukça güçlü bir yöntemdir. Sanger'in dideoksi tekniğinin adaptasyonu sonucu oluşmuş yeni bir yöntemdir. Bilinen dizi analizi yöntemlerinden avantajlıdır; reaksiyon oldukça basittir, daha az kalıp DNA'ya ihtiyaç duyar, kalıp DNA'nın temizliği ve kalitesi çok fazla kritik bir değer taşımaz. Bu metotta kalıp DNA'nın bir bölgesinin amplifikasyonu için tek bir primer kullanılır. Bir ddNTP ve dNTP'lerin bir karışımında *Taq* polimeraz kullanılarak kalıp DNA'nın bir bölgesinin amplifikasyonu lineer olarak gerçekleştirilir. Bilinen dideoksi metodundaki gibi, "cycle sequencing" tek iplikli bir kalıptan yeni bir DNA ipliğinin oluşturulmasını içerir. Sentez primer eşleşmesinin olduğu yerden başlar ve bir ddNTP'nin zincire girmesi ile sonlanır. Buradaki temel fark bu sürecin ısısal döngü cihazının kontrolü altında 20-30 kez tekrarlanabilmesidir. Bu sayede daha az kalıptan daha iyi netice elde edilebilmektedir; çift iplikli bir molekülün denatürasyon süreci bertaraf edilmiş; denatürasyon ısısal döngü cihazında otomatik olarak sağlanmış olmaktadır.

"Cycle Sequencing" tekniklerin geliştirilmesi DNA Dizi Analizi metodolojisine büyük bir katkı sağlamış, zaman alıcı basamakların ortadan kaldırılması ile DNA Dizi Analizi tayininin etkinliği ve güvenilirliği artmıştır.

Bu yöntem kullanılarak farklı klinik tablolar taşıyan hastalardan alınan örneklerle HBV DNA'nın prekor/kor gen bölgelerinin nükleotid dizileri belirlendi.

5.9.3.3. Kor / Dizi Analizi Reaksiyonu:

Bir örnek için 4 adet (G, A, T, C) 0.5 ml lik mikrosantrifüj tüp işaretlenerek hazırlandı. 1 tüp her örnek için DNA/primer karışımı, 1 tüp primer/ enzim karışımı ve 4 tüp sonlandırma karışımları için etiketlendi.

Primer/Enzim karışımı, 2 µl reaksiyon solüsyonu, 2.5 pmol 1 µl CPRF1 primeri, 2 µl Thermosequence enzimi ve 13 µl H₂O alınarak hazırlandı. 2 µl DNA ve 18 µl primer/enzim karışımından 1.5 ml lik ependorflara dağıtıldı.

Sonlandırma reaksiyonu karışımı, her bir reaksiyon için; 2 µl dITP ve 0.5 µl ³³Pdd NTP (³³Pdd GTP, ³³Pdd ATP, ³³Pdd TTP, ³³Pdd CTP) olarak hazırlandıktan sonra 2.5 ar µl terminasyon karışımı tüplerine dağıtıldı. 4.5 µl DNA/primer/enzim karışımı ependorflara konarak, üzerlerine 40 µl mineral yağı eklendi. Örnekler termal döngü cihazına kondu ve program başlatıldı.

95 °C 30 saniye, 55 °C 30 saniye ve 60 °C 6 dakika olarak 30 döngü halinde yapılan reaksiyondan sonra, her bir ependorfa 4 er µl stop solüsyonu pipetlendi. Dizi analizi durdurma solüsyonu, yağ tabakasına girmeden, tüplerin kenarından eklendi. Kısa süreli santrifüj işleminden sonra tüpler daha sonra kullanılmak üzere -20 °C' ye kaldırıldı.

5.9.3.4. X Dizi Analizi Reaksiyonu:

Agaroz jelden temizlenerek elde edilen DNA'lar İngiltere,Londra Üniversitesi Hepatoloji Merkezi'nde otomatik dizi analizi cihazında çalışılarak X gen dizileri belirlendi. Her bir örnek için 20 pmol HBV DNA ile 4µl primer kullanıldı. "Cycle Sequencing", Thermal Controller PTC100 cihazında Big Dye Terminator Cycle Sequencing kiti kullanılarak yapıldı. DNA Sequencer ABI 3100 ile elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

5.9.4. Dizi Analizinde Kullanılan Elektroforez Sistemi

5.9.4.1. Jel Hazırlanması

Poliakrilamid jeller uzunluğu 1 kb'dan daha az olan DNA parçalarının analizinde kullanılmaktadır. Poliakrilamidin yoğunluğu ilgilenilen DNA'nın büyüklüğüne bağlı olarak %3.5 ile %20 arasında değişmektedir. Bu oldukça ince (0,2-0,4 mm) olan poliakrilamid jeller genellikle üç tarafı ara bantlar ile kapatılmış iki cam tabağın arasına dökülmektedir. Bu düzenleme ile polimerizasyonun oksijen tarafından inhibe edilmesi jel stoğu olan "Instagel" in hava ile temasının kesilmesiyle önlenir. Ayrıca "Instagel" hazırlanan cam kasete dökülmeden hemen önce polimerizasyonu hızlandırıcı TEMED ve APS ilave edilir. Jel döküldükten sonra tarak ters olarak yerleştirilerek jelin polimerizasyonu beklenir. Polimerizasyon en az bir saat içinde gerçekleşir. Ayrıca jelin yapısında bulunan üre denatüre edici bir ajandır ve DNA'nın

çift iplikli formasyonlar oluşturmasını önler. Jelin hazırlanmasındaki en büyük problem oluşabilecek hava kabarcıklarıdır. Bunlar jelin kalitesini etkileyebileceği gibi DNA dizisinin hatalı okunmasına da neden olabilir.

Jel hazırlanıp dikkatlice döküldükten sonra donmaya bırakıldı ve 1X TTE jel yürütme solüsyonu olarak kullanıldı.

5.9.4.2. Yüksek Voltaj Dizi Analizi Jel Elektrofözezi

Hazırlanan jelin polimerize olmasından sonra ters olarak yerleştirilen tarak dikkatlice çıkarılarak kuyuların oluşmasını sağlayacak diğer tarafı konu ve baz yürüttücüye düşey pozisyonda yerleştirilerek elektrofözezi işlemeine hazır hale getirildi. Dizi analizi jelinde bulunan yüksek konsantrasyondaki ürenin kuyulara diffüz olma eğilimi örneklerin yüklenmesini etkileyecektir. Bu nedenle 3'er µl örneklerden yüklenmeden önce kuyular jelin tampon çözeltisi ile temizlendi. Elektrofözezi sırasında jele uygulanacak yüksek akım veya yüksek voltajın neden olacağı yüksek ısı, jelin erimesine hatta yanmasına sebep olabileceği için, güç kaynağı akım gücü (watt) göz önüne alınarak ayarlandı. Elektrofözezi işleminin süresi, örneklerle birlikte yüklenen Bromophenol blue ve Xylene cyanol gibi belirteç boyalar ile belirlenmektedir. Bu boyalar jelin yoğunluğuna bağlı olarak belirli sayılarda baz çiftleri ile aynı oranda migrasyon gösterirler. Elektrofözezi işleminin tamamlandıktan sonra cam kasetin ara bantları dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Camlar birbirinden ayrılırken jelin bir tarafta kalmasına özen gösterildi. Hazırlanan sabitleme solüsyonunda jel 30 dakika bekletildi. Daha sonra dikkatlice Whatman 3 MM Kromotografi kağıdı üzerine alındı ve sera ile kaplandı. Jel kurutucu'da 80 °C'de yaklaşık 1 saat boyunca kurutuldu. Bu şekilde jel otoradyografiye hazır hale gelmiş oldu.

5.9.5 Otoradyografi

Otoradyografi radyoaktivite içeren DNA parçalarının görünür hale getirilmesi ve bu sayede elektrofözezi işleminin ayrılan DNA bantlarının lokalizasyonu belirlenmesidir.

Temel olarak bir fotografik emülsiyondaki imajın ürtününü göstermekte ve β-partikülü ya da γ-ray bu emülsiyondan geçtiğinde gümüş iyonları gümüş atomuna dönüşmektedir. Görülemeyen bu sonuç belirli yıkama solüsyonlarından geçirildiğinde

görünür hale gelmekte ve bir otoradyografik imaj ortaya çıkmaktadır. Bu da orijinal örnekteki radyoaktivitenin dağılımını göstermektedir.

Dizi Analizi jelinin kurutulmasından sonra üzerindeki sera çıkarılarak film kasetine yerleştirildi. Ardından karanlık odada üzerine film konarak gece boyu bekletildi ve developer cihazından geçirilerek sonuçlar elde edildi.



6. BULGULAR

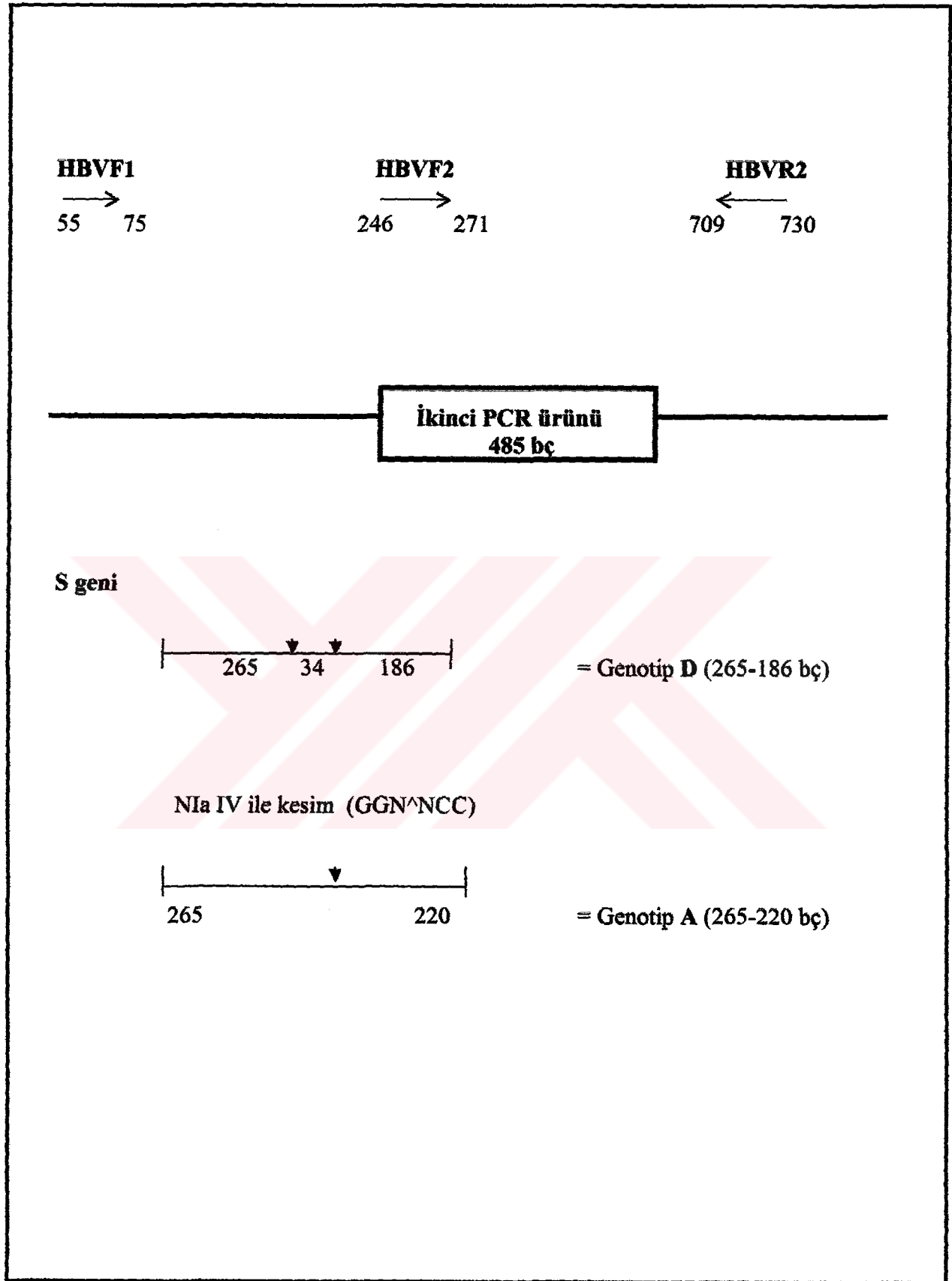
Haydarpaşa Numune Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarından serolojik markerlarına göre [(HBsAg (+) =AntiHBcIgG (+) veya HBsAg (+) - AntiHBcIgM (+)] seçilen 187 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Dot-blot hibridizasyonu ile HBV DNA pozitif olan hastanın serumu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

6.1. GENOTİP ANALİZİ

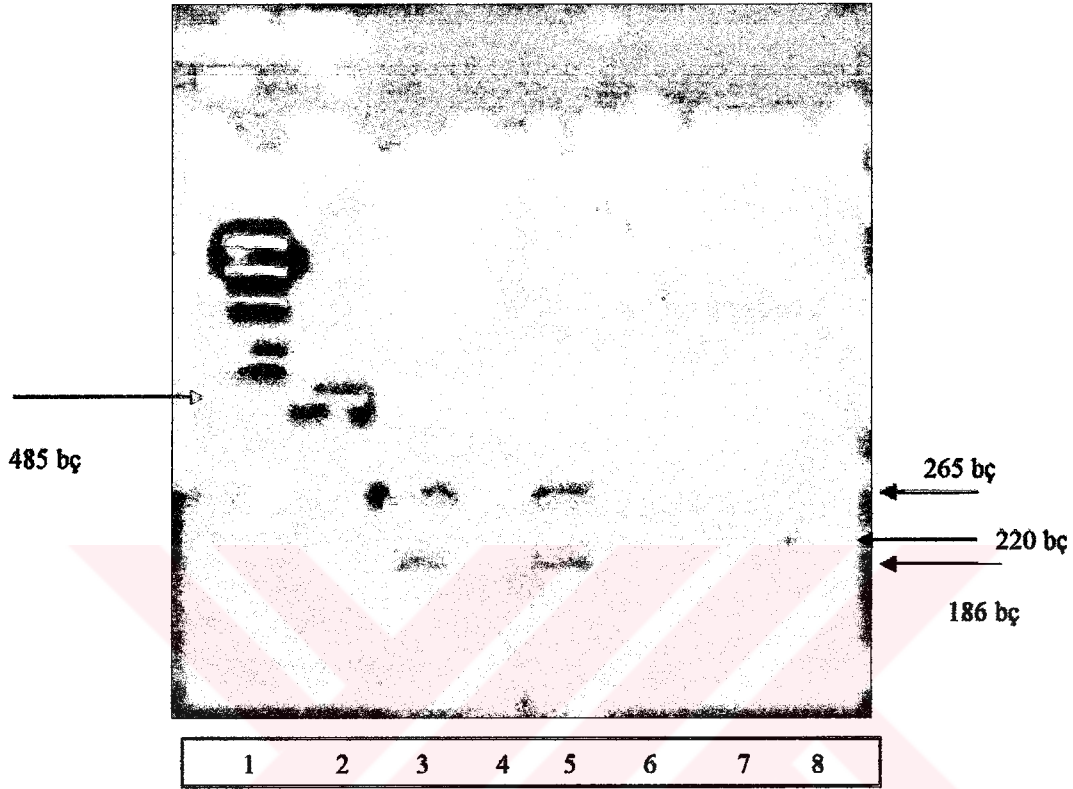
Tüm olguların genotiplerini belirlemek üzere hasta serumlarından elde edilen HBV DNA'ların S bölgeleri semi-nested PZR ile çoğaltıldı. %1 lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenen PZR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesildi. *Hph I* enzimi genotip F için, *Nci I* genotip E için, *Alw I* genotip C için, *Eae I* genotip B için, *Nla IV* genotip A ve D için kullanıldı. Kesim sonuçları % 3.0' lük Nusieve GTG (3:1) agaroz jelde görüntülendi.

Restriksiyon enzimlerinin tanıma ve kesim dizilerine göre genotip A, B, C, D, E ve F nin oluşturduğu bantlar Şekil 6.2'de gösterilmiştir. Genotip D için 485 bç lik PZR ürününü *NlaIV* restriksiyon enziminin 299 ve 264. nükleotidlere ait bölgeyi tanıyarak kesmesi ile 34, 186 ve 265bç lik bantlar oluşmaktadır. Genotip A' da ise, 299. pozisyonda tanıma bölgesi bulunmayan restriksiyon enzimi *NlaIV* kesim yapamayacağından sadece 220 ve 265bç lik bantlar gözlenmektedir. Genotip B için S geni parçası *EaeI* ile enzimin tanıma bölgesi olmadığından kesilmemektedir. Benzer şekilde *AlwI* kesim bölgesi genotip C'de bulunmamaktadır. Genotip E için *NciI* enziminin kesim noktası sadece 461. nükleotid, genotip F için *HphI*'in ise 82. nükleotididir. Dolayısı ile Genotip E için 379 bç ve Genotip F de 485 veya 438 bç lik bantlar oluşmaktadır.

Şekil 6.1 de genotip D ve A için kesim bölgeleri ve Resim 6.1.'de kesim sonuçları görülmektedir. 42 olguda genotip D (% 84), 6 olguda ise genotip A (% 12) saptanmıştır.

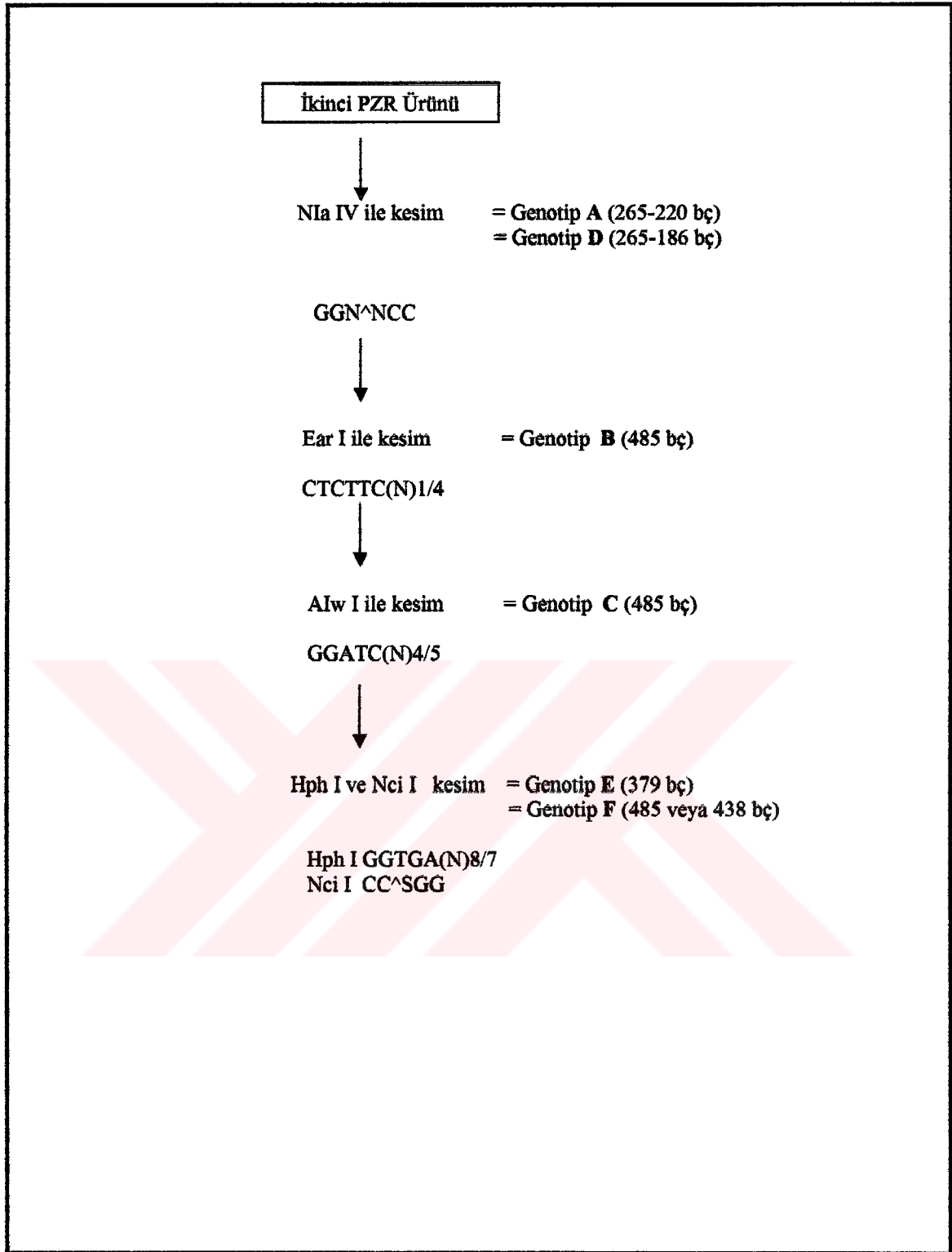


Şekil 6.1. Genotip A ve D'nin kesim bölgeleri



Resim 6.1. HBV S bölgesinin *NlaIV* restriksiyon enzimiyle belirlenmiş RFLP paternleri

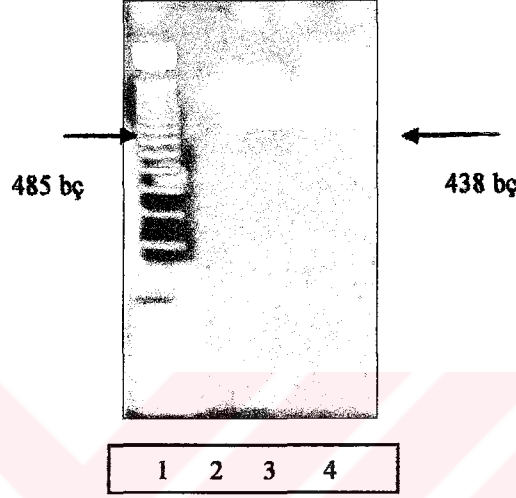
1.kuyu: Marker (ϕ X 174), 2.kuyu: PZR ürünü, 3-4. kuyu: *NlaIV* RE ile kesilmiş örnekler (Genotip D), 6-8. kuyu: *NlaIV* RE ile kesilmiş örnek (Genotip A). Genotip A, 220. ve 264. nükleotidlerinden kesilirken, genotip D 186. ve 264. nükleotidlerinden kesildi.



Şekil 6.2 Restriksiyon enzimleri kesim bölgeleri ve HBV genotipleri

Olguların 50'sinde serum HBV DNA'nın S bölgesi PZR ile pozitif olarak saptanmıştır. Restriksiyon enzimleri ile kesimin ardından üç farklı genotip, A, D ve F belirlenmiştir.

Resim 6.2. de 2 olguda bulunan genotip F (% 4) i belirleyen bantlar gösterilmiştir.

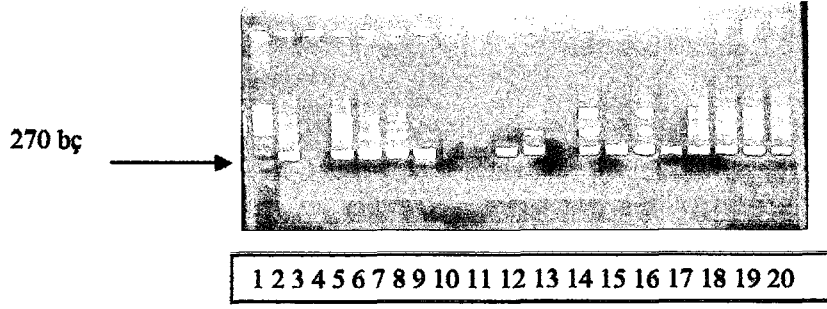


Resim 6.2. HBV S bölgesinin *HphI* ve *NciI* restriksiyon enzimleriyle belirlenmiş RFLP paternleri

1.kuyu: Marker (50 bp DNA ladder), 2.kuyu: PZR ürünü, 3-4. kuyu: *HphI* ve *NciI* RE ile kesilmiş örnekler (Genotip F)

6.2. PREKOR-KOR BÖLGELERİNİN DİZİ ANALİZİ İLE İNCELENMESİ

Genotipleri belirlenen 50 olguya ait HBV DNA'ları, virüsün prekor- kor bölgesindeki bilinen ve bilinmeyen mutasyonlarını ortaya çıkarmak üzere dizi analizi ile incelendi. Çoğaltılmak istenen bölgelere özgü primerlerle yapılan PZR sonucu 31 olgunun prekor-kor bölgeleri görüntülenmiştir (Resim 6.3).



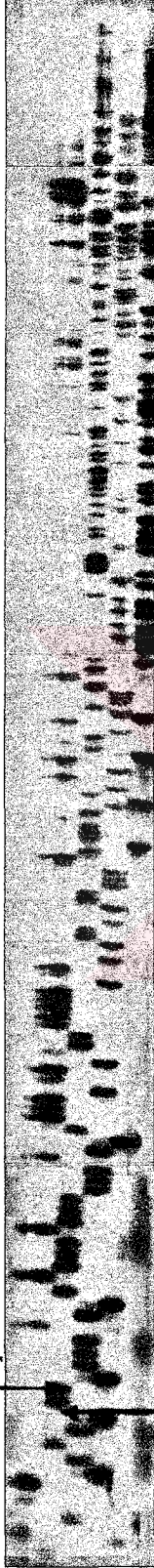
Resim 6.3. HBV pre kor/kor bölgeleri PZR sonuçları

1.kuyu: Marker (DNA ladder), 2.-20. kuyular: nested PZR sonucu belirlenen 270 bp.lik ürünler

Dizi analizi primeri olarak CPRR1 (ileri) kullanıldı. Otoradyogramlar jel okuyucu yardımıyla okundu ve 7 farklı mutasyon belirlendi.

Ayrıca, alınan sonuçlar Blast programı ile internet ortamında karşılaştırılmıştır. Değerlendirme hem nükleotid hem de protein düzeyinde yapılmış, genotiplerine göre en çok benzerlik bulunan HBV genomu temel alınarak değerlendirilmiştir.

G A T C



1. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGGTAAATGAGTCTTTGTACTAGAGGCTGTAGCATAAAATTCGGTCTGCGCACCA
GCACCATGCAACTTTTCAACGCTCTGCCTAATCAGTCTCTTGTTCATGTCCTACTGTCACCCCTCTTCTGT
GCTGGTGCTTGGCAT

Kodlanması beklenen aminoasitler

1 W G R R L G * M S L C T R G C S I N S V
1 TGGGGGAGGAGATTAGGTAAATGAGTCTTTGTACTAGAGGCTGTAGCATAAAATTCGGTCT
21 C A P A P C N F F N A L P N Q S L V H V
61 TGGCACCAGCACCATGCAACTTTTCAACGCTCTGCCTAATCAGTCTCTTGTTCATGTC
41 L L S P S S V L V L G
121 CTACTGTCACCCCTCTTCTGTGCTGGTGCTTGGCAT

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 1 tgggggaggagattaggttaaagtgagtctttgtactag-aggctgtag-cataaattcgg 58
|||||
Sorgu: 1741 tgggggaggagattaggttaaagg--tctttgtactaggaggctgtaggcataaatt-gg 1797

Örnek: 59 tctgcgaccagcaccatgcaactttttcaacgctctgcctaatacagtctcttgttcatg 118
|||||
Sorgu: 1798 tctgcgaccagcaccatgcaactttttca--cctctgcctaataca-tctcttgttcatg 1857

Örnek: 119 tcctactgtaagcctccaagctgtgccttgggtggcctttggaa
|||
Sorgu: 1858 ccctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggcctttggga 1900

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 32 VLEAVA*IRSAHQHHATFSTLCLISLLEFMSYCHPL 136
+ EAV S HQHHATFS L L+FMSYC L
Sorgu: 127 IREAVGINWSVHQHHATFSPL-PNHLFMSYCSSL 160

G1862A

C1858T

Resim 6.4/1

G A T C

2. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGGTTAAATGAGTCTTTGTACTAGAGGCTGTAGCATAAAATTCGGTCTGCGCA
CCAGCACCATGCAACTTTTTCAACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTCAACCTCAC
TGTGCTGGTGGCTTGGCAT

Kodlanması beklenen aminoasitler

1 W G R R L G * M S L C T R G G C S I N S V
1 TGGGGGAGGAGATTAGGTTAAATGAGTCTTTGTACTAGAGGCTGTAGCATAAAATTCGGTC
21 C A P A P C N F F N L C L I I S C S C P
61 TGGCACCAGCACCATGCAACTTTTTCAACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCT
41 T V N L T V L V L G
121 ACTGTCAACCTCACTGTGCTGGTGGCTTGGCAT

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 1 tgggggaggagattaggttaaagtctttgtactag-aggctgtag-cataaaattcgg 58
|||||
Sorgu1741tgggggaggagattaggttaaagg--tctttgtactaggaggctgtaggcataaaatt-gg 1797

Örnek:59 tctgcgcaccagcaccatgcaactttttcaacctctgcctaatacatctcttggttcatgtc 118
|||||
S:1798 tctgcgcaccagcaccatgcaactttttca-cctctgcctaatacatctcttggttcatgcc1857

Örnek: 119 ttactgt 125
|||||
Sorgu :1858 ctactgt 1864

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 7 GCSINLVCA PAPCNFFHLCLIISCSCPTVNASKLCLG 43
GC LVC+PAPCNFFHLCLIISCSCPTV+ASKLCLG
Sorgu: 7 GCRHKLVCSPAPCNFFHLCLIISCSCPTVHASKLCLG 43

C1858T

C1856T

Resim 6.4./2

G A T C

3.Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGACTTCAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGCT
GCGCACAGCACCTGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAA
GCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGACATGGACATTG

Kodlanması beklenen aminoasitler

1 W G R R L Q I K G L C T R R L * A * I G
1 TGGGGGAGGAGACTTCAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGT
21 A A H S T C N F F T S A * S S L V H V L
61 GCTGCGCACAGCACCTGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTA
41 L F K P P S C A L G A V G T W T L
121 CTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGACATGGACATTG

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö:17 agattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtgctgcgcac-agcacc 75
|||||
S:1755agattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattggt-ctgcgcaccagcacc 1813

Ö:76 -tgcaactttttcacctctgcctaatacatctctgttcattgtcctactgttcaagcctcc 134
|||||
S:1814atgcaactttttcacctctgcctaatacatctctgttcattgtcctactgttcaagcctcc 1873

Ö: 135 aagctgtgccttgggtgcggttgggacatggacattg 171
|||||
S: 1874 aagctgtgccttgggtgcggttgggacatggacattg 1910

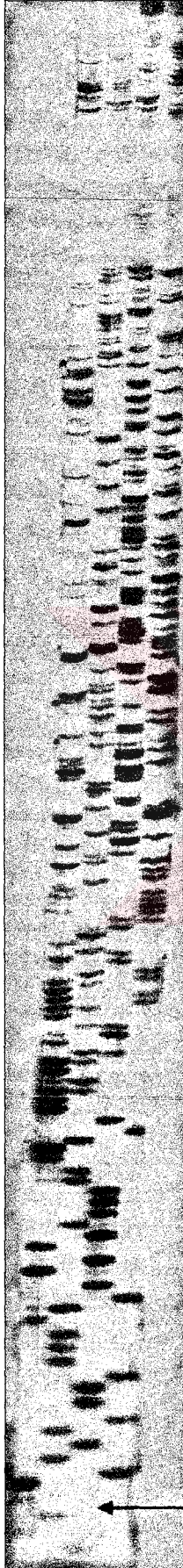
Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 75 LQLFHLCLIISCSCPTVQASKLCLGCGWMDI 170
LQLFHLCLIISCSCPTVQASKLCLG WMDI
Sorgu: 1 LQLFHLCLIISCSCPTVQASKLCLGWLWMDI 32

G1899A

Resim 6.4./3

G A T C



4.Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCG
CACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACTGTTCAAG
CCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V G I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT
21 A H Q H H A T F S P L P N H L L F M S Y
61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACT
41 C S S L Q A V P W V R L G M D I D
121 TGTTCAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö:1 tgggggaggagattagattaaaggctctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtct 60
|||||
S:1741tgggggaggagattagattaaaggctctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtct 1800

Ö:61 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgtcctac 120
|||||
S:1801gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgtcctac 1860

Ö:121 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggt-gctgttgggacatggacattgacc 172
|||||
S:1861 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggcggttggggcatggacattgacc 1913

Protein Bazında Karşılaştırma:

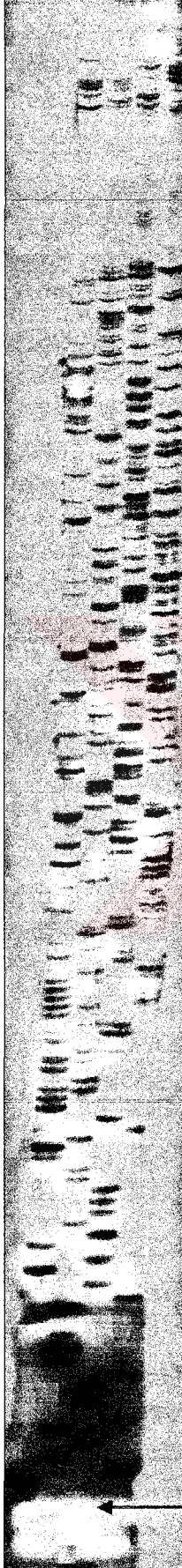
Örnek: 24 VFVLGGCRHKLVCAPAPCNFF 86
VVLGGCRHKLVCAPPCNFF
Sorgu: 2 VFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 22

Örnek: 83 FHLCLIIISCSCPTVHASKLCLGWAW 163
FHLCLIIISCSCPTVHASKLCLGW W
Sorgu: 22 FHLCLIIISCSCPTVHASKLCLGWLW 46

G1899A

Resim 6.4./4

G A T C



4.Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCG
CACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGCTCTACTGTTCAAG
CCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V G I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT
21 A H Q H H A T F S P L P N H L L F M S Y
61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGCTCTAC
41 C S S L Q A V P W V R L G M D I D
121 TGTTCAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö:1 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtct 60
|||||
S:1741tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtct 1800

Ö:61 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgtcctac 120
|||||
S:1801gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgtcctac 1860

Ö:121 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggt-gctgttgggacatggacattgacc 172
|||||
S:1861 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggcggtgggggcatggacattgacc 1913

Protein Bazında Karşılaştırma:

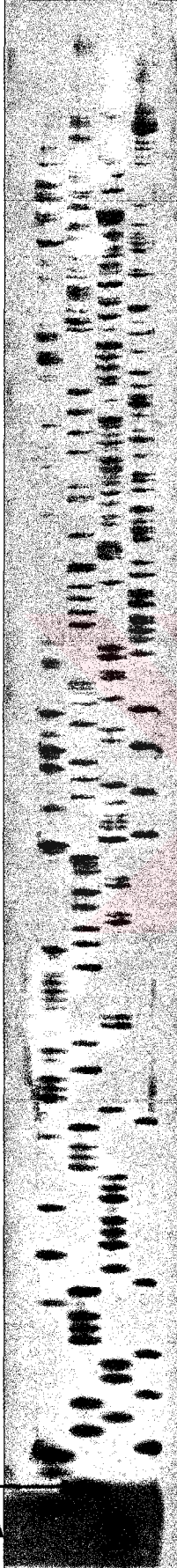
Örnek: 24 VFVLGGCRHKLVCAPAPCNFF 86
VVLGGCRHKLVCPPAPCNFF
Sorgu: 2 VFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 22

Örnek: 83 FHLCLIISCSCPTVHASKLCLGWAW 163
FHLCLIISCSCPTVHASKLCLGW W
Sorgu: 22 FHLCLIISCSCPTVHASKLCLGWLW 46

G1899A

Resim 6.4./4

G A T C



7. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCG
CACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACTGTTCAAG
CCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V G I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT
21 A H Q H H A T F S P L P N H L L F M S Y
61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACT
41 C S S L Q A V P * V R L G M D I D
121 TGTTCAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggctctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtct 60
|||||
S:1741tgggggaggagattagattaaaggctctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtct 1800

Ö: 61 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcatgtccac 120
|||||
S:1801gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcatgtccac1860

Ö: 121 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggt-gcggtaggcatggacattgacc 172
|||||
S:1861 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggccttggggcatggacattgacc 1912

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFLVGGCRHKLVCAPAPCNFF 86
GEEIRL +FVLGGCRHKLVC+PAPCNFF
Sorgu: 74 GEEIRLMIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 101

G1896A

Resim 6.4./7

G A T C

8. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGTTAATGATCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGCGTCACCA
GCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTCAAGCCTCCAAG
CTGTGCCTGGTGGCTTTGGGCATGACATTGAAATGAC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L V N D L C T R R L * A * I G A
1 TGGGGGAGGAGATTAGTTAATGATCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTGCG
21 S P A P C N F F T S A * S S H V H V L L
61 TCACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTG
41 S S L Q A V P G G F G H D I E M
121 TCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTGGTGGCTTTGGGCATGACATTGAAATGAC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö:1 tgggggaggagattag-ttaatgatctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtgc 59
|||||
S:1741 tgggggaggagattaggttaaatgatctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtct 1800

Ö: 60 gt-caccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaataatcatctcatgttcattgtccctac 118
|| |||||
S: 1801 gttcaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaataatcatctcatgttcattgtccac 1860

G1764A

A1762T

Ö: 119 tg-tcaagcctccaagctgtgcct--gggtggctttggga 154
|| |||||
S: 1861 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggctttgggg 1899

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 72 MQLFHLCLIISCSCPTVKPPS-CAWWLW 152
MQLFHLCLIISCSCPTV+ + C WLW
Sorgu: 1 MQLFHLCLIISCSCPTVQASNLCLGWLW 28

C1858T

Resim 6.4./8

G A T C



9. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGAGGCTGTAGCATAAATTGGTCTGCGCACC
AGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCAGTCCTCAGTTCAGCTCAGTTGC
GTGTGTCTGGCATGAACTGA

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * R L * H K L V C
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGAGGCTGTAGCATAAATTGGTCTGC
21 A P A P C N F F T S A * S S L V Q S S V
61 GCACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCAGTCCTCAGTT
41 Q L S C V C L A * T
121 CAGCTCAGTTGCGTGTGTCTGGCATGAACTGA

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

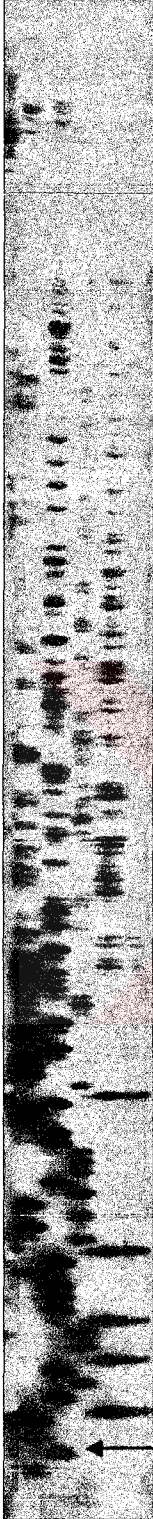
Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggctctttgtactag-aggctgtag-cataaattggtct 58
|||||
S:1744 tgggggaggagattagattaaaggctctttgtactagaggctgtaggcataaattggtct 1803
Ö: 59 gcgcaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcacatctctgta 118
|||||
S:1804 gcgcaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcacccctgta 1863
Ö: 119 ccctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggactttggaa 162
|||||
S: 1864 ccctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtgggctttggga 1907

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 47 INWSAHQHHATFSPLPNHLLFSPQFSSVACV 139
INWS HQHHATFSPLPNHL+F SS+ V
Sorgu: 133 INWSVHQHHATFSPLPNHLMFMSYCSSLQAV 163

G1899A

G A T C



10. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGCTCTTTGTACTAGAGGCTGTAGCATAAATTGGTCTGCGCACC
AGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCACTCCTCAGTTCAGCTCAGATGC
GTGTGCTGGCATGAACTGT

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * S S L Y * R L * H K L V C
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGCTCTTTGTACTAGAGGCTGTAGCATAAATTGGTCTGC
21 A P A P C N F F T S A * S S L V H S S V
61 GCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCACTCCTCAGTT
41 Q L R C V C L A * T
121 CAGCTCAGATGCGTGTGTCTGGCATGAACTGT

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaagctctttgtactag-aggctgtag-cataaattggtct 58
|||||
S: 1744 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtct 1803

Ö: 59 gcgcaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcact 112
|||||
S: 1804 gcgcaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcact 1857

Ö: 113 ccctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggccttggga 154
|||||
S: 1858 ccctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggccttggg 1899

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 46 HKLVCAAPPCNFFTS*SSLVH 111
HKLVCAAPPCNFFTS SSLVH
Sorgu: 139 HKLVCAAPPCNFFTS AKSSLVH 160

G1899A

11. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTATTAGAGCTGTACTAGAGCTGTAGCATAAATTGGT
 CTCGCACACAGCCCTGCAACTTTTTACCTCGCTAATACTCTTTTGCTAAGCCTATGAACCCTACGC
 TTGCGTGTGTCTGGCATGAACTGAATTGAAATGAC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * S C T R A V A *
 1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTATTAGAGCTGTACTAGAGCTGTAGCATAA
 21 I G L A H S P A T F Y L A N T L F A K P
 61 ATTGGTCTCGCACACAGCCCTGCAACTTTTTACCTCGCTAATACTCTTTTGCTAAGCCT
 41 M N P T L A C V W H E L N * N D
 121 ATGAACCCTACGCTTGCCTGTGTCTGGCATGAACTGAATTGAAATGAC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaagttgtttgtattaggaggctgtaggcataaattgggtct 58
 ||
 S:1741tgggggaggagattagattaaagttgtttgtattaggaggctgtaggcataaattgggtct 1800

Ö: 117 ccctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggctttgggag 160
 ||
 S: 1856 ccctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggctttgggag 1899

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFLVGGCRHKLVRAPAPCNFF TSA 95
 GEEIRLKVFLVGGCRHKLVRAPAPCNFF TSA
 Sorğu: 8 GEEIRLKVFLVGGCRHKLVRAPAPCNFF TSA 38

G A T C



12. Hastanın Nükleotid Dizisi:

CTGGGGGAGGAGCTTAGATTAAAGGTCTTTGTATTAGAGCTGTACTAGAGCTGTAGCATAAATTGG
TCTCGCACACAGCCCTGCAACTTTTACCTCGCTAATACTCTTTTGTGCTAAGCCTATGAACCTACG
CTT

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 L G E E L R L K V F V L E L Y * S C S I
1 CTGGGGGAGGAGCTTAGATTAAAGGTCTTTGTATTAGAGCTGTACTAGAGCTGTAGCATA
21 N W S R T Q P C N F L P R * Y S F C * A
61 AATTGGTCTCGCACACAGCCCTGCAACTTTTACCTCGCTAATACTCTTTTGTGCTAAGCC
41 Y E P Y A
121 TATGAACCTACGCTT

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 2 tgggggaggagcttagattaaaggtctttgtattag 37
||||||| |||||||
S: 1743 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtattag 1778

Ö: 119 tcctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggctttg 158
||||||| |||||||
S: 1858 ccctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggctttg 1897

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 47 INWSAHQHATFSPLPNHLLFSPQFSSVACL 139
INWSHQHHATFSPLPNHL+F SS+ V
Sorgu: 133 INWSVHQHHATFSPLPNHLMFMSYCSSLQAV 163

C1858T

GATC



13. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTACAGTTGTTTGTATTAGAGGCTGTAGCATAAATTGGTCTCGCGCCTG
CAACTTTTACCTCTCGCAATACTCTTTTGCTAAGCCTATGAACCCTACGCTT

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D Y S C L Y * R L * H K L V S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTACAGTTGTTTGTATTAGAGGCTGTAGCATAAATTGGTCTCG
21 R L Q L F T S R N T L L L S L * T L R
61 CGCCTGCAACTTTTACCTCTCGCAATACTCTTTTGCTAAGCCTATGAACCCTACGCTT

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattacagttgtttgtatta-gaggctgta-gcataaattggtct 58
|||||
S:1741tgggggaggagattagattaaagtgtttgtattaggaggctgtaggcataaattggtct 1800

Ö: 117 tcctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggccttgggaa 160
|||||
S: 1856 ccctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggccttgggag 1899

Protein Bazında Karşılaştırma

Örnek: 47 INWSAHQHATFSPLPNHLLFSPQFSSVACL 139
INWS HQHHATFSPLPNHL+F SS+ V
Sorgu: 133 INWSVHQHHATFSPLPNHLMFMSYCSSLQAV 163

C1856T

Resim 6.4./13

G A T C



15. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAAGATGTTAGGATGTTAAAGGTCTTTGTACTAGAGCTGTAGCATAAATTGGTCT
CGCACACAGCCCTGCAATTTTACCTCGCTAATACTCTTTTGCTAAGCCTATGAACCCTACGCT
T

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R K M L G C * R S L Y * S C S I N W
1 TGGGGGAGGAAGATGTTAGGATGTTAAAGGTCTTTGTACTAGAGCTGTAGCATAAATTGG
21 S R T Q P C N F Y L A N T L F A K P M N
61 TCTCGCACACAGCCCTGCAATTTTACCTCGCTAATACTCTTTTGCTAAGCCTATGAAC
41 P T L
121 CCTACGCTT

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 18 aggatgttaaaggctctttgtactag--agctgta-gcataaattggctct 63
|||||
S: 1752 aggaggttaaaggctctttgtactaggaggctgtaggcataaattggctct 1800

Ö: 119 tcctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggctttggaa 161
|||||
S: 1858 ccctgctgtaagcctccaagctgtgccttgggtggctttggga 1900

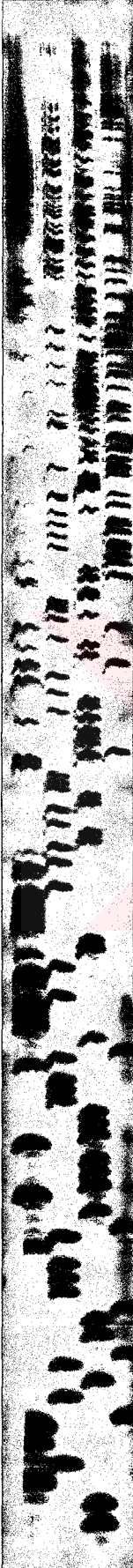
Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFVLGGCSINWSRAPAPSNFF TSA 95
GEEIRLKVFVLGGC RAPAP NFF TSA
Sorgu: 8 GEEIRLKVFVLGGCRHKLVRAPAPCNFF TSA 38

C1858T

Resim 6.4/15

G A T C



16. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTATTAGGAGGCTGTAGCATAAATTGGTCTCGCGCAC
CAGCGCCATCGAACTTTTTCACCTCTGCCTAATACCAT

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V A * I G L
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTATTAGGAGGCTGTAGCATAAATTGGTCTC
21 A H Q R H R T F S P L P N T
61 GCGCACCAGCGCCATCGAACTTTTTCACCTCTGCCTAATACCAT

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtattaggaggctgta-gcataaattggtct 59
|||||
S: 1743 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtattaggaggctgtaggcataaattggtct 1802

Ö: 60 cgcgaccagcgccatcgaaactttttcacctctgcctaatacatctctgttcatctctgta 118
|||||
S: 1803 -cgcgaccagcaccatcgaaactttttcacctctgcctaatacatctctgttccaccctgta 1863

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFLVGGCSINWSRAPAPSNFF TSA 95
GEEIRLKVFLVGGC RAPAP NFF TSA
Sorgu: 8 GEEIRLKVFLVGGCRHKLVRAPAPCNFF TSA 38

Resim 6.4/16

G A T C



19. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTATTAGGAGGCTGTAGCATAAATTGGTCTCGCGCAC
CAGCGCCATCGAACTTTTCACCTCTGCCTAATACCAT

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V A * I G L
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTATTAGGAGGCTGTAGCATAAATTGGTCTC
21 A H Q R H R T F S P L P N T
61 GCGCACCAGCGCCATCGAACTTTTCACCTCTGCCTAATACCAT

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtattaggaggctgta-gcataaattggtct 59
|||||
S: 1741 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtattaggaggctgtaggcataaattggtct 1800
Ö: 60 cgcgcaccagcgccatcgaaactttttcacctctgccta 99
|||||
S: 1801 -gcgcaccagcaccatgcaactttttcacctctgccta 1839

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFVLGGCSINWSRAPAPSNFF TSA 95
GEEIRLKVFVLGGC RAPAP NFF TSA
Sorgu: 8 GEEIRLKVFVLGGCRHKLVRAPAPCNFF TSA 38

G A T C



20. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCCTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCAC
CAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACTGTTCGAAGCCTCCA
AGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V G I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCCTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT
21 A H Q E H A T F S P L P N H L L F M S Y
61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACT
41 C S S L Q A V P W V R L G M D I D
121 TGTTCGAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggtccttgtactaggaggctgtaggcataaaattgggtct 60
|||||
S: 1743 tgggggaggagattagattaaaggtccttgtactaggaggctgtaggcataaaattgggtct 1802

Ö: 61 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgttcaga 120
|||||
S: 1803 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgttcaga 1862

Ö: 121 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggt-gcggttgggcatggacattgacc 172
|||||
S: 1863 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggccttgggcatggacattgacc 1915

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFLGGCRHKLVCAPAPCNFF 86
GEEIRL +FVLGGCRHKLVC+PAPCNFF
Sorgu: 74 GEEIRLMIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 101

C1858T

Örnek 83 FHLCLIISCSCPTVQASKLCLCGWAW 163
FHLCLIISCSCPTVQASKLCL GW W
Sorgu: 101 FHLCLIISCSCPTVQASKLCL--GWLW 125

Resim 6.4./20

21. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTGCGCAC
 CAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCA
 AGCTGTGCCTTGGGTGCGGTGGGCATGGACATTGACC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V G I N W S
 1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCT
 21 A H Q H H A T F S P L P N H L L F M S Y
 61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTAC
 41 C S S L Q A V P W V R L G M D I D
 121 TGTTCAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTGGGCATGGACATTGACC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaaattggtct 60
 |||
 S: 1743 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaaattggtct 1802

Ö: 61 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgtcctac 120
 |||
 S: 1803 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgtcctac 1862

Ö: 121 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggt-gcggtagtt 160
 |||
 S: 1863 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggccttgggt 1902

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFLVGGCRHKLVCAPAPCNFF 86
 GEEIRL +FVLGGCRHKLVC+PAPCNFF
 Sorgu: 74 GEEIRLMIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 101

Örnek: 83 FHLCLIISCSCPTVQASKLCLGCGWAW 163
 FHLCLIISCSCPTVQASKLCL GW W
 Sorgu: 101 FHLCLIISCSCPTVQASKLCL--GWLW 125

G1899A

G A T C

22. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCAC
CAGCACCATGCAACTTTTCCACCTCTGCCTAATCATCTTTTGTTCATGTCCTACTGTTCAACCCCTCCA
AGCTGTGCCTTGGGTGCGGTGGGCATGGACATTGTCC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V G I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT
21 A H Q H H A T F S P L P N H L L F M S Y
61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTCCACCTCTGCCTAATCATCTTTGTTTCATGTCCTAC
41 C S S L Q A V P W V R L G M D I A
121 TGTTCAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTGGGCATGGACATTGTCC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattgggtct 60
|||||
S: 1741 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattgggtct 1800

Ö: 61 ggcgaccagcaccatgcaacttttccacctctgcctaatacatcttttgttcattgtccctac 120
|||||
S: 1801 ggcgaccagcaccatgcaacttttccacctctgcctaatacatcttttgttcattgtccctac 1860

Ö: 121 tgttcaaccctccaagctgtgccttgggtgcggtt-ggacatggacattg 169
|||||
S: 1861 tgttcaaccctccaagctgtgccttgggtgcggttgggcatggacattg 1910

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFLVGGCRHKLVCAPAPCNFF 86
GEEIRL +FVLGGCRHKLVC+PAPCNFF
Sorgu: 74 GEEIRLMIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 101

Örnek: 83 FHLCLIISCSCPTVQASKLCLGCGWAW 163
FHLCLIISCSCPTVQASKLCL GW W
Sorgu: 101 FHLCLIISCSCPTVQASKLCL--GWLW 125

C1858T

GATC

23. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACCAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCAC
CAGCAACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTTATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTGCA
AGCTGTGCCTTGGGTGCGGTGGGCATCGACATTGACC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V G I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT
21 A H Q H H A T F S P L P N H L L F M S Y
61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTAC
41 C S S L Q A V P W V R L G M D I D
121 TGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTGGGCATGGACATTGACC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtaccaggaggctgtaggcataaattgggtct 60
|||||
S: 1741 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattgggtct 1800

Ö: 61 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgccttatcatctcttgttcatgtccac 120
|||||
S: 1801 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcatgtccac 1860

Ö: 121 tgttcaagcctgcaagctgtgccttgggtg 150
|||||
S: 1861 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtg 1890

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 24 VFVLGGCRHKLVCAPAPCNFF 86
+FVLGGCRHKLVC+PAPCNFF
Sorgu: 2 IFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 22

Örnek: 83 FHLCLIISCSCPTVQASKLCLGCGWAW 163
FHLCLIISCSCPTV ASKLCL GW W
Sorgu: 22 FHLCLIISCSCPTVHASKLCL--GWLW 46

C1858T

G A T C

24. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCAC
CAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCCCTTGTTTCATGTCCTACTGTTGAAGCCTCCA
AGCTGTGCCTTGGGTGCGGTGGGCATGGACATTGACC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V G I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT
21 A H Q H H A T F S P L P N H L L F M S Y
61 GCGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTAC
41 C S S L Q A V P W V R L G M D I D
121 TGTTCAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTGGGCATGGACATTGACC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggctctttgtactaggaggctgtaggcataaaattggtct 60
|||||
S: 1741 tgggggaggagattagattaaaggctctttgtactaggaggctgtaggcataaaattggtct 1800

Ö: 61 gcgcaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatcccttggtcatgttctac 120
|||||
S: 1801 gcgcaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttggtcatgtcccac 1860

Ö: 121 tgttgaagcctccaagctgtgccttgggt-gcggttggacatggacattgacc 172
|||||
S: 1861 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggccttggggcatggacattgacc 1913

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFLGGCRHKLVCAPAPCNFF 86
GEEIRL +FVLGGCRHKLVC+PAPCNFF
Sorgu: 74 GEEIRLMIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 101

Örnek: 83 FHLCLIISCSCPTVQASKLCLGCGWAW 163
FHLCLIISCSCPTVQASKLCL GW W
Sorgu: 101 FHLCLIISCSCPTVQASKLCL--GWLW 125

C1858T

G A T C

26. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTGCGCAC
CAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCC
AAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V G I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCT
21 A H Q H H A T F S P L P N H L L F M S Y
61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTAC
41 C S S L Q A V P W V R L G M D I D
121 TGTTCAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaaattggtct 60
|||||
S: 1743 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaaattggtct 1802

Ö: 61 gcgccaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgttctac 120
|||||
S: 1803 gcgccaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgttctac 1862

Ö: 121 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggt-gcggttgggcatggacattgacc 172
|||||
S: 1863 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggctttggggcatggacattgacc 1915

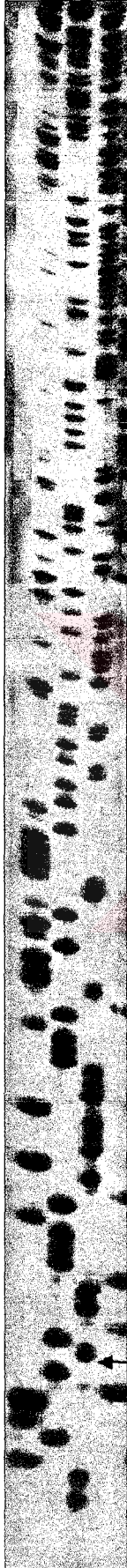
Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFLVGGCRHKLVCAPAPCNFF 86
GEEIRL +FVLGGCRHKLVC+PAPCNFF
Sorgu: 74 GEEIRLMIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 101

Örnek: 83 FHLCLIISCSCPTVQASKLCLGCGWAW 163
FHLCLIISCSCPTVQASKLCL GW W
Sorgu: 101 FHLCLIISCSCPTVQASKLCL--GWLW 125

C1858T

G A T C



27. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGTTAATGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTGCGTCACCA
GCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTCAAGCCTCCAAG
CTGTGCCTGGTGGCTTTGGGCATGACATTGAAATGACCT

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L V N G L C T R R L * A * I G A
1 TGGGGGAGGAGATTAGTTAATGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAAATTGGTGCG
21 S P A P C N F F T S A * S S L V H V L L
61 TCACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTG
41 S S L Q A V P G G F G H D I E M T
121 TCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTGGTGGCTTTGGGCATGACATTGAAATGACCT

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattag-ttaatggctctttgtactaggaggctgtaggcataaaattggtgc 59
|||
S: 1741 tgggggaggagattaggttaatgatctttgtactaggaggctgtaggcataaaattggtct 1800
|||
Ö: 60 gt-caccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcatgtcctac 118
||
S: 1801 gttcaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcatgtcccac 1860
||
Ö: 119 tg-tcaagcctccaagctgtgcct--gggtggctttggga 154
||
S: 1861 tggtcaagcctccaagctgtgccttgggtggctttggg 1899
|||

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 72 MQLFHLCLIISCSCPTVKPPS-CAWWLWA 155
MQLFHLCLIISCSCPTV+ C WLW+
Sorgu: 1 MQLFHLCLIISCSCPTVQASKLCLGWLWS 29

C1858T

Resim 6.4./27

G A T C

28. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGCTTTTGTATTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCACC
AGCAACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACTGTTTCGAGCCTCCAA
GCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACGTTGAC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V G I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGCTTTTGTATTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT
21 A H Q H H A T F S P L P N H L L F M S Y
61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTTAC
41 C S S L Q A V P W V R L G M D V D
121 TGTTTCGAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACGTTGAC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggctctttgtattaggaggctgtaggcataaaattggtct 60
|||||
S: 1741 tgggggaggagattagattaaaggctctttgtattaggaggctgtaggcataaaattggtct 1800

Ö: 61 ggcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcatgtcctac 120
|||||
S: 1801 ggcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcatgtcccac 1860

Ö: 121 taaacgagcctccaagctgtgccttgggtggctgttgggac 160
|||
S: 1861 tgaacaagcctccaagctgtgccttgggtggcggttgggggc 1900

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFLVGGCRHKLVCAPAPCNFF 86
GEEIRL +FVLGGCRHKLVC+PAPCNFF
Sorgu: 74 GEEIRLMIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 101

Örnek: 83 FHLCLIISCSCPTVRASKLCLGCGWAW 163
FHLCLIISCSCPTV+ASKLCL GW W
Sorgu: 101 FHLCLIISCSCPTVQASKLCL--GWLW 125

G1862A

C1858T

Resim 6.4./28

G A T C



29. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGGGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCTGCGCAC
CAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATTCTTGTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCA
AGCTGTGCCTTGGGTGCGGTGGCCATGGACATCGAC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * G A V G I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGGGGCTGTAGGCATAAAATTGGTCT
21 A H Q H H A T F S P L P N E F L F M S Y
61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATTCTTGTTCATGTCTTAC
41 C S S L Q A V F W V R L A M D I D
121 TGTTCAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTGGCCATGGACATCGAC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactagggggctgtaggcataaaattggtct 60
|||||
S: 1741 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactagggggctgtaggcataaaattggtct 1800

Ö: 61 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatttcttgttcattgtcctac 120
|||||
S: 1801 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatttcttgttcattgtcctac 1860

Ö: 121 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtg 150
|||||
S: 1861 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtg 1890

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFLVGGCRHKLVCAPPCNFF 86
GEEIRL +FVLGGCRHKLVC+PAPCNFF
Sorgu: 74 GEEIRLMIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 101

Örnek: 83 FHLCLIISCSCPTVQASKLCLGCGWPW 163
FHLCLIISCSCPTVQASKLCL GW W
Sorgu: 101 FHLCLIISCSCPTVQASKLCL--GWLW 125

G A T C

30. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAAGCATAAAATTGGTCTGCGCACC
AGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTTTTGTTCATGTCTACTGTTCAGCCTCCAA
GCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V S I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAAGCATAAAATTGGTCT
21 A H Q E H A T F S P L P N H L L F M S Y
61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTTTTGTTCATGTCTACT
41 C S S L Q A V P W V R L G M D I D
121 TGTTCAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaagcataaattgggtct 60
|||||
S: 1741 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattgggtct 1800

Ö: 61 ggcaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctttgttcattgtccctac 120
|||||
S: 1801 ggcaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttggttcatgtccac 1860

Ö: 121 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggt-gcggttgggcatggacattgacc 172
|||||
S: 1861 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggccttggggcatggacattgacc 1913

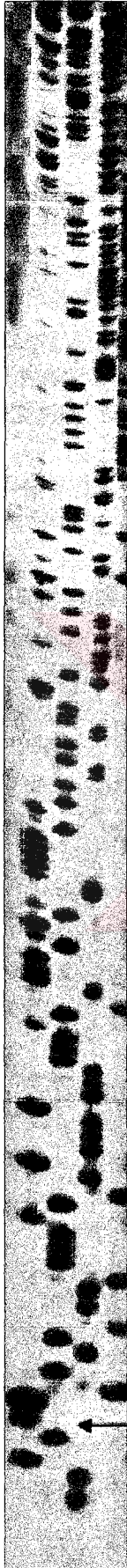
Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 GEEIRLKVFLVGGCKHKLVCAPAPCNFF 86
GEEIRL +FVLGGC+HKLVC+PAPCNFF
Sorgu: 74 GEEIRLMIFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 101

Örnek: 83 FHLCLIIFCSCPTVQASKLCLGCGWAN 163
FHLCLII CSCPTVQASKLCL GW W
Sorgu: 101 FHLCLII SCSCPTVQASKLCL--GWLW 125

C1858T

G A T C



31. Hastanın Nükleotid Dizisi:

TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCAC
CAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCA
AGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 W G R R L D * R S L Y * E A V G I N W S
1 TGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCT
21 A H Q H H A T F S P L P N H L L F M S Y
61 GCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTAC
41 C S S L Q A V P W V R L G M D I D
121 TGTTCAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGCGGTTGGGCATGGACATTGACC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Ö: 1 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtct 60
|||||
S: 1743 tgggggaggagattagattaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtct 1802

Ö: 61 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgtcctac 120
|||||
S: 1803 gcgaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatacatctcttgttcattgtcctac 1862

Ö: 121 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggcggttgacatggacattgacc 172
|||||
S: 1863 tgttcaagcctccaagctgtgccttgggtggcggttgacatggacattgacc 1915

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 83 FHLCLIISCSCPTVQASKLCLGCGWAW 163
FHLCLIISCSCPTV ASKLCL GW W
Sorgu: 22 FHLCLIISCSCPTVHASKLCL--GWLW 46

Örnek: 24 VFVLGGCRHKLVCAPAPCNFF 86
+FVLGGCRHKLVC+PAPCNFF
Sorgu: 2 IFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF 22

G1899A

Resim 6.4./2'de genotipi D olarak belirlenen 2 numaralı olgunun prekor-kor bölgesi dizi analizi sonuçları görülmektedir. Yapılan değerlendirmede 1763. nükleotitte guanin olması gerekirken timin ($G \rightarrow T$) tespit edilmiştir. 1764. ve 1828. nükleotidlerde adenin ($\rightarrow A$), 1766. nükleotitte guanin ($\rightarrow G$) ve 1794. nükleotitte sitozin insersiyonu ($\rightarrow C$) belirlenmiş, 1779. ve 1789. nükleotidlerde ise guanin delesyonu ($G \rightarrow -$) görülmüştür.

Gen bankasında yapılan karşılaştırma ile bu mutasyonların neden olduğu aminoasit değişimleri de incelenmiştir. 1764. nükleotitteki adenin insersiyonu ($\rightarrow A$) ile arginin aminoasidi kodlanması gerekirken serin aminoasidi ($R \rightarrow S$), 1766. nükleotitteki guanin insersiyonu ($\rightarrow G$) ile histidin yerine izolösin aminoasidi ($H \rightarrow I$) kodlanmaktadır. 1779. nükleotitteki guanin delesyonu ($G \rightarrow -$) ise lizin yerine asparjin ($K \rightarrow N$), 1789. nükleotitteki ise serin yerine alanin aminoasidi ($S \rightarrow A$) kodlanmasına neden olmaktadır. Bu protein değişimlerinden sadece serinin alanine dönüştüğü mutasyon sessizdir. Diğerlerinin klinik etkileri hakkında bilgi yoktur.

Resim 6.4./5'de genotipi A olarak belirlenen 5 numaralı olgunun prekor-kor bölgesi dizi analizi sonuçları görülmektedir. Yapılan değerlendirmede 1777. ve 1788. nükleotidlerde guanin ($\rightarrow G$), 1801. nükleotitte sitozin ($\rightarrow C$) ve 1818. nükleotitte de timin ($\rightarrow T$) delesyonu görülmüştür. 1807. nükleotitte ise guanin ($G \rightarrow -$) insersiyonu belirlenmiştir.

Gen bankasında yapılan karşılaştırma ile bu mutasyonların neden olduğu aminoasit değişimleri de incelenmiştir. 1801. nükleotitteki sitozin ($\rightarrow C$) delesyonu lizin yerine lösin ($K \rightarrow L$), 1788. nükleotitteki guanin ($\rightarrow G$) delesyonu serin yerine treonin ($S \rightarrow T$) ve alanin yerine lösin ($A \rightarrow L$) aminoasitlerinin kodlanmasını sağlamıştır. 1777. nükleotitteki guanin ($\rightarrow G$) delesyonu ise prolin ($P \rightarrow -$) ve sistein ($C \rightarrow -$) aminoasitlerinin kodlanmamasına neden olmuştur.

Meydana gelen aminoasit değişimlerinden sadece serinin treonine ($S \rightarrow T$) dönüştüğü mutasyon sessizdir.

Genotipleri biri A ve diğerleri D olan 31 olguda saptanan mutasyonlar ve baz değişiklikleri ile birlikte tablo 6.1'de özetlenmiştir.

19 olguda (% 61) 1858. nükleotitteki sitozinin timidine ($C \rightarrow T$), 17 olguda (% 55) Akdeniz Ülkelerinde yaygın olarak görülen 1899. nükleotitteki guaninin adenine

(G→A) dönüştüğü saptanmıştır. Sitozinin timine (C→T) değişmesiyle oluşan 1856. nükleotitteki mutasyon 5 olguda (% 16), 1862. nükleotitteki guaninin timine (G→A) dönüştüğü ise 2 olguda (% 6.4.) belirlenmiştir. 1 olguda (% 3.2) 1896. nükleotitteki guaninin adenine (G→A) dönüşmesiyle oluşan prekor stop kodon mutasyonu saptanmıştır. 1762. nükleotitteki adeninin timine (A→T) değişimi ve 1764. nükleotitteki guaninin adenine (G→A) değişimiyle belirlenen kor bölgesi mutasyonları 1 olguda (% 3.2) bulunmuştur.

Tablo 6.1’de saptanan nokta mutasyonların olgulara göre dağılımı ve Tablo 6.2’de de görülme sıklıkları belirtilmiştir.



Tablo 6.1 HBV pre kor –kor bölgesinde saptanan nokta mutasyonlar

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 1	1763 G→T	
	1765 →A	
	1766 →G	
	1779 G→-	
	1789 G→-	
	1794 →C	
	1828 →A	
	1829 →C	
	1830 C→G	
	1844 →G	
	1858 C→T	
	1862 G→A	
	1899 G→A	
Olgu 2	1763 G→T	
	1765 - →A	R→S
	1766 - →G	H→I
	1779 G→ -	K→N
	1789 G→ -	S→A
	1795 →C	
	1828 →A	
	1856 C→T	
	1858 C→T	
Olgu 3	1797 →G	
	1807 C→ -	
	1814 A→-	W→C, L→G
	1891 G→C	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 3	1892 C→G	
	1893 T→G	
	1899 G→A	
Olgu 4	1889 →G	L→A
	1892 G→T	
	1893 T→G	
	1895 G→T	
	1899 G→A	
Olgu 5	1777 →G	P→-, C→-
	1788 →G	S→T
	1801 →C	K→V
	1807 G→-	
	1818 →T	
	1858 C→T	
Olgu 6	1751 C→A	
	1801 →C	
	1811 C→-	S→-
	1812 A→-	R→-
	1813 C→-	T→-
	1814 C→-	S→-, K→-
	1815 A→-	T→-, F→-
	1817 G→C	
	1818 C→G	
	1833 →C	S→P
	1858 C→T	
	1876 G→-	C→P
	1888 G→C	C→L

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 6	1889 C→G	T→W
	1890 T→G	Q→R
	1899 G→A	
Olgu 7	1889 -→G	
	1892 T→G	
	1893 T→G	
	1895 T→G	
	1896 G→A	W→STOP
Olgu 8	1757 G→-	
	1762 A→T	
	1764 G→A	
	1799 C→G	A→P
	1800 T→C	S→P
	1803 T→-	N→S
	1858 C→T	
	1863 T→-	
	1885 T→-	
	1886 G→-	
	1899 G→A	
Olgu 9	1780 G→-	
	1790 G→-	
	1856 C→T	
	1858 C→T	
	1899 G→A	
Olgu 10	1767 G→C	
	1780 G→-	
	1790 G→-	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 10	1838 C→T	
	1899 G→A	
Olgu 11	Tüm dizi normal	
Olgu 12	1754 A→C	
	1858 C→T	
Olgu 13	1761 A→C	
	1776 G→-	
	1786 G→-	
	1856 C→T	
	1899 G→A	
Olgu 14	1752 C→A	E→G
	1776 G→-	
	1856 C→T	
Olgu 15	1756 G→T	
	1776 G→-	
	1777 A→-	
	1779 G→A	
	1786 G→-	R→S, H→I
	1858 C→T	
	1899 G→A	
Olgu 16	1788 G→-	R→S
	1803 →C	
	1814 A→G	
	1819 G→C	C→S
	1820 C→G	C→S
	1856 C→T	
	1858 C→T	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 17	1759 G→A	
	1764 A→-	
	1782 G→C	
	1802 T→C	
	1804 T→C	
	1899 G→A	
Olgu 18	1763 →T	
	1764 →T	
	1766 G→A	
	1770 →A	
	1790 G→-	
	1801 →C	
	1812 A→G	
	1817 G→C	
	1818 C→G	
	1856 C→T	
Olgu 19	1786 G→-	
	1801 →C	
	1812 A→G	
	1817 G→C	
	1817 C→G	
Olgu 20	1858 C→T	
	1892 G→-	
	1895 T→G	
	1896 T→G	
	1897 G→T	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 21	1892 G→-	
	1895 T→G	
	1896 T→G	
	1898 G→T	
	1899 G→A	
Olgu 22	1828 T→C	
	1845 C→T	
	1858 C→T	
	1868 G→C	
	1891 G→C	
	1892 C→G	
	1893 T→G	
	1896 G→-	
	1899 G→A	
Olgu 23	1774 T→C	
	1837 A→T	
	1858 C→T	
	1872 C→G	
Olgu 24	1844 T→C	
	1856 C→T	
	1858 C→T	
	1865 C→G	
	1890 G→-	
	1893 T→G	
	1894 T→G	
	1896 G→T	
	1899 G→A	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 25	1831 C→T	
	1899 G→A	
Olgu 26	1858 C→T	
	1892 G→-	
	1895 G→T	
	1896 G→T	
	1898 G→T	
Olgu 27	1757 G→-	
	1766 A→G	
	1799 C→G	
	1800 T→C	
	1803 T→-	
	1858 C→T	
	1863 T→-	
	1885 T→-	
	1886 G→-	
	1899 G→A	
Olgu 28	1858 C→T	
	1862 G→A	
	1866 A→G	
	1899 G→A	
Olgu 29	1778 A→G	
Olgu 30	1786 G→A	
	1786 G→A	
	1845 C→T	
	1858 C→T	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değisimi</u>
Olgu 30	1890 G→-	
	1893 T→G	
Olgu 31	1894 T→G	
	1895 G→T	
	1893 T→G	
	1894 T→G	
	1896 G→T	
	1899 G→A	



Tablo 6.2. HBV Pre kor- kor bölgesinde saptanan mutasyonların görülme sıklıkları

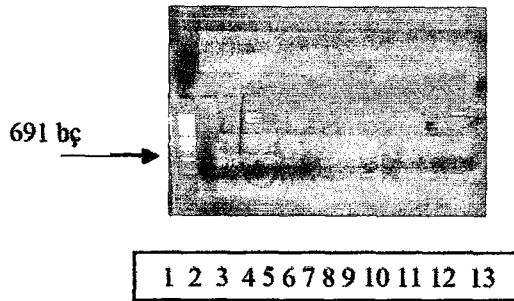
	A→C %	A→G %	A→T %	C→A %	C→G %	C→T %	G→A %	G→C %	G→T %	T→A %	T→C %	T→G %
	1.61	4.83	2.41	1.61	9.70	20.16	19.35	9.70	11.29	0	4.64	13.70
Olgu1	-	-	-	-	1	1	2	-	2	-	-	-
Olgu2	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-
Olgu3	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	1
Olgu4	-	-	-	-	-	-	2	-	2	-	-	1
Olgu5	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Olgu6	-	-	-	1	2	1	1	2	-	-	-	1
Olgu7	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	3
Olgu8	-	-	1	-	1	-	2	-	-	-	-	-
Olgu9	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-
Olgu10	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-
Olgu11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Olgu12	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Olgu13	1	-	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-
Olgu14	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
Olgu15	-	-	-	-	-	1	2	-	1	-	-	-
Olgu16	-	1	-	-	1	2	-	1	-	-	3	-
Olgu17	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-
Olgu18	-	1	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-
Olgu19	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-
Olgu20	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2
Olgu21	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	2
Olgu22	-	-	-	-	1	2	1	2	-	-	1	1
Olgu23	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	1	-

	A→C %	A→G %	A→T %	C→A %	C→G %	C→T %	G→A %	G→C %	G→T %	T→A %	T→C %	T→G %
	1.61	4.83	2.41	1.61	9.70	20.16	19.35	9.70	11.29	0	4.64	13.70
Olgu24	-	-	-	-	1	2	1	-	1	-	1	2
Olgu25	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-
Olgu26	-	-	-	-	-	1	-	-	3	-	-	-
Olgu27	-	1	-	-	1	1	1	-	-	-	1	-
Olgu28	-	1	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-
Olgu29	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Olgu30	-	-	-	-	-	2	1	-	1	-	-	2
Olgu31	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2
Toplam:	2	6	3	2	12	25	24	12	14	0	7	17

6.3. X GEN BÖLGESİNİN DİZİ ANALİZİ İLE İNCELENMESİ

Genotipleri saptanmış ve prekor-kor bölgeleri dizi analizi ile incelenmiş 50 örneğin, HBV X bölgesindeki mutasyonları dizi analizi yöntemi ile belirlenmiştir.

Bunun için örneklerle öncelikle MF24 ve MF16 primerleri ile PZR uygulanmıştır. PZR sonrası %1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenen örneklerde çok sayıda non-spesifik bant görülmüştür (Resim 6.5.1).

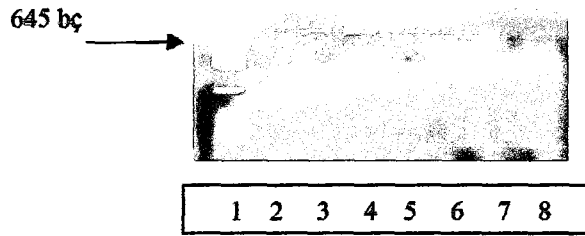


Resim 6.5.1, MF24 ve MF16 primerleri ile yapılan PZR sonucu

1.kuyu: Marker (DNA ladder), 4. ve 13. kuyu: çok sayıda non-spesifik bant bulunan PZR ürünleri.

İstenen bölgedeki bantların oldukça silik görülmesi ve non-spesifik bantların bulunması nedeniyle önce PZR programında değişiklikler yapılmış ardından yeni primerler dizayn edilmiştir.

B935 ve B936 primerleri kullanılarak yapılan yeni PZR sonucu 10 olguda istenen bölgede bant tespit edildi (Resim 6.5.2).



Resim 6.5.2. B935 ve B936 primerleri ile yapılan PZR sonucu elde edilen 645 bp lik PZR ürünü

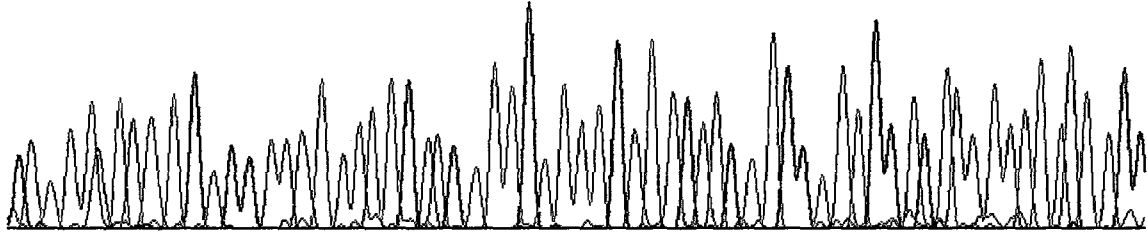
1.kuyu: Marker (DNA ladder), 2-8. kuyular: HBV X gen bölgesi amplifikasyon sonuçları

Radyoaktif madde kullanımının sınırlandırılması nedeniyle dizi analizleri otomatik dizi analizi cihazı kullanımı zorunluluğu doğmuştur. Ancak sadece 2 örneğin B935 primeri kullanılarak X gen bölgesi belirlenebilmiştir. Diğer olguların HBV DNA miktarlarının (“viral load”) az olması sebebiyle X gen bölgeleri anlaşılamamıştır.

B935 primeri ile dizi analizi yapılan olguların dizi analizi sonuçları:

X1:

10 20 30 40 50 60
GATC CATACTGC GGAAC TCTTGCAGCTTGTTTGGCTCGCAGCCGGTCTGGAGCAAAACTCATCGG



Hastanın Nükleotid Dizisi:

GATCCATACTGCGGAAC TCTTGCAGCTTGTTTGGCTCGCAGCCGGTCTGGAGCAAAACTCATCGGAACCGACAAC TC
TGTTGTCCTCTCTCGGAAATACACCTCGTTTCCATGGCTGCTCGGTTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGTGGGACGTCC
TTTGTCTACGTCCCGTCCGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGTCGCTTGGGGATCTATCGTCCCCCTTCTCC
GTCTGCCGTTCGGGCCGACCAACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCG
TGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTACATGGAGACCACCGTGAACGCCACCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACAT
AAGAGGACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCGTACTTCAAAGACTGTGTGTTAAAGACTG
GGAGGAGCNGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGTACCAG
CACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCCTAATCATCTCATGTTTCATGTTCCACTGTTCAA

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 D P Y C G T P C S L F C S Q P V W S K T
1 GATCCATACTGCGGAAC TCTTGCAGCTTGTTTGGCTCGCAGCCGGTCTGGAGCAAAACT
21 H R N R Q L C C P L S E I H L V S M A A
61 CATCGGAACCGACAAC TCTGTTGTCCTCTCTCGGAAATACACCTCGTTTCCATGGCTGCT
41 R L C C Q L D P A W D V L C L R P V G A
121 CGGTTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGTGGGACGTCCCTTTGTCTACGTCCCGTCCGCGCT
61 E S R G R P V S G S L G D L S S P S P S
181 GAATCCCGCGGACGACCCGTCTCGGGGTCGCTTGGGGATCTATCGTCCCCCTTCTCCGTCT
81 A V P A D H G A H L S L R G L P V C A F
241 GCCGTTCCGGCCGACCAACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCTCCCCGTCTGTGCCTTC
101 S S A G P C A L R F T S A R H M E T T V
301 TCATCTGCCGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTACATGGAGACCACCGTG
121 N A H Q V L P K V L H K R T L G L S A M
361 AACGCCCCACCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCAGCAATG
141 S T T D L E A Y F K D C V F K D W E E X
421 TCAACGACCGACCTTGAGGCGTACTTCAAAGACTGTGTGTTTAAAGACTGGGAGGAGCNG
161 G E E I R L K V F V L G G C R H K L V C
481 GGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGC
181 V P A P C N F F T S A L I I S C S C S T
541 GTACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCCTAATCATCTCATGTTTCATGTTCCACT
201 V Q
601 GTTCAA

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 1 gatccataactgcggaactccttgacagcttgttttgctcgcagccggtctggagcaaaact 60
|||||
Sorgu: 1263 gatccataactgcggaactccttgacagcttgttttgctcgcagccggtctggagcgaaact 1322

Örnek: 61 catcggaacccgacaactctgttgctcctctctcggaatacacctcgtttccatggctgct 120
|||||
Sorgu: 1323 catcggaacccgacaactctgttgctcctctctcgcaatacacctcgtttccatggctgct 1382

Örnek: 121 cggttgctgctgccaactggatcctgcgtgggacgtcctttgtctacgtcccgtcggcgct 180
|||
Sorgu: 1383 cggttgctgctgccaactggatcctgcgtgggacgtcctttgtctacgtcccgtcggcgct 1442

Örnek: 181 gaatcccgccggacgacccgtctcggggctcgcttggggatctatcgctcccttctccgtct 240
|||||
Sorgu: 1443 gaatcccgccggacgacccgtctcggggctcgcttggggctctacgtcccttctccgtct 1502

Örnek: 241 gccgttccggccgaccacggggcgacactctctttacgggtctcccgtctgtgccttc 300
|||||
Sorgu: 1503 gccgttccggccgaccacggggcgacactctctttacgggtctcccgtctgtgccttc 1562

Örnek: 301 tcactgtccggaccgtgtgcacttcgcttcacctctgcacgtcacatggagaccaccgtg 360
|||||
Sorgu: 1563 tcactgtccggaccgtgtgcacttcgcttcacctctgcacgtcgcatggagaccaccgtg 1622

Örnek: 361 aacgcccaccaggtcttgcccaaggtcttacataagaggactcttgactctcagcaatg 420
|||||
Sorgu: 1623 aacgccaaccaggtcttgcccaaggtcttacataagaggactcttgactctcagcactg 1682

Örnek: 421 tcaacgaccgaccttgaggcgctacttcaaagactgtgtgtttaagactgggaggagctg 480
|||||
Sorgu: 1683 tcaacgaccgaccttgaggcgctacttcaaagactgtgtgtttaagactgggaggaggtg 1742

Örnek: 481 ggggaggagattaggttaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattgggtctgc 540
|||||
Sorgu: 1743 ggggaggagattaggttaaaggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattgggtctgc 1802

Örnek: 541 gtaccagcaccatgcaactttttcacctctgcctaatcatctcatgttcatgttccact 600
|||||
Sorgu: 1803 gtaccagcaccatgcaactttttcacctctg-cctaatcatctcatgttcatgttccact 1861

Örnek: 601 gttcaa 606
|||||
Sorgu: 1862 gttcaa 1867

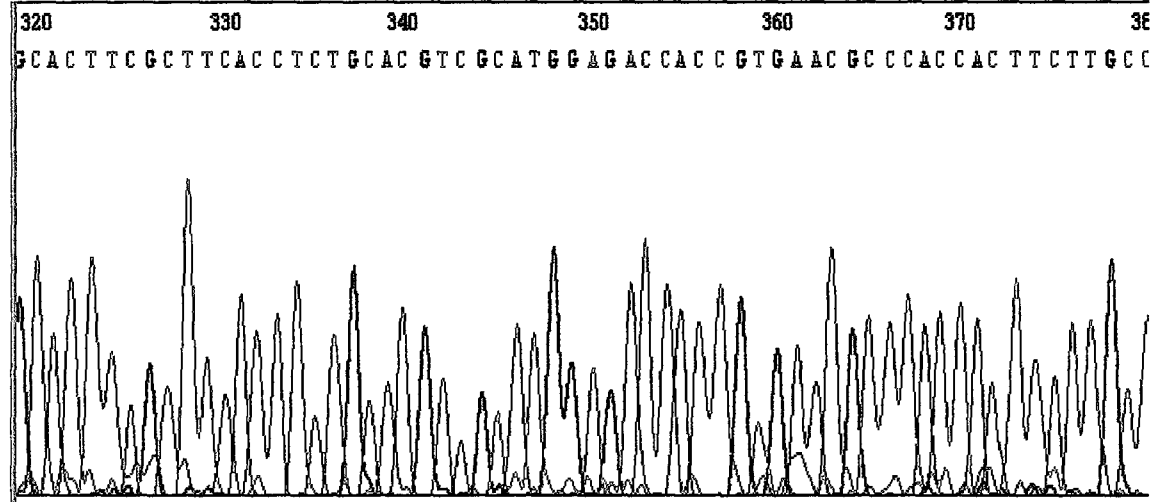
Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 112 MAARLCCQLDPADVDLCLRPVGAESRGRPVXXXXXXXXXXXXXAVPADHGAHLSLRGLPV 291
MAARLCCQLDPA DVLCLRPVGAESRGRPV AVPADHGAHLSLRGLPV
Sorgu: 1 MAARLCCQLDPADVDLCLRPVGAESRGRPVSGSLGALPSPSPSAVPADHGAHLSLRGLPV 60

Örnek: 292 CAFSSAGPCALRFTSARHMETTVNAHQVLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCVFKDW 471
CAFSSAGPCALRFTSAR METTVNA+QVLPKVLHKRTLGLSA+STTDLEAYFKDCVFKDW
Sorgu: 61 CAFSSAGPCALRFTSARRMETTVNAHQVLPKVLHKRTLGLSALSTTDLEAYFKDCVFKDW 120

Örnek: 472 EEXGEEIRLKVFLVGGCRHKLVCVPAPCNFFTS 573
EE GEEIRLKVFLVGGCRHKLVCVPAPCNFFTS
Sorgu: 121 EELGEEIRLKVFLVGGCRHKLVCVPAPCNFFTS 154

X2



Hastanın Nükleotid Dizisi:

GATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCTTGTTTTGCTCGCAGCAGGTCTGGAGCAAACATTCTCGGGACGGATAACTC
TGTTGTTCTCTCCCGCAAATATACATCGTTTCCATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCCGCGGACGTC
CTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCTTCTCGGGGCCGCTTGGGGATCTTTTCGTCCCCTTCTC
CGTTCGCCGTTTCGTCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTACGCGGACTCCCCGTCTGTGCCCTTCTCATCTGCCGGTCC
GTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTGCGATGGAGACCACCGTGAACGCCCACTTCTTGCCCAAGGTCTTACA
TAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTAAAGACTG
CGAGGAGCTGGCGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCACCAG
CACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCCACTGTTCAAGC

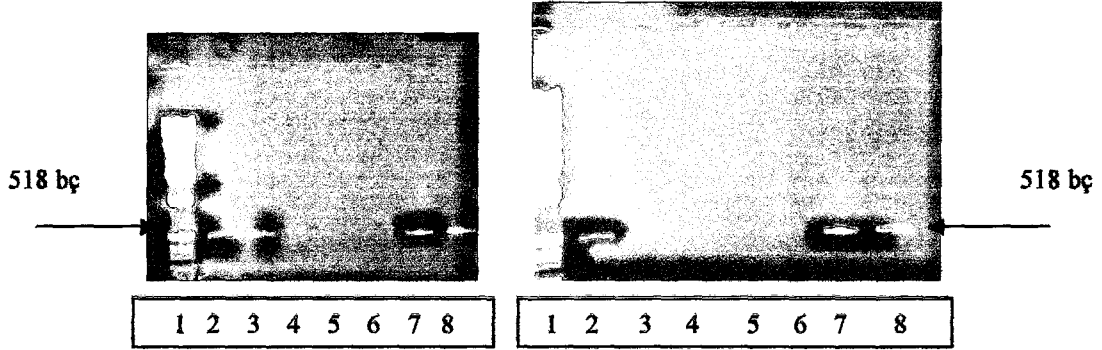
Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 D P Y C G T P S R L F C S Q Q V W S K H
1 GATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCTTGTTTTGCTCGCAGCAGGTCTGGAGCAAACAT
21 S R D G * L C C S L P Q I Y I V S M A A
61 TCTCGGGACGGATAACTCTGTTGTTCTCTCCCGCAAATATACATCGTTTCCATGGCTGCT
41 R L C C Q L D P A R D V L C L R P V G A
121 AGGCTGTGCTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCT
61 E S R G R P F S G P L G D L S S P S P S
181 GAATCCCGCGGACGACCCTTCTCGGGGCCGCTTGGGGATCTTTTCGTCCCCTTCTCCGTCT
81 A V S S D H G A H L S L R G L P V C A F
241 GCCGTTTCGTCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTACGCGGACTCCCCGTCTGTGCCCTTC
101 S S A G P C A L R F T S A R R M E T T V
301 TCATCTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTGCGATGGAGACCACCGTG
121 N A H H F L P K V L H K R T L G L S A M
361 AACGCCCACTTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGCAATG
141 S T T D L E A Y F K D C L F K D C E E L
421 TCAACGACCGACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTAAAGACTGCGAGGAGCTG
161 A E E I R L K V F V L G G C R H K L V C
481 GCGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGC
181 A P A P C N F F T L C L I I S C S C P T
541 GCACCAGCACCATGCAACTTTTTCACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCCACT
201 V Q
601 GTTCAAGC

Örnek: 1	gaccatactgcgggaactcctagccgcttgttttgcctgcagcagggtctggagcaaacat	60
Sorgu:1265	gaccatactgcgggaactcctagccgcttgttttgcctgcagcagggtctggagcaaacat	1324
Örnek: 61	tctcggggacgggataaactctgttgttctctcccgcaaatatacatcgtttccatggctgct	120
Sorgu:1325	tatcggggactgataaactctgttgtcctatcccgcgaatatacatcgtttccatggctgct	1384
Örnek: 121	aggctgtgctgccaaactggatcctgcgcggggacgtcctttgtttacgtcccgtcggcgct	180
Sorgu:1385	aggctgtgctgccaaactggatcctgcgcggggacgtcctttgtttacgtcccgtcggcgct	1444
Örnek: 181	gaatcccgcggaacgaccccttctcggggcgcttggggatctctcgtcccttctccgtct	240
Sorgu:1445	gaatcctgcggagcacccttctcggggcgcttgggactctctcgtcccttctccgtct	1504
Örnek: 241	gccgtttcgtccgacacacggggcgcacctctctttacgcggactcccgcgtctgtgccttc	300
Sorgu:1505	gccgttcgacacgacacacggggcgcacctctctttacgcggactcccgcgtctgtgccttc	1564
Örnek: 301	tcatctgcgcggtcctgtgtgcacttcgcttccacctctgcacgctcgcattggagaccacgtg	360
Sorgu:1565	tcatctgcgggacgtgtgcacttcgcttccacctctgcacgaccgtggagaccacacgtg	1624
Örnek: 361	aacgcccaccacttcttgcgccaaaggtctttacataagaggactcttggactctctgcaatg	420
Sorgu:1625	aacgcccaccattcttgcgccaaaggtctttacataagaggactcttggactctctgtaatg	1684
Örnek: 421	tcaacgaccgacaccttgaggcatacttcaaagactgtttgtttaaagactgcgaggagctg	480
Sorgu:1685	tcaacgaccgacaccttgaggcatacttcaaagactgtttgtttaaagactgggaggagttg	1744
Örnek: 481	gcgaggaggatttagattaaaggctctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtctgc	540
Sorgu:1745	ggggaggaggatttaggttaaaggctctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtctgc	1804
Örnek: 541	gcaccagcaccatgcaactttttcacccctctgcctaatcatctcttgttcatgtcccaact	600
Sorgu:1805	gcaccagcaccatgcaactttttca-cctctgcctaatcatctcttgttcatgtcctact	1863
Örnek: 601	gttcaagc	608
Sorgu:1864	gttcaagc	1871

Örnek:	1	DPYCGTSPSRLFCSQOVWSKHSRDG*LCCSLPQIYIVSMAARLCCQLDPARDVLCCLRPVGA	180
		DPYCGTSPS LFCSSQ VWS R+ LCC L +I+++SMAAR+CCQLDPARDVLCCLRPVGA	
Sorgu:	22	DPYCGTSPSSSLFCSQPVWSDTYRNRQLCCFLSEIHLLSMAARVCCQLDPARDVLCCLRPVGA	81
Örnek:	181	ESRGRXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETTV	360
		ESRGR DHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETTV	
Sorgu:	82	ESRGRPVSGFFGFLSSPSSSVVPADHGAHLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETTV	141
Örnek:	361	NAHHFLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCFLKDCEELAEIIRLKVFLVGGCRHKLVC	540
		NAH LPKVL+KRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCFLKD EEL EEIRL +FVLGGCRHKLVC	
Sorgu:	142	NAHQVLPKVLYKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCFLKDWEELGEEIRLMIFVLGGCRHKLVC	201
Örnek:	541	APAPCNFFT	567
		+APAPCNFFT	
Sorgu:	202	SPAPCNFFT	210

Dizi analizleri sonucu yeni primerler (Xbeg ve Xend) kullanılarak PZR işlemi yeniden optimize edilmiş ve Xbeg ve Xend primerleri ile örneklerin X gen bölgeleri yeniden PZR ile çoğaltılmıştır (Resim 6.5.3).



Resim 6.5.3. Xbeg ve Xend primerleri ile yapılan PZR sonucu.

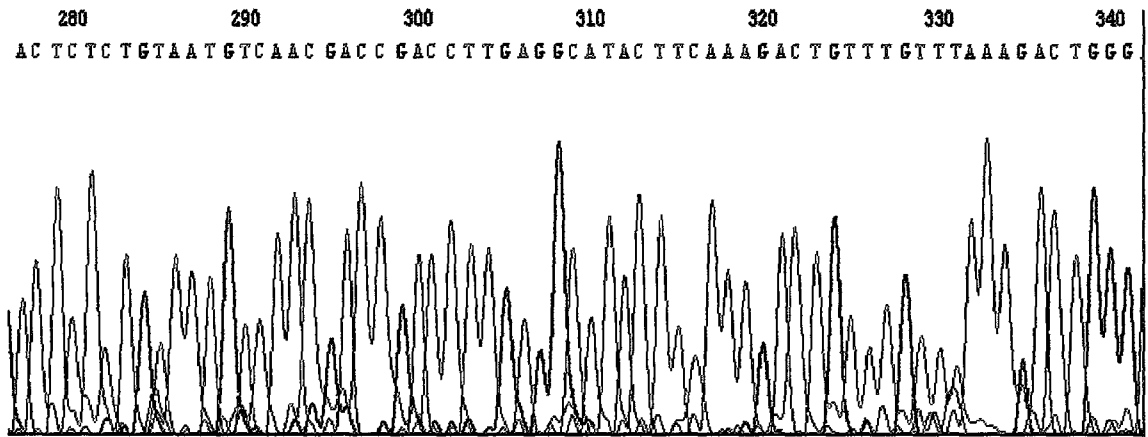
1.kuyu: Marker (1kb DNA ladder), 2-8. kuyular: 518 bp lik PZR ürünleri

Daha güçlü bantlar ve fazla DNA miktarı saptanan 10 olgunun X gen bölgelerinin dizi analizi yapılmıştır. Otomatik dizi analizi cihazında yapılan dizi analizi reaksiyonu için Xbeg (ileri) primeri kullanılmıştır.

Alınan sonuçlar Blast programı ile internet ortamında karşılaştırılmıştır. Değerlendirme hem nükleotid hem de protein düzeyinde yapılmıştır. BLAST ile karşılaştırma yaparken genotipi D olan ve en çok benzerlik bulunan HBV genomu baz alınmıştır.

Xbeg primeri ile yapılan dizi analizi sonuçları:

X3



CCACTGGATCCTGCNCGGGACGTCCTTTGTGTTACGTCCCNCTGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCTTCTCGGGGCCG
CTTGGGACCTCTCTGCTCCCTTCTCCGCTGTGCCGTTTCGACCGACACCGGGCCGACCTCTCTTTACCGCGGACCTCCC
GTCGTGCCTTCTCATCTGCGCGGACCGTGTGCACTTCGCTTACCTCTGCACGTCGCATGGAGACCAACCGGTGAACGCC
CATCAATTCTTGCCCAAGGTTTACATAAAGAGCACTCTTGGACTCTCTGTAATGTCAACAGCACCAGCTTGGAGCATAC
TTCAAAGACTGTTTGTGTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTATTNGGAGGCTG
TANGCATAAAATGGTCTGCGCACCAAGCACCATGCAACTTTTNCACCNCTGTCCTAATCATCTNAGNTCCATGNCCTCC
NCANTTTTTTAACTTCTCTCTCGNCTTTTTTCNNCTTCNTTCNINNTTNNTTCCCTCTTTTCTCTTCTTCCACTTGCT
CTTCCCTCTCTTTTCACTTCCNCTTCNCTCTTNTTCTCTCCCTCTTCTTTCTCTTCTTACTTNTCNCNCTCCTAT
CCCCCTTTGNCCTCATTTCACTTNTTTTTATATTTCNCCCTTCAANTTCCCCCCTTCCCATCNTATTGCTTAAATA
TATTTCTTCNTCNNTCTCCCCAC

1 P L D P A R D V L C L R P X G A E S R G G
1 CCACTGGATCCTGCNCGGGACGTCTTTTGTTTACGTCCCNCTCGGCGCTGAATCCCGCGGA
21 R P F S G P L G T L S S P S P S A V S T
61 CGACCCCTTCTCGGGGCCGCTTGGGACTCTCTCGTCCCCTTCTCCGTCTGCCGTTTCGACC
41 D H G A A P L F T R T P R L C L L I C R
121 GACCACGGGGCCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCCGTCTGTGCCCTTCTCATCTGCCGG
61 T V C T S L H L C T S H G D H R E R P S
181 ACCGTGTGCACCTTCGCTTACCTCTGCACGTGCGATGGAGACCACCGTGAACGCCCATCA
81 I L A Q G L T * E D S W T L C N V N D R
241 ATTCTTGCCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGTAATGTCAACGACCGA
101 P * G I L Q R L F V * R L G G V G G G D
301 CCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGAT
121 * I K G L C I X R L X A * I G L R T S T
361 TAGATTAAAGGTCTTTGTATTNGGAGGCTGTANGCATAAAATTGGTCTGCGCACCAGCACC
141 M Q L X H X L P N H L X S M X P X X F Y
421 ATGCAACTTTTNCACCNCTCTGCCTAATCATCTNAGNTCCATGNCCCCCNCAANTTTTTTAC
161 F L L X X F X X S F X X X S P L F P F F
481 TTTCTCCTCGNCNTTTTTTCNNCNTTTCNTNNTTNNNTTCCCCTCTTTTTTCCTTCTTC
181 H L P L P S L F T L P F X S X S S P L L
541 CACTTGCCCTCTTCCCTCTCTTTTACCCTTCCNTTTCNCTCTTNTTCCCTCCCCCTCTTCTT
201 S F F S Y X S X L L S P F X L I P L X F
601 TCCTTCTTTTCTTACTTNTCNCNCCTCCTATCCCCCTTTTGNCTCATTCCACTTNTTTT
221 Y I S X L Q X P P L P I X L L K I Y F F
661 TATATTTCCNCCCCTTCAANTTCCCCCCTTCCCATCNTATTGCTTAAAAATATATTCTTC
241 L P
721 TCTCCCCA

[illegible]

Örnek: 243 tcttgcccaaggtcttacataagaggactcttggactctctgtaatgtcaacgaccgacc 302
 |||||
 Sorğu: 1636 tcttgcccaaggtcttacataagaggactcttggactctctgtaatgtcaacgaccgacc 1695

Örnek: 303 ttgaggcataacttcaaaagactgtttgttttaaagactgggaggagttggggaggagatta 362
 |||||
 Sorğu: 1696 ttgaggcataacttcaaaagactgtttgttttaaagactgggaggagttggggaggagatta 1755

Örnek: 363 gaataaaggtctttgtattatgaggctgtangcataaattggtctgcgcaccagcaccat 422
 || |||||
 Sorğu: 1756 gagtaaaaggtgtttgtatcaagaggctgtaggcataaattggtctgcgcaccagcaccat 1815

Örnek: 423 gcaactttttccacntctgcctaatacat 450
 |||||
 Sorğu: 1816 gcaactttttcacc-tctgcctaatacat 1842

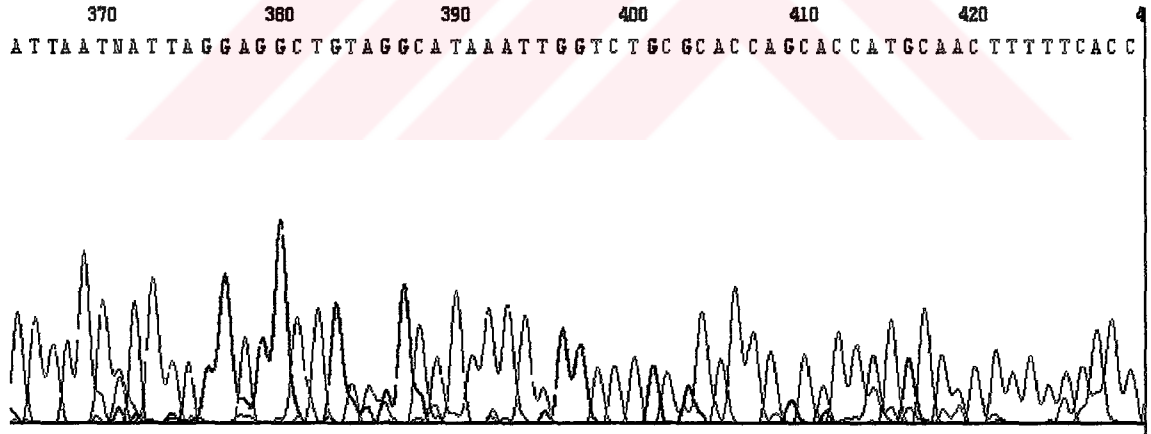
Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 134 HLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETTVNAHQFLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAY 313
 HLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETTVNAHQFLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAY
 Sorğu: 52 HLSLRGLPVCAFSSAGPCALRFTSARRMETTVNAHQFLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAY 111

Örnek: 314 FKDCFLKDWEELGEEIRLKVFXVGGCXHKLVCAPAPCNFXT 436
 FKDCFLKDWEELGEEIRLKVFXV GGC HKLVCAPAPCNF T
 Sorğu: 112 FKDCFLKDWEELGEEIRLKVFXVGGCRHKLVCAPAPCNFFT 152

Örnek: 4 LDPARDVLCRLPXGAESRGRXXXXXXXXXXXXXXXXXAVSTDHGA 132
 LDPARDVLCRLP GAESRGR AVSTDHGA
 Sorğu: 9 LDPARDVLCRLPXGAESRGRPFSGPLGTLSSPSPSAVSTDHGA 51

X4



Hastanın Nükleotid Dizisi:

TCCNACTGGATCCTACGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTTCTCGGGGC
 CGCTTGGGACTCTATCGTCCCTTNTCCGTCTGCCGTTNCGACCGACCGGGGGCGACCTCTCTTTACGCGGACTCC
 CCGTCTGTGCTTCTCATCTGCCGACCGGTGTGCACTTGGCTTCACTCTGCACTGTCATGGAGACCACTGGAACG
 CCCATCCATTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCAT
 ACTTCAAAGACTGTTTGTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGATTAAATNATTAGGAGGCTGTAGGCA
 TAAATTGCTCTGCGCACCAGCACCATGCAAC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 S X W I L R G T S F V Y V P S A L N P A
1 TCCNACTGGATCCTACGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCG
21 D D P S R G R L G L Y R P L X R L P X R
61 GACGACCCTTCTCGGGGCCGCTTGGGACTCTATCGTCCCCTTNTCCGTCTGCCGTTNCGA
41 P T T G R T S L Y A D S P S V P S H L P
121 CCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCG
61 D R V H F A S P L H V X W R P P * T P I
181 GACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTNCATGGAGACCACCGTGAACGCCCATC
81 H S C P R S Y I R G L L D S L Q C Q R P
241 CATTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGCAATGTCAACGACCG
101 T L R H T S K T V C L K T G R S W G R R
301 ACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGA
121 L D * X L G G C R H K L V C A P A P C N
361 TTAGATTAATNATTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATGCAAC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 5 actggatcctgcgccccggcgctcctttgtttacgtcccgctggcgctgaatcccggcggaag 64
|||||
Sorgu: 1399 actggatcctgcgccccggcgctcctttgtttacgtcccgctggcgctgaatcccggcggaag 1458
Örnek: 65 acccttctcggggcccgcttgggacccctcgtcccccctttccgtctgctgtttcgacaga 124
|||||
Sorgu: 1459 acccttctcgggtccgcttgggactctctcgtcccccctctccgtctgcccgtttcgacgga 1518
Örnek: 125 ccacggggcgccacccctctctttatgcgtactcccgctctgtgccttctcatctgcccgaac 184
|||||
Sorgu: 1519 ccacggggcgccacccctctctttacgagaactcccgctctgtgccttctcatctgcccgaac 1578
Örnek: 185 gtgtgcacttcgcttcacccctctgcacgtcncatggagaccacgctgaacggccaccaatt 244
|||||
Sorgu: 1579 gtgtgcacttcgcttcacccctctgcacgtcgcctggagaccacgctgaacggccaccaatt 1638
Örnek: 245 cttgccccaaaggtctttacataagaggactcttgggactctctgttaagtcaacgaccgacct 304
|||||
Sorgu: 1639 cttgccccaaaggtctttacataagaggactcttgggactctctgttaagtcaacgaccgacct 1698
Örnek: 305 tgaggcataacttcaaagactgtttgttttaagactgggaggagtggggggaggatattag 364
|||||
Sorgu: 1699 tgaggcataacttcaaagactgtttgttttaagactgggaggagtggggggaggacattgg 1758
Örnek: 365 attaatgat-----taggaggtctgtaggcataaattggtctgcgcaccagcaccatg 416
|||||
Sorgu: 1759 attaatgatctttgtactaggaggtctgtaggcataaattggtctgcgcaccagcaccatg 1818
Örnek: 417 caac 420
||||
Sorgu: 1819 caac 1822

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 6 LDPTRDVLCLRPVGAESRGRPFSGPLGLTSSPFSAXVTDHGAHLSLRGLPVCAFSSAGP 185
LDP RDVLCLRPVGAESRGRPFSGPLGLTSSP PSAX TDHGAHLSLRGLPVCAFSSAGP
Sorgu: 9 LDPARDVLCLRPVGAESRGRPFSGPLGLTSSPFSAXVTDHGAHLSLRGLPVCAFSSAGP 68

Örnek: 124 cgaccacggggcgccacctctctttaccgaggactccttgccctgtgcctt 172
 |||||
 Sorğu: 1514 cgaccacggggcgccacctctctttacc-gcgggtctcccgctctgtgcctt 1561

Örnek: 212 tgcacgtcctatggagaccacggtgaacgcccatcaattcttgcccaaggctcttacataa 271
 |||||
 Sorğu: 1598 tgcacgtcctatggagaccacggtgaacgcccatcaattcttgcccaaggctcttacataa 1657

Örnek: 272 gaggactcttgactctctgtaatgtcaacgacgaccttgaggcatactttaagactg 331
 |||||
 Sorğu: 1658 gaggactcttgactctctgtaatgtcaacgacgaccttgaggcatactttaagactg 1717

Örnek: 332 tttgttttaaacactgggaggagttgggggaggagattagattaaaggtctt 382
 |||||
 Sorğu: 1718 tttgttttaaacactgggaggagttgggggaggagattagattaaaggtctt 1768

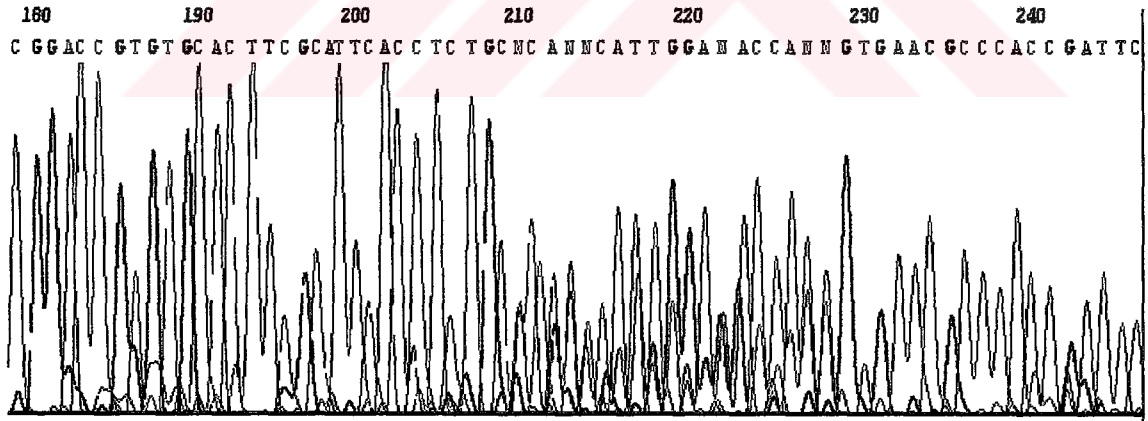
Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 5 QLDPARDVLCRLXGAESRGRXXXXXXXXXXXXXAVSTDHGAHLSLXRTF 160
 QLDPARDVLCRLR +GAES GR VSTDHGAHLSL P
 Sorğu: 8 QLDPARDVLCRLRPVGAESHGRPFSGSLGALSSPSFSTVSTDHGAHLSLRGLP 59

Örnek: 213 ARPMETTVAHQFLPKVLHKRTLGLSXMSTTDLEAYXKDCFLKXWHEELGEEIRLKVXLG 392
 AR METTVNAHQFLPKVLHKRTLGLS MSTTDLEAY KDCLFK WEELGEEIRLKV LG
 Sorğu: 76 ARPMETTVAHQFLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCFLKDWHEELGEEIRLKV FVLG 135

Örnek: 393 GXTHKXDCPP 422
 G HK C P
 Sorğu: 136 GCRHKLVCA 145

X6



Hastanın Nükleotid Dizisi:

TCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTTCTNNGGGT
 CGCTTGGGACTCTCTCGTCCCTTCTCCGTCTGCCGTTTCGACCGACACGCGGGCGCACCTCTCTTACGCGGACTCCC
 CGTCTGTGCCCTTCTCATCTGCCGACCGGTGTGCACTTCGCATTACCTCTGCNCANNCATTGGANACCANNGTGAACG
 CCAACCGATTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGTAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCAT
 ACTTCAAAGACTGTTTGTCAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTATTGGGAGGC
 TGNANGCANAAATNGGNTGCCACCAACNNNTACAACCTTTTCANCNCTGCCTAANCANGTATAGTGGATGCCCC
 CCCCNNCNC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 S N W I L R G T S F V Y V P S A L N P A
1 TCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCG
21 D D P S X G R L G L S R P L L R L P F R
61 GACGACCCCTTCTNCGGCTCGCTTGGGACTCTCTCGTCCCCCTTCTCCGTCTGCCGTTTCGA
41 P T T G R T S L Y A D S P S V P S H L P
121 CCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCG
61 D R V H F A F T S A X X L X T X V N A H
181 GACCGTGTGCACTTCGCATTACCTCTGCNCANNCATTGGANACCANNGTGAACGCCAC
81 R F L P K V L H K R T L G L S V M S T T
241 CGATTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGTAATGTCAACGACC
101 D L E A Y F K D C L F K D W E E L G E E
301 GACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTTCAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAG
121 I R L K V F V L G G X X X K X X C P P T
361 ATTAGATTAAAGGTCTTTGTATTGGGAGGCTGNANGCANAAATNGGNC'TGCCACCAACN
141 X Y N F F X X A * X X I V D A P P
421 NNNTACAACTTTTTCANCNCTGCCTAANCANGTATAGTGGATGCCCCCCCC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 2 ccaactggatcctgcgcgggacgtcctttgtttacgtcccgctggcgctgaatcccgagg 61
|||||
Sorgu: 1394 ccaactggatcctgcgcgggacgtcctttgtttacgtcccgctggcgctgaatcccgagg 1453
Örnek: 62 acgacccttcttggggacgcttgggaactctctcgctcccttctccgctggcgcttctcgac 121
|||||
Sorgu: 1454 acgacccttctcggggcgcttggggactctctcgctcccttctccgctcagcgcttctcgac 1513
Örnek: 122 cgaccacggggcgacacctctctttacgcggaactcccgctctgtgccttctcctctgcccgg 181
|||||
Sorgu: 1514 cgaccacggggcgacacctctctttacgcggaactcccgctctgtgccttctcctctgcccgg 1573
Örnek: 182 accgtgtgcacttctgcattcacctctgencanteattggaaaccanngtgaacgcccacc 241
|||||
Sorgu: 1574 accgtgtgcacttctgc-ttcacctctgcacgtcgcatggagaccacgctgaacgcccacc 1632
Örnek: 242 gattcttgcaccaaggtcttacataagaggactcttggactctctgtaatgtcaacgaccg 301
|||||
Sorgu: 1633 gattcttgcaccaaggtcttacataagaggactcttggactctctgcaatgtcaacgaccg 1692
Örnek: 302 accttgaggcatacttcaaaggctgtttgtttaaagactgggaggagtgggggaggaga 361
|||||
Sorgu: 1693 accttgaggcatacttcaaaggctgtttgtttaaagactgggaggagtgggggaggaga 1752
Örnek: 362 ttagattaaaggctcttctgtattgggaggtcgnacgcaaaaathggncctcccaccacca 421
|||||
Sorgu: 1753 ttaggttaaaggctcttctgtactaggaggctgtaggcagaaattgggcttcgacccagcgg 1812
Örnek: 422 nttacaaactttttcanctctgcctaa 447
|
Sorgu: 1813 cctgcaactttttcacccctgcctaa 1838

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 QLDPAADVLCRLPVGAE SRGRPFXXXXXXXXXXXXXAVSTDHGAHLSLRGLPVC AFSSAG 182
QLDPAADVLCRLPVGAE SRGRPF AVSTDHGAHLSLRGLPVC AFSSAG
Sorgu: 8 QLDPAADVLCRLPVGAE SRGRPFSGFLGLTSSPSFSAVSTDHGAHLSLRGLPVC AFSSAG 67
Örnek: 183 PCALR 197
PCALR
Sorgu: 68 PCALR 72
Örnek: 199 FTSAXXIXTXVNAHRFLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAYFKDCLFKDWEE LGEEIRLKV F 378
FTSA + T VNAH+FLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAYFKDCLFKDWEE LGEEIRLKV F
Sorgu: 73 FTSARRMETTVNAHQFLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAYFKDCLFKDWEE LGEEIRLKL F 132

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 X Q L D P A R D V L C L R P V G A E S R
1 TANCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCCTTGTCTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGC
21 G R P V X G X L G D L S S P S P S A V P
61 GGACGACCCGTCTNGGGGTNGCTTGGGGATCTATCGTCCCCTTCTCCGTCTGCCGTTCCG
41 A D H G A H L X L L Q V S P S V P S X M
121 GCCGACCACGGGGCGCACCTNTNTTACTGCAGGTCTCCCCGTCTGTGCCTTCTNATATG
61 P D Q C A L X L H L C T S X G D H X E R
181 CCGGACCAGTGTGCACTTCNCCTTCACCTCTGCACGTCNNATGGAGACCACNTGAACGC
81 P P G L A Q G L I * E D S W T L S N V N
241 CCACCAGGTCTTGCCCAAGGTCTTATATAAGAGGACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAAC
101 H R P * G V L X R L C X * R L G G V G G
301 CACCGACCTTGAGGCGTNCTTNAAAGACTGTGTGNATAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGA
121 P X X X X X X N S X X T X Q K Q X T S R
361 CCCNNNNNCNNCTCNTNCNTNNAATTANCGNNGACGGNACAAAAACAAANGACGTCCCGN
141 X X S X X T X P G V H A P P P P P D G
421 NCNNGATCCANTNCNACCNCACCCGGGGTTCATGCCCCCCCCCCCCCCCCCTGACCCC
161 P D G E N P F
481 CCTGACCCGGGGAAAATCCCTTCC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 4 caactggatcctgcgcggggacgtcccttggctctacgtcccgctcggcgctgaatcccgcgga 63
|||||
Sorgu: 1268 caactggatcctgcgcggggacgtcccttggctctacgtcccgctcggcgctgaatcccgcgga 1327
Örnek: 64 cgaccctgtcttgggggtctcttgggggatctatcgtcccttctctcgtctctgcccgttccggcc 123
|||||
Sorgu: 1328 cgaccctgtctcggggcggtttggggctctatcgtcccttctctcgtctctgcccgttccggcc 1387
Örnek: 124 gaccacggggcgccaccttttttctactgcaggtctctcccgctctgctgcccctctgatttgcgg 183
|||||
Sorgu: 1388 gaccacggggcgccacctctcttttac-gc-ggtctcccgctctgtgaccttctcatctgcgg 1445
Örnek: 184 gaccagtgctgcacttcccccttcacctctgcacgtccaatggagaccaccatgaaacggcca 243
|||||
Sorgu: 1446 gacc-gtgtgcacttctgc-ttcacctctgcacgtcgaatggagaccaccgtgaaacggcca 1503
Örnek: 244 ccaggctcttggcccaagggtcttataataagaggactcttgggactctcagcaatgtcaaccac 303
|||||
Sorgu: 1504 ccaggctcttggcccaagggtcttataataagaggactcttgggactctcagcaatgtcaaccac 1563
Örnek: 304 cgaccttgaggcgtgcttataaaagactgtgtgcataaaagactggggagggttggggga 360
|||||
Sorgu: 1564 cgaccttgaggcatacttcaaaagactgtgttataaaagactggggagggttggggga 1620

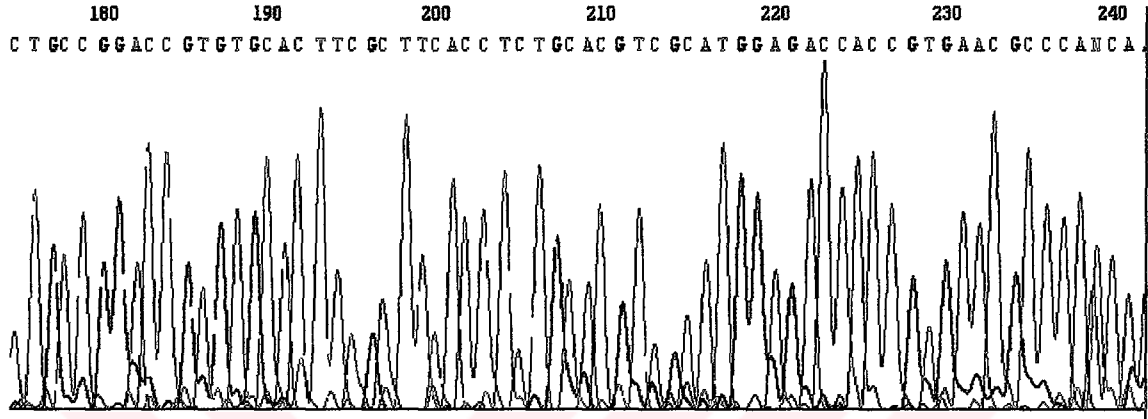
Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 4 QLDPARDVLCRLPVGAE\$RGRPVXGLGDLXXXXXAVPADHGAHLXL 147
QLDPARDVLCRLPVGAE\$RGRPV G G L AVPADHGAHL L
Sorgu: 64 QLDPARDVLCRLPVGAE\$RGRPVSGPFGSLPSFSSSAVPADHGAHL 111

Örnek: 132 GAPXFTAGLPVCAFYAGP 188
GA GLPVCAF AGP
Sorgu: 106 GAHLSLRGLPVCAFSSAGP 124

Örnek: 203 FTSARXMETTXNAHQVLPKVLYKRTLGLSAMSTTDLEAXXKDCVXKDWEELGDPXXL 373
FTSAR METT NAHQVLPKVLYKRTLGLSAMSTTDLEA KDC+ KDWEELG+ L
Sorgu: 129 FTSARMETTVNAHQVLPKVLYKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLFKDWEELGEETRL 185

X9



Hastanın Nükleotid Dizisi:

TCCAAC TGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCNTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTTCTNNGGGGN
CGCTTGGGACTCTCTCGTCCCCCTTCTCGTCTGCCGTTTCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCC
CGTCTGTGCCTTENCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTCGCATGGAGACCACCGTGAACGC
CCANCAATTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGTAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATA
CTTCAAAGACTGTTTGTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTATTNGGAGGCT
GTAGGCATAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTANGGGNNCATGG

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 S N W I L R G T S F V Y V P S A L N P A
1 TCCAAC TGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCNTCGGCGCTGAATCCCGCG
21 D D P S X G R L G L S R P L L R L P F R
61 GACGACCCCTTCTNNGGGNCGCTTGGGACTCTCTCGTCCCCCTTCTCCGTCTGCCGTTTCGA
41 P T T G R T S L Y A D S P S V P S H L P
121 CCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCCGTCTGTGCCTTNCATCTGCCG
61 D R V H F A S P L H V A W R P P * T P X
181 GACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTCGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCANC
81 N S C P R S Y I R G L L D S L * C Q R P
241 AATTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGTAATGTCAACGACCG
101 T L R H T S K T V C L K T G R S W G R R
301 ACCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGA
121 L D * R S L Y X E A V G I N W S A H Q H
361 TTAGATTAAAGGTCTTTGTATTNGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCACCAGCAC
141 H A T F S P L P N H L H
421 CATGCAACTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTATGG

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 2 ccaactggatcctgcgcgggacgctcctttgtttacgtccctcgggcgctgaatcccgcg 61
|||||
Sorgu: 1394 ccaactggatcctgcgcgggacgctcctttgtttacgtccctcgggcgctgaatcctgcy 1453

Örnek: 62 acgacccttcttgggggcgcttgggaactctctcgtecccttctcctgtctgcggttcgac 121
 |||||
 Sorğu: 1454 acgacccttctcggggcgcttgggaactctctcgtecccttctcctgtctgcggttcgac 1513

Örnek: 122 cgaccacggggcgacacctctctttacgcggactccccgtctgtgccttcccatctgcgg 181
 |||||
 Sorğu: 1514 cgaccacggggcgacacctctctttacgcggactccccgtctgtgccttctcctatctgcgg 1573

Örnek: 182 accgtgtgcacttcgcttcacctctgcacgtcggaatggagaccaccgtgaacgcctcg 241
 |||||
 Sorğu: 1574 accgtgtgcacttcgcttcacctctgcacgtcggaatggagaccaccgtgaacgcctcg 1633

Örnek: 242 attcttgcccaaggctttacataagaggactcttggactctctgtaatgtcaacgaccga 301
 |||||
 Sorğu: 1634 attcttgcccaaggctttacataagaggactcttggactctctgtaatgtcaacgaccga 1693

Örnek: 302 ccttgaggcatacttcaaagactgtttgtttaagactgggaggagtgggggaggagat 361
 |||||
 Sorğu: 1694 ccttgaggcatacttcaaagactgtttgtttaagactgggaggagtgggggaggagat 1753

Örnek: 362 tagattaaaggctctttgtatttggaggctgtaggcataaattggtctgcgcaccagcacc 421
 |||||
 Sorğu: 1754 tagattaaaggctctttgtactaggaggctgtaggcataaattggtctgcgcaccagcacc 1813

Örnek: 422 atgcaactttttcacctctgcctaatacatct 452
 |||||
 Sorğu: 1814 atgcaactttttcacctctgcctaatacatct 1844

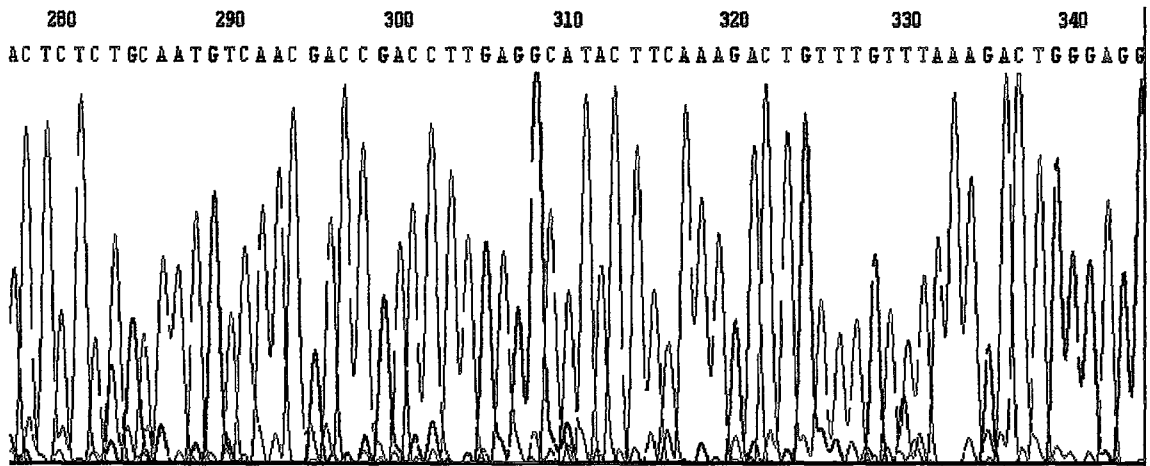
Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 QLDPARDVLCRLPXGAESRGRPFXXGLGTLXXXXXAVSTDHGAHLSLRGLPVCAFXSAG 182
 QLDPARDVLCRLP GAESRGRPF G LGTL AVS+DHGAHLSLRGLPVCAF SAG
 Sorğu: 8 QLDPARDVLCRLPVGAESRGRPFSGPLGTLSSPSPSAVSSDHGAHLSLRGLPVCAFSSAG 67

Örnek: 183 PCALRFTSARRMETTVNAXQFLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAYFKDCLFKDWHEELGEEI 362
 PCALRFTSARRMETTVNA QFLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAYFKDCLFKDWHEELGEEI
 Sorğu: 68 PCALRFTSARRMETTVNAHQFLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAYFKDCLFKDWHEELGEEI 127

Örnek: 363 RLKVFVXGGCRHKLVCAPAPCNFF TSA 443
 RLKVFV GCCRHKLVCAPAPCNFF TSA
 Sorğu: 128 RLKVFVLGGCRHKLVCAPAPCNFF TSA 154

X10



Hastanın Nükleotid Dizisi:

CCACTGGATCCTNCGTGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCCTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCTTCTNNGGGGCCG
CTTGGGACTCTATCGTCCCCTTNTCCGTCTGCCGTTCGACCGACCAACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCC
GTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGGTGTGCACTTCGCTTACCTCTGCACGTCNCATGGAGACCACCGTGAACGC
CCATCCATTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATA
CTTCAAAGACTGTTTGTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGATTAAATNATTAGGAGGCTGTANGCAT
AAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATGCAACTTTTACCTCTGCCTAATCATCTAAGGNTCATGGG

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 P L D P K W D V L C L R P V G A E S R G
1 CCACTGGATCCTNCGTGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCCTCGGCGCTGAATCCCGCGGA
21 R P F X G P L G T L S S P X P S A V X T
61 CGACCTTCTNNGGGCCGCTTGGGACTCTATCGTCCCCTTNTCCGTCTGCCGTTCGAC
41 D H G A H L S L R G L P V C A F S S A G
121 GACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGA
61 P V C T S L H L C T S H G D H R E R P S
181 CCNGTGTGCACTTCGCTTACCTCTGCACGTCNCATGGAGACCACCGTGAACGCCCATCC
81 I L A Q G L T * E D S W T L C N V N D R
241 ATTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGCAATGTCAACGACCGA
101 P * G I L Q R L F V * R L G G V G G G D
301 CCTTGAGGCATACTTCAAAGACTGTTTGTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGAT
121 * I N X * E A V X I N W S A H Q H H A T
361 TAGATTAAATNATTAGGAGGCTGTANGCATAAAATTGGTCTGCGCACCAGCACCATGCAACT
141 F S P L P N H L R M
421 TTTTACCTCTGCCTAATCATCTAAGCATGGG

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 3 actggatcctccgctgggacgtcctttgtttacgtcccgtcggcgctgaatcccgcggaag 62
Sorgu: 1399 actggatcctcgcgggacgtcctttgtttacgtcccgtcggcgctgaatcccgcggaag 1458
Örnek: 63 acccttctnngggccgcttgggactctatcgctccccttttcggtctgcccgttcggaccga 122
Sorgu: 1459 acccttctcggggtcgcttggggctctctcgctccccttctccgtctaccgttttcgaccga 1518
Örnek: 123 ccacggggcgcaacctctctttacgcggaactcccgtctgtgccttctcatctgcccgaacc 182
Sorgu: 1519 ccacggggcgcaacctctctttacgcggaactcccgtctgtgccttctcatctgcccgaacc 1578
Örnek: 183 ngtgtgcacttcgcttcacctctgcacgtcccattggagaccacccgtgaacgcccattccat 242
Sorgu: 1579 -gtgtgcacttcgcttcacctctgcacgtcgcatggagaccacccgtgaacgcccattccat 1637
Örnek: 243 tcttgcaccaaggtcttacataagaggactcttggactctctgtaattgtcaacgaccgacc 302
Sorgu: 1638 tcttgcaccaaggtcttacataagaggactcttggactctctgtaattgtcaacgaccgacc 1697
Örnek: 303 ttgaggcatacttcaaagactgtttgttcaaggactgggaggagtcggggaggagattta 362
Sorgu: 1698 ttgaggcatacttcaaagactgtttgttcaaggactgggaggagtcggggaggagattta 1757

181 CCAGACCTNGTNCACCATNNCTTNACCTNTGCACGTCNNATGGAGACCACCGTGAACGCC
81 H Q F L P K V L H K R T L G L S X M S T
241 CATCAATTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGNAATGTCAACG
101 T D L E A Y X K D C L F K X W E E L G E
301 ACCGACCTTGAGGCATACTTNAAGACTGTTTGTTTAAANACTGGGAGGAGTTGGGGGAG
121 E I R L K V F V L G G X T H K P P P F T
361 GAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTATTAGGAGGCTGNACGCATAAATGGCTCCCACCAACC
141 T P X N F X T S A * * C V F F L P F L
421 ACCCATCAACTTTTTNACCTCTGCCTAATAATGTNAGTTTTTTTTTCTCCCTTTTCC
161 F L S P P L S P F L P L F L P L F S S
481 TTTTCCTCNTTCTCCCCCCTTTCTCCTTCCTNCCTCTTTCCCTNCCTCTCCTCTTTTT
181 P F F L S F P S S
541 TCTCCTTTTTTTTCTCTCTTTCCCTCCCC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

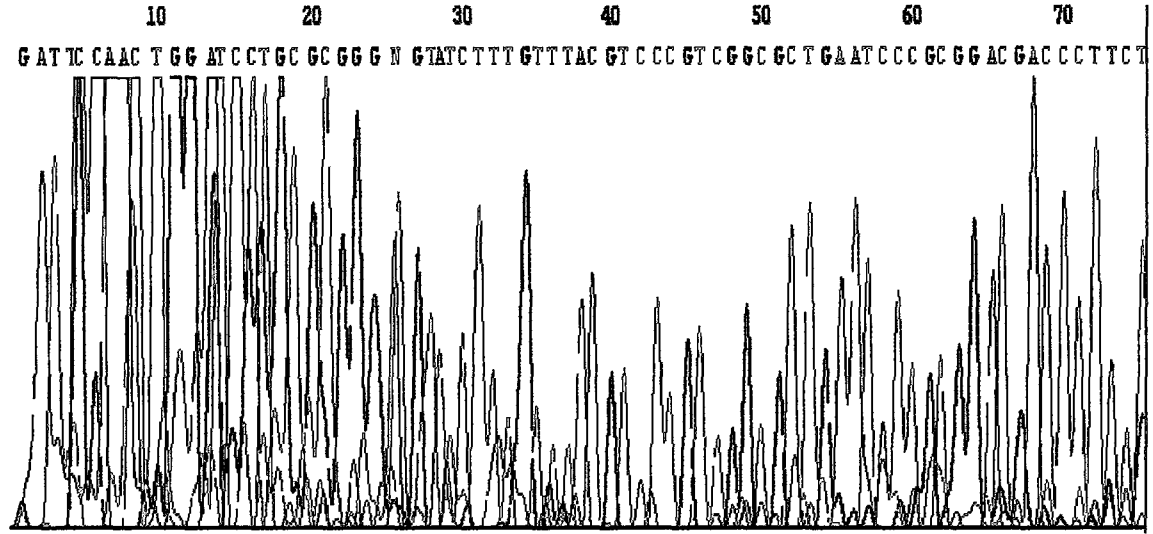
Örnek: 5 ccaactggatcctgcgcgaggacgttctttgtttaacgtccctcggcgtgaatcccgcg 64
Sorgu: 1394 ccaactggatcctgcgcgaggacgttctttgtttaacgtccctcggcgtgaatcccgcg 1453
Örnek: 65 acgacccttctcggggcgcttgggaactctctcgtcccttctcgtctgcggtttcgac 124
Sorgu: 1454 acgacccttctcggggcgcttgggaactctctcgtcccttctcgtctgcggtttcgac 1513
Örnek: 125 cgaccacggggcgacacctctctttacgaggactccttgcctgtgccttnatntctgccag 184
Sorgu: 1514 cgaccacggggcgacacctctctttacgaggactccttgcctgtgccttctcatctgccg 1573
Örnek: 185 acctcgtnacccatnnctttacctntgcacgtcnnatggagaccaccgtgaacgcccac 244
Sorgu: 1574 acctgtgtgcaact-tcgtctcacctctgcacgtcgcatggagaccaccgtgaacgcccac 1632
Örnek: 245 aattcttgcccaaggtcttacataagaggactcttggaactctctgnaatgtcaacgaccg 304
Sorgu: 1633 aattcttgcccaaggtcttacataagaggactcttggaactctctgnaatgtcaacgaccg 1692
Örnek: 305 accttgaggcatacttnaaagactgtttgtttaaanactgggaggagtggggaggaga 364
Sorgu: 1693 accttgaggcatacttnaaagactgtttgtttaaanactgggaggagtggggaggaga 1752
Örnek: 365 ttagattaaagtgtttgtattaggaggctgcacgcataaatnggncnctcaccaacnc 424
Sorgu: 1753 ttaggttaaagtgtttgtattaggaggctgtaggcataaatggctgcgcaccagcac 1812
Örnek: 425 cattcaactttttacctctgccta 451
Sorgu: 1813 catccaactttttacctctgccta 1839

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 205 TXARKMETTVNAHQFLPKVLHKRTLGLSXMSTTDLEAYXKDCLEFKXWHEELGEEIRLKV 384
T AR METTVNAHQFLPKVLHKRTLGLS MSTTDLEAY KDCLEK WHEELGEEIRLKV
Sorgu: 74 TSARRMETTVNAHQFLPKVLHKRTLGLSAMSTTDLEAYFKDCLEKDWHEELGEEIRLKV 133
Örnek: 385 LGGXTHKXXXPPTPXNFTSA 447
LGG HK P P NF TSA
Sorgu: 134 LGGCRHKLVCAPPCNFTSA 154
Örnek: 6 QLDPPARDVLCRLPLGAESRGRXXXXXXXXXXXXXAVSTDHGAHLSLRGLXACAXXSAR 185
QLDPPARDVLCRLP+GAESRGR VSTDHGAHLSLRGL CA SA
Sorgu: 8 QLDPPARDVLCRLPVGAESRGRPFSGSLGALSSPSPSTVSTDHGAHLSLRGLPVCAFSSAG 67

Örnek: 186 P 188
P
Sorgu: 68 P 68

X12



Hastanın Nükleotid Dizisi:

GATTCCAACTGGATCCTGCGCGGGNGTATCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTTCTGGG
GGNNGCTTGGGACTCTCTCGTCCCTTCTCCGTCTGCCGTTTCGACCGACACGGGGCGCACCTCTCTTACGGGAC
TCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCGGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCNCANNCATTGGANACCANNGTGA
ACGCCCACCGATTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGACTCTCTGTAATGTCAACGACCGACCTTGAGG
CATACTTNAAGACTGTTTGTTCAAANACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGTCTTNGTNNNTGGGA
GGCTGNACGCANAAATAGGACTGCCACCAACNNCANACANTTNACCNCNNCTAATNATCNATAGNTNATGCCTT
TTTTTCCTTCCCCAAACCTTCTCTCTTNCCTTTCTTGCCCTTATCCCTCTTCCCCCTCCTCTCCTCTCCTTTTNCCT
TTCTNCTTCCCTCTCCTTCTTNCCTGTTCTCCTCCCTTTCTCTATCCCTCTTTTCACCCCCTTCTCCTNCCNCC
CCNCCACCCCCACNCCNCCNCCCTTATGCTCTCCCCCCC

Kodlanması beklenen aminoasitler:

1 D S N W I L R G X I F V Y V P S A L N P
1 GATTCCAACTGGATCCTGCGCGGGNGTATCTTTGTTTACGTCCCGTCGGCGCTGAATCCC
21 A D D P S G G X L G L S R P L L R L P F
61 GCGGACGACCCCTTCTGGGGGNGCTTGGGACTCTCTCGTCCCTTCTCCGTCTGCCGTTT
41 R P T T G R T S L Y A D S P S V P S H L
121 CGACCGACACGGGGCGCACCTCTCTTACGGGACTCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTG
61 P D R V H F A S P L X X H W X P X * T P
181 CCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCNCANNCATTGGANACCANNGTGAACGCCC
81 T D S C P R S Y I R G L L D S L * C Q R
241 ACCGATTCTTGCCCAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGACTCTCTGTAATGTCAACGA
101 P T L R H T X K T V C S X T G R S W G R
301 CCGACCTTGAGGCATACTTNAAGACTGTTTGTTCAAANACTGGGAGGAGTTGGGGGAGG
121 R L D * R S X X W E A X R X N R T A H Q
361 AGATTAGATTAAAGGTCTTNGTNNNTGGGAGGCTGNACGCANAAATAGGACTGCCACCAA
141 X X T X X P L X N X X * X M P F F S F P
421 CNNCANACANTTNACCNCNNCTAATNATCNATAGNTNATGCCTTTTTTTTCCTTCCCC
161 Q T F L S L X F L A L I P S S P S S P L
481 CAAACCTTCTCTCTTNCCTTTCTTGCCCTTATCCCTCTTCCCCCTCCTCTCCTCTC
181 L S L F X F P S P S F X L F S S P F L L
541 CTTTCNCTTTTCTNCTTCCCTCTCCTTCTTNCCTGTTCTCCTCCCTTTCTTCTA
201 S L L S P P F L P P P X H P H X X X P C
601 TCCCTTCTTTTCACCCCCTTCTNCCNCCCCCNCCCCACCCCCACNCCNCCNCCCTTGC

221 S P P
661 TCTCCCCCCCC

Nükleotid Bazında Karşılaştırma:

Örnek: 5 ccaactggatcctgcgcgggngtatcttctgttaacgtcccgtcggcgctgaatcccgagg 64
||||| |

Sorgu: 1394 ccaactggatcctgcgcgggagctccttctgttaacgtcccgtcggcgctgaatcccgagg 1453
||||| |

Örnek: 65 acgacccttctgggggtcgtctgggacctctctcgtecccttctccgtctgccgtttcgac 124
||||| |||| |

Sorgu: 1454 acgacccttctgggggtcgtctgggacctctctcgtecccttctccgtctaccgtttcgac 1513
||||| |||| |

Örnek: 125 cgaccacggggcgcacctctctttaacgaggactccccgtctgtgccttctcatctgccgg 184
||||| |

Sorgu: 1514 cgaccacggggcgcacctctctttaacgaggactccccgtctgtgccttctcatctgccgg 1573
||||| |

Örnek: 185 accgtgtgcacttcgettccacctctctgencannattgganaaccanggtgaacgcccaccg 244
||||| |

Sorgu: 1574 accgtgtgcacttcgcttcacctctgcagtcgcatggagaccacogtgaacgcccacca 1633
||||| |

Örnek: 245 attcttgcccaaggctttacataagaggactcttggaactctctgtaatgtcaacgaccga 304
||||| |

Sorgu: 1634 attcttgcccaaggctttacataagaggactcttggaactctctgcaatgtcaacgaccga 1693
||||| |

Örnek: 305 cettgaggcatactttaaagactgtttgttttaaactctggaggagtgggggaggagat 364
||||| |

Sorgu: 1694 cettgaggcatacttcaaagactgtttgtttaaagactggaggagtgggggaggagat 1753
||||| |

Örnek: 365 tagattaaaggctcttngtinctgggaggetgnacgcacaaataggactgccacca 419
||||| |

Sorgu: 1754 taggttaaaggctctttgtattaggaggctgtaggcataaatgggtctgcgcacca 1808
||||| |

Protein Bazında Karşılaştırma:

Örnek:	6	QLDPARXYLCLRPVGAESRGRPFWGXLTLS SSPSAVSTDHGAHLSLRGLPVC AFSSAG	185
		QLDPAR LCLRPVGAESRGRPF G LGT LSSPSA VSTDHGAHLSLRGLPVC AFSSAG	
Sorgu:	8	QLDPARDVLC LRPVGAESRGRPFSGPLGTLS SSPSAVSTDHGAHLSLRGLPVC AFSSAG	67
Örnek:	186	PCALRFTSAXXLXTXVNAHRFLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAYXKDCFLKXWHEELGEEI	365
		PCALRFTSA + T VNAH+FLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAY KDCLFK WHEELGEE+	
Sorgu:	68	PCALRFTSARRMETTVNAHQFLPKVLHKRTLGLSVMSTTDLEAYFKDCFLKDWHEELGEEV	127
Örnek:	366	RLKVXVXGGXTXK+DCPF	419
		RLKV V GG K C P	
Sorgu:	128	RLKV FVLGGCRHKLVCAP	145

Genotipi D olarak belirlenen, B936 primeri kullanılarak gerçekleştirilen dizi analizleri sonucu ilk olguda (X1), X gen bölgesine özgü, çeşitli nokta mutasyonlar saptanmıştır. Yapılan değerlendirmede, 1386., 1410., 1484. ve 1856. nükleotidlerde sitozin olması gerekirken timin (C→T) tespit edilmiştir. 1480. ve 1680. nükleotidlerde ise sitozin adenine (C→A) değişmiştir. 1574. nükleotitte timin adenine (T→A), 1606. nükleotitte guanin adenine (G→A), 1629. nükleotitte ise adenin sitozine (A→C) dönüştüğü mutasyonlar tespit edilmiştir. 1740. ve 1858. nükleotidlerde ise timin yerine sitozin belirlenmiştir. Bu mutasyonlardan 1834. nükleotitte görülen DR1 ve enkapsidasyon sinyal dizileri içerisinde yer almaktadır. 1856. ve 1858. nükleotidlerdeki mutasyonlar sadece enkapsidasyon sinyal dizileri içinde bulunmaktadır.

Protein bazında yapılan değerlendirmeye, 1484. ve 1740. nükleotidlerdeki mutasyonların sırasıyla alanin (A→X) ve lösin (L→X) aminoasitlerinin kodlanmasını engelledikleri saptanmıştır.

Bu hastanın prekor- kor gen bölgelerindeki olası mutasyonları saptamak için yapılan çalışmalarda söz konusu bölge PZR sonucu negatif bulunmuş, dizi analizi yapılamamıştır.

Beşinci olgunun (X5) dizi analizi sonuçları değerlendirilmiş ve gen bankasında karşılaştırılmıştır. Olgu 22 olarak kor bölgesi de incelenen hastada X gen bölgesine özgü çeşitli nokta mutasyonlar tanımlanmıştır. Genotipi D olarak belirlenen bu hasta gen bankasındaki karşılaştırma sırasında genotipi F olan bir başka mutant hasta ile en fazla benzerliği göstermiştir.

Genotipleri belirlenmiş 50 olgu çalışmaya dahil edilmiş, X gen bölgeleri çeşitli primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonları sonucunda 11'i genotip D, 1'i genotip A ile enfekte 12 tane HBX pozitif hasta tespit edilmiştir. X bölgesi dizisini belirlemek için yapılan dizi analizi reaksiyonlarının ardından 12 değişik, toplam 225 adet nokta mutasyon ve 4 farklı insersiyon saptanmıştır. Bütün hastalarda sitozinin timine (C→T) (% 24.77) ve timinin sitozine (T→C) (%19.60) değiştiği belirlenmiştir. Guaninin adenine (G→A) değiştiği mutasyon (%13.33) 11 olguda, sitozine (G→C) değiştiği (%10.22) mutasyon ise 9 olguda görülmüştür. 8 hastada adenin timin (A→T) (% 4.77) ve adenin guanin (A→G) (% 6.22) mutasyonu saptanmıştır. Sitozin adenin (C→A) değişimi 7 (% 4.33) olguda belirlenmiştir. 5 hastada sitozinin guanine (C→G) değiştiği (% 4) ve adenini sitozine değiştiği (A→C) (% 2.66) saptanmıştır. Guanini timine (G→T) (% 2.22) ve timinin guanine (T→G) (% 1.77) döndüğü mutasyonlar ise 3, timinin adenine (T→A) (% 3.11) değiştiği mutasyon ise 4 olguda görülmüştür. Adenin (←→A) ve sitozin (←→C) insersiyonu 5, timin (←→T) ve guanin (←→G) insersiyonları ise 2 olguda saptanmıştır.

Bu mutasyonlar toplam 53 aminoasit değişimine neden olmaktadır. 30 aminoasit kodlanmamaktadır. Histidinin arjinine veya asparjine, lösinin metionine, tirozinin serine, serinin fenilalanine, treoninin arparjine, asparjinin aspartik asite, aspartik asitin treonine, glisinin arjinine, valinin izolösine, prolinin serine değişimleri 1'er defa belirlenmiştir.

Alaninin treonine, arjinini histidine, serinin valine, fenilalaninin proline, arjininin treonine, lösinin treonine dönüştüğü mutasyonlar ise 2'şer kez saptanmıştır.

Sonuçlar, X genindeki mutasyonların, genin ürününde birçok aminoasit değişimine neden olduklarını göstermektedir. Tablo 6.3.'de toplam 12 olguda saptanan nokta mutasyonlar, Tablo 6.4.'de ise mutasyonların görülme sıklıkları gösterilmektedir.

Tablo 6.3 HBV X geninde saptanan mutasyonlar

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 1	1317 G→A	
	1356 C→G	
	1386 C→T	
	1410 C→T	
	1480 C→A	
	1485 C→T	A→X
	1575 T→A	
	1606 G→A	
	1629 A→C	
	1680 C→A	
	1740 T→C	L→X
	1834 →C	
	1856 C→T	
	1858 T→C	
Olgu 2	1326 A→C	Y→S
	1335 T→G	N→D
	1350 C→T	
	1353 A→C	
	1451 T→C	
	1472 T→C	
	1481 A→G	
	1482 C→A	
	1511 C→T	
	1514 A→T	
	1576 A→T	P→X
	1606 A→T	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 2	1608 C→G	
	1610 G→A	
	1636 A→C	
	1680 T→C	
	1735 G→C	
	1742 T→C	
	1746 G→C	
	1759 G→A	
	1830 →C	
	1860 T→C	
Olgu 3	1409 G→N	
	1434 G→A	
	1449 T→C	
	1470 T→C	
	1509 C→T	
	1526 →C	
	1605 A→T	
	1607 C→G	
	1609 G→A	
	1632 C→T	
	1758 G→A	
	1774 C→T	
	1776 A→T	
	1787 G→	L→V
	1825 T→C	
	1831 →C	
Olgu 4	1416 T→G	A→T

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 4	1470 T→C	
	1482 T→C	
	1495 C→T	
	1508 C→T	
	1516 G→A	
	1541 C→T	
	1543 A→C	
	1545 A→T	
	1724 C→T	
	1729 G→A	
	1743 C→T	
	1753 C→T	
	1757 G→A	
	1768-1775 8 nt delesyon	
Olgu 5	1411 A→C	
	1419 C→N	
	1426 C→T	
	1432 C→N	
	1435 G→C	
	1438 A→G	P→X
	1450 T→C	
	1461 G→T	H→R
	1470 T→C	
	1479 G→A	P→X
	1480 A→C	F→X
	1484 T→C	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 5	1505 G→C	
	1509 C→T	
	1512 G→A	
	1540 →C	
	1545 T→A	
	1550 C→T	S→X
	1551 C→T	
	1552 T→C	
	1606 G→C	
	1607 C→T	L→X
	1631 C→T	
	1635 A→T	G→X
	1679 C→T	
	1709 C→T	
	1729 G→C	
Olgu 6	1465 C→T	
	1479 G→A	
	1503 A→G	L→X
	1590 →A	
	1602 A→N	
	1604 G→A	
	1605 T→N	
	1606 C→T	
	1607 G→C	
	1608 C→A	
	1609 A→T	
	1614 G→A	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 6	1619 C→N	
	1620 C→N	
	1678 C→T	
	1757 G→A	
	1775 A→G	
	1784 T→N	
	1786 G→C	C→X
	1790 G→A	
	1795 G→N	
	1798 T→C	H→X
	1803 T→C	
	1811 G→C	
	1812 G→A	
	1813 C→N	L→X, P→X
	1814 C→T	A→T
	1816 G→A	V→X
	1828 C→N	
	1830 C→T	
Olgu 7	1280 G→C	
	1287 A→G	
	1291 C→A	
	1336 C→T	
	1338 C→G	
	1343 C→T	
	1346 T→C	
	1352 C→G	
	1353 C→A	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 7	1370 T→C	
	1377 T→C	
	1384 G→T	
	1405 C→T	
	1407 C→T	
	1413 →T	
	1416 →A	
	1437 C→G	
	1445 →T	
	1451 →A	
	1460 →G	A→X
	1463 C→T	
	1474 C→T	
	1477 C→T	
	1494 T→C	
	1499 G→A	
	1514 C→T	
	1540 T→C	P→X
	1576 A→G	
	1582 C→T	
	1583 G→C	
	1584 C→A	
	1585 A→G	
	1592 T→G	R→X
	1596 T→C	G→X
	1627 T→C	G→X
	1647 T→A	R→X

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 7	1652 T→G	S→X
	1659 G→C	A→X
Olgu 8	1338 C→T	
	1343 C→T	
	1346 T→C	
	1352 C→G	
	1353 C→A	
	1370 T→C	
	1377 T→C	
	1405 C→T	
	1407 C→T	
	1413 →T	
	1416 →A	
	1437 C→G	
	1440 C→T	
	1450 →A	
	1462 C→G	
	1464 →C	
	1491 G→C	
	1499 G→A	
	1561 G→C	
	1576 A→G	
	1578 A→G	
	1582 C→A	
	1592 T→G	S→F
	1595 T→C	L→T
	1596 T→A	R→A

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 9	1434 G→C	
	1449 T→C	
	1465 C→T	
	1470 C→G	
	1509 T→C	S→X
	1563 T→C	
	1604 A→T	
	1606 C→G	
	1608 G→A	
	1631 C→T	
	1757 G→A	
	1773 C→T	
	1775 A→T	
Olgu 10	1409 G→C	
	1412 C→T	
	1467 C→N	
	1472 T→C	
	1481 G→A	D→T
	1486 C→A	
	1497 C→T	
	1505 A→G	
	1511 T→C	
	1579 →N	
	1608 G→C	
	1633 C→T	
	1635 A→C	
	1726 C→T	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 10	1759 G→A	
	1764 A→T	
	1765 T→C	
	1781 G→C	
Olgu 11	1418 C→T	
	1434 G→C	
	1470 T→C	
	1479 G→A	F→X
	1503 A→G	S→X
	1548 C→T	
	1549 C→T	
	1552 T→C	
	1562 C→N	G→R
	1563 T→A	
	1564 C→T	
	1565 A→N	S→X
	1572 G→A	
	1577 G→T	F→X
	1578 T→C	
	1581 G→N	
	1585 T→C	
	1586 →A	
	1588 C→N	
	1589 G→N	
	1593 C→T	
	1598 C→N	

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 11	1607 G→N	
	1608 C→N	
	1631 C→T	
	1678 C→N	
	1719 C→N	F→X
	1734 C→T	
	1738 G→N	
	1757 G→A	
	1784 T→C	C→X
	1786 G→C	R→T
	1798 T→N	C→X
	1801 G→N	
	1803 G→T	
	1809 G→A	A→T
	1811 A→N	
	1816 C→T	
	1826 C→T	
Olgu 12	1414 A→N	
	1415 C→G	
	1416 G→T	
	1417 T→A	
	1418 C→T	
	1465 C→G	
	1470 T→C	
	1471 C→T	
	1479 G→A	
	1503 A→G	S→X

<u>Olgu no</u>	<u>Mutasyon</u>	<u>Neden Olduğu Aminoasit Değişimi</u>
Olgu 12	1601 A→N	
	1603 G→A	
	1604 T→N	R→X
	1809 G→A	
	1605 C→N	
	1606 G→C	
	1607 C→A	
	1608 A→T	E→X
	1613 G→N	
	1618 C→N	V→I
	1619 C→G	
	1633 A→G	
	1678 C→T	
	1709 C→T	
	1728 G→T	
	1757 G→A	
	1769 T→N	F→X
	1772 A→N	
	1773 T→C	L→X
	1775 A→G	
	1782 T→N	
	1786 G→C	R→T
	1790 T→C	
	1795 T→A	
	1798 T→A	
	1803 G→C	

Tablo 6.4. HBV X gen bölgesinde saptanan nokta mutasyonların görülme oranları

	A→C %	A→G %	A→T %	C→A %	C→G %	C→T %	G→A %	G→C %	G→T %	T→A %	T→C %	T→G %
	2.66	6.22	4.77	4.33	4.00	24.27	13.33	10.22	2.22	3.11	19.60	1.77
X1	1	-	-	2	-	4	1	-	-	1	2	-
X2	2	1	3	1	1	2	2	2	-	-	5	-
X3	-	-	2	-	1	3	3	-	-	-	3	-
X4	1	-	1	-	-	6	3	-	-	-	2	1
X5	1	1	1	-	-	5	2	4	1	1	4	-
X6	-	-	1	1	-	5	6	3	-	-	3	-
X7	-	-	1	3	3	9	2	3	-	-	6	2
X8	-	-	-	3	3	4	-	2	-	-	4	1
X9	-	-	2	-	1	4	2	1	-	-	3	-
X10	1	-	1	1	-	4	2	3	-	-	3	-
X11	-	2	-	-	-	8	4	2	2	2	6	-
X12	-	2	-	1	-	4	3	3	2	3	3	-
Toplam	6	14	13	12	9	58	30	23	5	7	44	4

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hepatit B virüs infeksiyonu, kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma gibi tedavisi güç, ciddi seyirli karaciğer hastalıklarına yol açmaktadır. Günümüzde kronik hepatit B virüsü taşıyıcısı yaklaşık 300 milyon kişi bulunmaktadır ve bu kişilerde siroz, bunu takiben hepatosellüler karsinoma görülme riski oldukça yüksektir. Ölümcül hastalıklar arasında 9. sırada yer alan HBV infeksiyonu, insanlık için önemli bir sağlık sorunu olma durumunu sürdürmektedir. İnfeksiyon, aşı uygulaması ile bir ölçüde engellenmekle beraber, kronik hepatit için henüz etkin bir tedavi geliştirilememiştir. Türkiye'de HBV taşıyıcılığının, bölgeler arası farklılıklar göstermesine karşın, yaklaşık % 8 olduğu sanılmaktadır. Bu nedenlerle, HBV infeksiyonu, diğer ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de halk sağlığı açısından büyük bir sorun teşkil etmektedir.

Çalışmamıza, Haydarpaşa Numune Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarından serolojik markerlarına [(HBsAg (+) -AntiHBcIgG (+) veya HBsAg (+) -AntiHBcIgM (+)] göre seçilen 187 olgu dahil edilmiştir. HBV genotiplerini belirlemek için S bölgesi PZR uygulanmış ancak sadece 50 olguda beklenen amplifikasyon ürünü saptanmıştır. Serolojik markerlarına göre seçilen olguların, hastalığın akut dönemine rastlaması ayrıca tedavi alan hastaların varlığı gözönüne alındığında doğurabilecekleri serolojik markerlarının yalancı pozitif sonuçları PZR nun gerçekleşmemesine neden olarak gösterilebilir. Diğer bir olasılık da, düşük miktardaki viral yükün PZR ile çoğaltılmış olmasına rağmen görüntüleme etabında tespit edilememesidir.

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda, HBV genomları arasında farklılıklar olduğu saptanmış ve birbirlerine benzerlik oranı % 92 ve daha fazla olan HBV suşları aynı grupta toplanarak genotipler belirlenmiştir (100,112). Bu genotipler ile HBsAg subtipleri arasındaki ilişkilerin saptanması amacıyla pregenom S dizileri ile S geni dizileri karşılaştırılmış, S geni düzeyinde genotip farklılık sınırı % 4 olarak tespit edilerek genotip-subtip dağılımı yapılmıştır (38,39,116,158).

Coğrafi bölgelere göre değişik dağılım gösterdikleri saptanan farklı HBV genotiplerinin klinik seyri etkileyebildikleri ve tedaviye alınan yanıtızlıktan sorumlu olabildikleri bilinmektedir (141,167). Bugüne kadar A'dan H'ye 8 farklı HBV genotipi tanımlanmış olmasına rağmen bundan daha fazla genotip olduğu sanılmakta ve

araştırmalar devam etmektedir. HBV prevalansının düşük olduğu Kuzeybatı Avrupa ve ABD'deki persistan taşıyıcılar arasında genotip A baskındır. Amazon bölgesi ve Peru gibi HBV taşıyıcılığının yüksek olduğu ülkelerde ise genotip F belirlenmiştir (149). HBV bulaşında vertikal geçişin ilk sırada olduğu Doğu Asya ülkelerinde genotip B ve C'nin prevalansı yüksek olup bu durum kısmen vertikal geçişten sorumlu olan HBeAg pozitif dönemin daha uzun oluşu ile açıklanır. Genotip A ve D'nin dominant olduğu Akdeniz, Sahra altı Afrika ülkelerinde horizontal geçiş önemlidir.

Genotip G Fransa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde görülmüştür. Son çalışmalarla özellikle Meksika'nın da içinde bulunduğu Latin Amerika ülkelerinde yeni bir genotip daha tespit edilmiş ve H olarak adlandırılan bu genotipin genom yapısının F'ye benzediği belirlenmiştir (134).

Son zamanlarda, RFLP yerine, preS2 bölgesi ürünlerindeki epitoplara karşı, genotiplere spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak ELISA ile HBV genotipleri tayin edilmektedir. Bu yöntemde nükleotid zincirlerini incelemek gerekmediğinden geniş taramalar için kullanılabilir (87).

Çalışmamızda RFLP yöntemi kullanılarak, ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz Bölgesinde en sık görülen genotip olan D dominant olarak bulunmuştur. Olguların 50'sinde serum HBV DNA'nın S bölgesi PZR ile pozitif olarak saptanmış ve bu olgular genotiplerinin belirlenmesi amacıyla *AlwI* (Genotip C), *EcoRI* (Genotip B), *NciI* (Genotip E), *NlaIV* (Genotip D ve A) ve *HphI* (Genotip F) restriksiyon enzimleri kullanılarak üç farklı genotip, A, D ve F, belirlenmiştir.

42 olgunun genotip D (% 84), 6 olgunun genotip A (% 12), 2 olgunun da genotip F (% 4) ile infekte oldukları ortaya konmuştur.

Bu çalışmada HBV tip D infeksiyonunun ülkemizin farklı bölgelerinden gelen kronik hepatitli hastalarda dominant olarak saptanması diğer Akdeniz ülkelerindeki olgu sonuçları ile uyumluluk göstermektedir (101).

Kor geninin bir stop kodonu olduğu halde iki başlama kodonu vardır. Translasyon ikinci başlama kodonundan başladığında ortaya çıkan polipeptid, kor proteini adı verilen ve nükleokapsidi oluşturan proteindir. Eğer translasyon birinci başlama kodonundan başlarsa meydana gelen polipeptid hücre içinde bazı süreçlerden geçip karboksil ve amino bölgelerinden kırılmalar göstererek sonuçta HBV e antijenini (HbeAg) oluşturur. Prekor bölgesindeki 28. kodon ikinci başlama kodonundan iki

önceki kodon olduğu için HBeAg translasyonu durdurulduğu halde virüsün en önemli yapısal proteinlerinden olan kor proteini (HBcAg) sentezi eksiksiz gerçekleşir (19).

İlk tespit edildikleri zamandan itibaren, prekor stop kodon mutasyonlarının Akdeniz çevresi ülkelerde ve Uzak Doğu'da daha fazla rastlandıkları dikkati çekmiştir. Bunun nedeni HBV'nun genotiplerinin farklı coğrafi dağılımıdır. Prekor stop kodon mutasyonu ancak virüs genomunun 1858. nükleotidinde timin bulunan genotiplerde (genotip C ve D) meydana gelebilmektedir. Halbuki aynı numaralı nükleotidde sitozin bulunduran genotip A'da C1858T mutasyonu olmadıkça hiçbir zaman stop kodon mutasyonu meydana gelmemektedir (84,132). Bunun nedeni prekor bölgesinde yerleşen ve regülatör bir bölge olan epsilon enkapsidasyon sinyal dizisinin sekonder yapısıdır. Epsilon enkapsidasyon sinyal dizisinin sekonder yapısı çeşitli baz eşleşmeleri ile stabil hale gelmektedir. Bu sekonder yapıda 1858 ve 1896 numaralı nükleotidler karşılıklı gelmektedirler. Genotip A'da eğer stop kodon mutasyonu meydana gelirse C1858 ile G1896 arasındaki mevcut baz eşleşmesinin kırılması gerekmektedir. Bu da sekonder yapının stabilitesini bozar ve virüs için avantaj kaybına neden olur. Halbuki 1858'de T bulunduran genotip C ve D'de G1896A mutasyonu iki nükleotid arasındaki baz eşleşmesini sağlayıp yapıyı daha stabil hale getirerek virüsün replikasyon yeteneğini arttırmaktadır (17, 90). Bu moleküler yapısal özellik dünyanın bazı bölgelerinde stop kodon mutantlarının daha sık görülmesini açıklamaktadır. Ülkemizde kronik B hepatitli replikatif hastaların %60-70'inde HBeAg negatiftir, yani büyük oranda mutant virüs infeksiyonu vardır. İsveç'te yapılan bir çalışmada HbeAg (-) olduğu halde stop kodon mutasyonu bulundurmayan virüslerle olan infeksiyonların, stop kodon mutasyonu bulunduranlardan daha ağır seyrettiği iddia edilmiştir (88).

HBeAg sentezi olmadığı halde virüs canlılığını, patojenitesini ve büyük ihtimalle infeksiyon kapasitesini kaybetmemektedir. Virüse karşı oluşan immün toleransta, dolayısıyla infeksiyonun devamlılığında HBeAg'nin büyük olasılıkla rolü vardır. HBeAg'inin kodlandığı prekor bölgesinde 28. kodonda TGG kodonunun TAG dönüşümü gösterdiği yani triptofan kodonu yerine stop kodon meydana geldiği tespit edilmiştir (46). Prekor bölgesinde 1896. nükleotitteki G→A değişimi dışında da bazı mutasyonlar rapor edilmiştir. Bunlardan en sık rastlanana 1899. nükleotitteki G→A değişimidir. Bu mutasyon sıklıkla 1896 mutasyonu ile birlikte görünmektedir. İki

mutasyonun bir arada bulunmasının hastalığın kliniğini ağırlaştırdığı iddia edilmiştir (148, 151).

Kor geni, 183. kodondan sentezlenmeye başlayıp, immün sistem için en önemli hedef antijenlerden biri olan HBeAg'nin sentezinden sorumlu bölgedir. Anti-HBe pozitifken HBV DNA'nın pozitifliğini hala neden sürdürebiliyor sorusu, dizi analizi çalışmaları ve genomun yapısına moleküler düzeyde açıklık getirilmesine kadar yanıtı kalmıştır. Aktif karaciğer hastalığı bulunan ve HBeAg negatif olan hepatitli olgularda yapılan ilk çalışmalar, bu hastaların mutant tip bir virüs ile infekte olduklarını ve mutasyonun da, HBV'nün prekor bölgesinde kodon 28'de bir stop kodon oluşumuna yol açarak HBeAg sentezini engelleyen, 1896. pozisyonundaki G→A nokta mutasyonu olduğunu ortaya koymuştur (99). İlk kez Yunanistan ve İtalya'da saptanan bu mutasyon daha sonra, dünyanın çeşitli yerlerinde de tanımlanmış ve mutant virüsün, normal tip virüse kıyasla, daha ciddi seyirli olan ve tedavi yanıtı daha düşük olan bir kronik hepatit tablosuna yol açtığı bildirilmiştir (91). Söz konusu mutasyon, virüsün prekor-kor bölgesindeki diğer mutasyonlara kıyasla, oldukça sık görülmektedir. Bunun nedeni olarak da, immün seleksiyon gösterilmektedir. Çalışmalar, HBV ile infekte hepatositlerin yüzeylerinde bulunan HBeAg'nin, immün sisteme hedef oluşturan bir antijen olduğuna işaret etmektedir (115). Böyle bir hedef antijenin sentezlenemediği durumlarda ise, infekte hepatositler, immün sistem tarafından tanınamamakta ve böylece, immün sistemden kaçabilen HBV, varlığını herhangi bir tehdit olmaksızın rahatlıkla sürdürebilmektedir.

HBeAg negatif hastalarda yapılan DNA dizi analizi çalışmaları sonucu, HBV genomunda kodon 28'deki mutasyona ek olarak, başka mutasyonlar da tanımlanmıştır; bunlardan biri, prekor bölgesinin ikinci nükleotidi olan timinin sitozine (T→C) veya üçüncü nükleotidi olan guaninin adenine (G→A) dönüşerek, başlangıç kodonu ATG'nin kodladığı metioninin lösine değiştiği mutasyondur ve bu da HBeAg'nin sentezlenmesini engellemektedir (195). Günümüze kadar tanımlanmış diğer mutasyonlar arasında, nt 83-86 arasındaki guaninlerden birinin delesyonu (G→-) veya nt 26-27 arasına ek bir timinin (-→T) ya da nt 12-13'un arasına iki timinin insersiyonu (-→TT) sonucu çerçeve kayması (frameshift) mutasyon; nt 1815'de (C→T) mutasyonu; kodon 2'de (A→G) mutasyonu; kodon 9,11,12'de birer nükleotidlik delesyonlar; kodon 15'de nt 1856'da prolin serin (P→S) değişikliğine yol açan (C→T) mutasyonu; ve yine kodon 15'de

prolinin herhangi bir değişime uğramadığı (T→C) mutasyonu; kodon 17'de (G→T) mutasyonu; kodon 19'da (T→G) mutasyonu; kodon 29'da nt 1899'da stop kodon oluşumuna yol açan (G→A) mutasyonu; ve yine kodon 29'da, nt 1898'de (G→A) nokta mutasyonlarıdır.

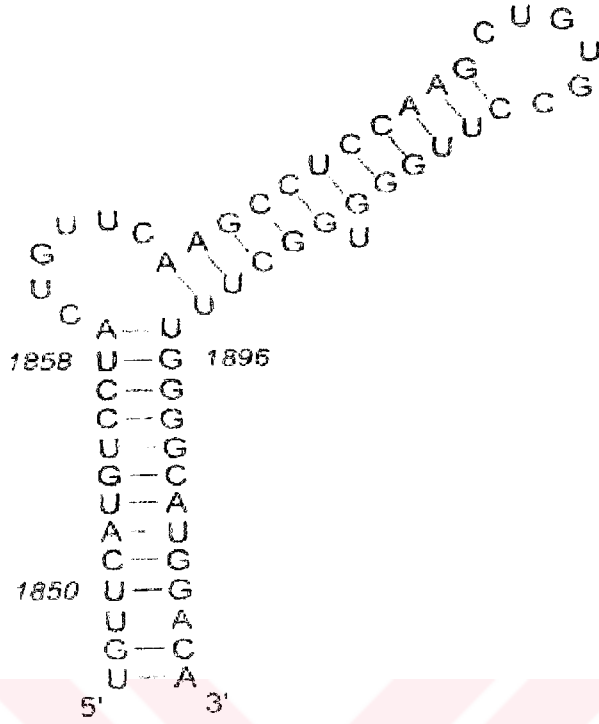
HBV genomunun prekor bۆlgesi, nt 1814-2457 arasında yer alan kor geninin başlangıç kısmında bulunmakta ve nt 1814-1900 arası bۆlgeyi kapsamaktadır. HBV genomunun kompakt yapısı nedeni ile, kor geninin prekor bۆlgesi, nt 1374-1835 arasındaki X geni ile kısmen üstüste gelmektedir. Aynı şekilde, kor geni, nt 1622-2307 arasında yer alan P geni ile de kısmen çakışmaktadır. Bu nedenle, nt 1681-2029 arasında saptanmış olan mutasyonlar, bu bۆlgeyi de ilgilendirmektedir. Buna gۆre, nt 1681-1813'e kadar ki mutasyonlar X genini; nt 1814-1835 arasındakiler, hem X genini, hem de prekor bۆlgesini; nt 1901-2029 arasındaki mutasyonlar ise, sadece kor genini ilgilendirmektedir. Bu çalışmada saptanan nt 1386, 1410, 1480, 1511, 1514, 1575, 1606, 1629, 1636, 1740, 1742, 1746, 1746, 1759, 1762, 1764, 1775, 1784, 1786, 1795, 1804, 1809, 1810'daki nokta mutasyonları, X geninin; 1831, 1847, 1858, 1862, 1896 prekor ve kor bۆlgesi nokta mutasyonlar ise, kor geninin ürünlerini etkilemektedir. HBV e antijeni negatif, kronik HBV infeksiyonlu olguda saptanan 1762 ve 1764. nükleotidlerdeki mutasyonlar hastalığın klinik tablosunu ağırlaştırmaktadır (46). Bulunan mutasyonlar literatürle uyumludur ve kronik HBV infeksiyonlu hastalarda saptandıklarından HBV nn oluşan mutasyonlarla bağışıklık sisteminden kaçtığını gۆstermektedir.

HBV genomunun, X AOC'de nt 1823-1834 arasında kalan bۆlgesinde virüsün replikasyonu için gerekli olan DR1 bulunmaktadır. 1818-1921. nükleotidler arasında kalan bۆlgede ise, pre-genomik HBV RNA'ların 3' ucunda yer alan, enkapsidasyon (ε) ve ters transkripsiyon (RTS) sinyallerini içeren terminal fazlalık (R) bulunmaktadır. Bu bۆlgelerin mutasyona uğraması, virüsün yaşam dۆngsn etkileyeceğinden, pratikte buralarda mutasyon bulunmaması gerekmektedir (146). Çalışmamızda beş olguda, DNA dizi analizi ile, HBV genomunun nt 1823-1834 arasındaki DR1 ve nt 1818-1921 arasındaki enkapsidasyon sinyallerini içeren bۆlgelerde toplam 10 adet mutasyon saptanmıştır. AntiHBe pozitif olgularda saptanan bu mutasyonlar, virüsün replikasyon yeteneğini arttırarak klinik tabloyu ağırlaştırmaktadır. Akdeniz lkelerinde, DR1 bۆlgelerinde mutasyon bulunan olgularda

yapılan çalışmalarda HBV nün neden olduğu karaciğer hasarının artarak siroz gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (69).

Yapılan çalışmalar 154 amino asitlik X proteininin ilk 26-52 amino asitler arası bölgesinin son derece değışken olduğunu göstermiştir. X geninde oldukça korunmuş bölgeler bulunmaktadır. Bunlardan ilki 13-24. kodonlar arasındaki bölgedir. İkinci ve en uzun korunmuş bölge ise 53-77. kodonlar arasındaki bölgedir ve P AOC ile üst üste gelmektedir. Ayrıca 89-115 ve 132-143. kodonlar arasındaki bölgelerin büyük ölçüde korunmuş oldukları da gösterilmiştir. Kodon 144'teki değışkenliğe karşın 132. kodondan itibaren proteinin karboksil ucuna kadar korunduğu saptanmıştır. En çok korunmuş bölgelerden biri olan 131-142 arasındaki amino asitler (VFVLGGCRHKL) virüsün transaktivasyon fonksiyonuyla; özellikle de 134-140 arasındaki amino asitler (LGGCRHK) virüsün serin proteaz inhibitör fonksiyonu ile ilişkili bulunmuştur (166). Pozisyon 1696-1706 arasındaki nükleotidler, TTCACCTCTGC amino asitlerine karşılık gelmekte ve regülatör diziler olarak bilinmektedirler. Çalışmamızda bu bölgelerde hiçbir mutasyona rastlanmamıştır. Ayrıca, kodon 145'te saptanan nokta mutasyonu, virüsün transaktivasyon fonksiyonu ve serum proteaz inhibitör aktivitesi için gerekli olan ve büyük ölçüde korunmuş olan bölgelerin dışında bulunduğundan, söz konusu fonksiyonları büyük olasılıkla etkilememektedir.

HBV genomunun kor bölgesindeki 11-27 ve 84-101 arasında yer alan kodonların ürünleri, sitotoksik T lenfositlerin hedef bölgeleridir. HBV'nün, hücresel immün yanıtı kaçılabilmek için, bu bölgelerdeki DNA dizilerinde değışiklikler yaptığı bilinmektedir. Çalışmamızda, HBV genomunun prekor bölgesinde saptanan 1826, 1828, 1830, 1834, 1856, 1858 ve 1860 mutasyonları nt 1846-1907 arasındaki enkapsidasyon (ε) sinyalinin içinde bulunmaktadır. Pre-genom enkapsidasyon sinyali, pre-genomik RNA'nın paketlenmesi ve pre-genomik RNA'dan, (-) iplikli DNA'nın ters transkripsiyonunda kalıp olarak görev yapmaktadır (104). Bu bölge ayrıca, 'stem-loop' şeklinde ikincil bir yapı oluşturma potansiyeline de sahiptir (98) ve bu yapıda, kodon 15, kodon 28 ve kodon 29 karşılıklı durmaktadır. İnen ve çıkan kolda 14'er nt bulunmakta; ancak bunlardan üçü, 1858 ve 1896, 1855 ve 1899; 1850 ve 1904, Watson-Crick baz çiftleşmesi göstermemektedir. Bu eşleşmemiş noktaların üçünde de, yukarı çıkan kolda T (U), inen kolda da G bulunmaktadır (Şekil 7.1).



Şekil 7.1 HBV RNA Enkapsidasyon Sinyalinin Yapısı

Kodon 17, 28 ve 29 eşleşmemiş bu 3 noktanın ikisini oluşturmaktadır. Kodon 28 ve 29'daki (G→A) mutasyonları, sırasıyla kodon 15 ve kodon 14'deki T'ler ile komplementerlik sağlamakta ve böylece ikincil yapıyı güçlendirmektedir. 1850 ile baz çiftleşmesi göstermeyen nt 1904'de, eşleşmeyi sağlayacak olan, (G→A) mutasyonu henüz tanımlanmamıştır. Bu noktanın pregenom enkapsidasyon sinyalinin fonksiyonel açıdan en önemli dizileri olan 1852 ve 1907'nin dışında kalması buna neden olarak gösterilmektedir. Çıkan koldaki 3 eşleşmemiş nükleotidin sadece birinin, sekonder yapıyı kuvvetlendirecek bir mutasyona uğradığı belirlenmiştir. Bu mutasyon da, 1858'deki (T→C) mutasyonudur ve nt 1896'daki G'nin 1858'deki C ile eşleşmesine olanak tanımakta ve üç adet eşleşmemiş noktayı ikiye indirmektedir. 1858'de bu tür bir mutasyon bulunduğunda, eşleşmeyi bozacak bir mutasyon olan A1896 asla görülmemektedir (146). Çalışmamızda da, literatürle uyumlu olarak, kodon 28'de A1896 stop kodon mutasyonu saptadığımız olguda C1858'e rastlanmamıştır.

Pozisyon 1856 ve 1898 arasındaki baz eşleşmesini bozmayacak şekilde, 1856'daki C'yi, T'ye; 1898'deki G'yi A'ya dönüştüren mutasyonlar da tanımlanmıştır; ancak çalışmamızda, bu iki mutasyon bir arada saptanmamıştır. Akdeniz ülkelerinde sık

görülen, ciddi seyirli, ve fulminan hepatite neden olan ve stop kodon mutasyonuna yol açarak HBeAg'nin sentezlenmesine engel olan A1896 nokta mutasyonu, 31 olgunun 1'inde (% 3.2) belirlenmiştir. HBeAg sentezini engelleyen bir diğer mutasyon olan prekor başlangıç kodon mutasyonuna ise olguların hiçbirinde rastlanmamıştır.

HBV X geninin ürünü X proteininin fonksiyonunun ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. X geninin DNA'ya bağlanma özelliği olmadığı için transaktivasyon etkisini muhtemelen diğer proteinlerle etkileşerek veya bazı sinyal iletim sistemleri ile bağlantılı yapmaktadır

Son yıllarda yapılan araştırmalarda X geninde delesyonların neden olduğu mutasyonlara rastlanmıştır (99). X proteinin viral replikasyonda rolü olabileceğini gösteren bulgular bu gendeki mutasyonların virüsün replikasyonunda ve diğer bazı genlerin ekspresyonunda değişikliklere yol açarak atipik serolojik tablolar gösterdiği saptanmıştır. X geninin polimeraz ve prekor genleri ile üstüste gelmesi, HBV enh II'nin ve prekor ve kor promotorlarının X geni içerisinde yer almaları X geni bölgesindeki mutasyonların çok yönlü etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

X geni ürününün hepatokarsinogeneizde rolü olduğu kabul edilmektedir. Bazı karaciğer kanseri hücrelerinde X geni delesyonlu HBV mutantları tespit edilmiştir (15,62). Bunlar genellikle 128-132. kodonlar civarında çerçeve kaymasına (frameshift) neden olan ve 20 amino asit kısa X proteinlerinin meydana gelmesine sebep olan mutasyonlardır. HBx proteinin apoptozisi p53'ten bağımsız bir yolla indüklediği ve hücrelerin klonal aşırı çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (142). Ayrıca, HBe ekspresyonunun hücre döngüsünün geç G1 fazını bloke edip apoptozise gidiş öncesinde de hücre bölünmesini durdurduğu gösterilmiştir. HBV X geni mutantlarının HBx'in apoptozisi indükleyici ve G1'de bloklama etkisini ortadan kaldırdığı, bu şekilde hepatosellüler kanser gelişmesini kolaylaştırdığı iddia edilmektedir. HBX mutasyonlarının hepatosellüler kanserle ilişkisine dair birçok hipotez ortaya atılmıştır. Bunlardan biri de HBx proteininin hücrenin hasarlı DNA'sına bağlanma özelliğinde olduğu, böylece DNA tamirini engellediği şeklindedir (26). Aynı çalışmada hasarlı DNA'ya bağlanan HBx'in bu DNA'yı ultraviyole ışığının kırılma etkisine hassas hale getirdiği de düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında genotipleri belirlenmiş 50 olgu çalışmaya dahil edilmiş, X gen bölgeleri çeşitli primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonları sonucunda

11'i genotip **D**, 1'i genotip **A** ile infekte 12 tane HBX pozitif hasta tespit edilmiştir. X bölgesi dizisini belirlemek için yapılan dizi analizi reaksiyonlarının ardından 12 değişik, toplam 225 adet nokta mutasyon ve 4 farklı insersiyon saptanmıştır. Bütün hastalarda sitozinin timine (C→T) (% 24.77) ve timinin sitozine (T→C) (%19.60) değiştiği belirlenmiştir. Guaninin adenine (G→A) değiştiği mutasyon (%13.33) 11 olguda, sitozine (G→C) değiştiği (%10.22) mutasyon ise 9 olguda görülmüştür. 8 hastada adenin timin (A→T) (% 4.77) ve adenin guanin (A→G) (% 6.22) mutasyonu saptanmıştır. Sitozin adenin (C→A) değişimi 7 (% 4.33) olguda belirlenmiştir. 5 hastada sitozinin guanine (C→G) değiştiği (% 4) ve adenini sitozine değiştiği (A→C) (% 2.66) saptanmıştır. Guanini timine (G→T) (% 2.22) ve timinin guanine (T→G) (% 1.77) döndüğü mutasyonlar ise 3, timinin adenine (T→A) (% 3.11) değiştiği mutasyon ise 4 olguda görülmüştür. Adenin (→A) ve sitozin (→C) insersiyonu 5, timin (→T) ve guanin (→G) insersiyonları ise 2 olguda saptanmıştır. Bu mutasyonlar sonucunda HBV genomu X bölgesinde toplam 53 aminoasit değişimi oluşurken 30 aminoasit de kodlanamamaktadır. Bu sonuçlar, X genindeki mutasyonların, genin ürününde birçok aminoasit değişimine neden olduklarını göstermektedir.

Saptanan bazı nokta mutasyonların stop kodon oluşturmadığı halde aminoasitlerin kodlanmasına engel olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, X5 olarak tanımlanan bir olgunun genotipi **D** olmasına rağmen, sahip olduğu mutasyonların yüksek oranda, **F** genotipi ile infekte, Çin'de yapılan bir çalışma ile belirlenmiş bir hastaya benzediği görülmüştür. Yapılan araştırmalarda, son bulunan HBV genotipi **H** ile **F** in son derece benzer olduğu ortaya konmuştur. Aynı çalışmaya **D** genotipi olduğu belirlenen 2 olgu dahil edilmiş ve tüm genomun dizi analizi çalışmaları sonucu **H** genotipi ile yüksek oranda benzerlik gösterdikleri saptanmıştır (134). Bu verilere dayanarak genotipi **D** olarak belirlenmiş X5 ile adlandırılan olgunun **H** genotipinde olabileceği ihtimali de bulunmaktadır.

HBV genomunda oluşan her çeşit mutasyonun virüsün yapı ve yaşam döngüsünü etkileyerek enfeksiyon oluşturma sürecinden uygulanacak tedavi seçeneğine kadar etkili olduğu bilinmektedir. Türk toplumunda HBV'nün heterojenitesine moleküler düzeyde ışık tutmayı amaçladığımız bu çalışmada, literatür ile uyumlu sonuçlara ek olarak prekor, kor ve X bölgelerinde bugüne kadar saptanmamış nokta

mutasyonlarının varlığı da gösterilmiş ve mutasyon-klinik ilişkisi açıklanmaya çalışılmıştır.

Ülkemizde de ciddi bir toplumsal sağlık sorunu olan hepatit B hastalığının epidemiyolojisinin ve moleküler temelini iyi bilinmesi korunmadan tedaviye kadar her etapta gereklidir. Bu görüşe dayanarak, özellikle moleküler düzeyde yapılacak bu tür çalışmaların hastalığın karakterinin anlaşılmasına olumlu katkı getirmesi beklenmektedir.



8. KAYNAKLAR

1. Aikawa T, Kanai K, Kako M, Kawasaki T, Hino K, Iwabuchi S, Tsubouchi H, Takehira Y, Tsuda F, Okamoto H, et al.: Interferon-alpha 2a for chronic hepatitis B with e antigen or antibody:comparable antiviral effects on wild-type virus and precore mutant. *J Viral Hepat* 2: 243-250, 1994.
2. Akarca US, Lok AS.: Naturally occurring core-gene-defective hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 76: 1821-1826,1994.
3. Akarca US, Lok AS.: Naturally occurring hepatitis B virus core gene mutations. *Hepatology* ; 22: 50-60, 1994.
4. Alexopoulou A, Karayiannis P, Hadziyannis SJ, Aiba N, Thomas HC.: Emergence and selection of HBV variants in an anti-HBe positive patient persistently infected with quasi-species. *J Hepatol* ; 26: 748-753,1997.
5. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD.: Identification and characterisation of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* ; 27: 1670-1677, 1998.
6. Almeida J D, Rubenstein, Stott,: New antigen antibody system in Australia antigen positive hepatitis. *Lancet*, 1:1225-1227, 1971.
7. Alper CA, :Epidemiology and structure of hepatitis B virus. *N Engl. J Med*, 321:708-12,1989.
8. Alter M J. :Heterosexual transmission of hepatitis B virus. *Hepatocyte* 2 AIDS Press. 1989.
9. Angus PW, Locarnini SA, McCaughan GW, Jones RM, McMillan JS, Bowden DS.: Hepatitis B virus precore mutant infection is associated with severe recurrent disease after liver transplantation. *Hepatology* ; 21: 14-18, 1994.
10. Aye TT, Bartholomeusz A, Shaw T, Bowden S, Breschkin A, McMillan J, Angus P, Locarnini S.: Hepatitis B virus polymerase mutations during antiviral therapy in a patient following liver transplantation. *J Hepatol* ;26:1148-1153, 1997.
11. Ayola E A, *Viral hepatitis in Africa*, :Viral hepatitis and liver disease. Ed A J Zuckerman kitabmda, s. 161, Alan R Liss, Inc. New York, 1988.
12. Badur S.: HBV moleküler viroloji ve serolojik tanı. *Viral Hepatit* 1994, Kılıçturgay (ed). *Viral Hepatit ile Savaşım Derneği*, 65-90, 1994.

13. Bahn A, Hilbert K, Martine U, Westedt J, von Weizsacker F, Wirth S.: Selection of a precore mutant after vertical transmission of different hepatitis B virus variants is correlated with fulminant hepatitis in infants. *J Med Virol* 47: 336-341,1994.
14. Balık I.: Viral Hepatit 1994, Hepatit B epidemiyolojisi. Kılıçturgay (ed). Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 91-101, 1994.
15. Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ.: Two core promotor mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin Invest* ; 98: 2268-2276, 1996.
16. Blumberg B S, Gertsley, Hungerford, London, Sutnick,: A serum Ag in Down's syndrome leukemia and hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 66:924, 1967.
17. Booth JC, Goldin RD, Brown JL, Karayiannis P, Thomas HC.: Fibrosing cholestatic hepatitis in a renal transplant recipient associated with the hepatitis B virus precore mutant. *J Hepatol* ; 22: 500-503, 1994.
18. Bozkaya H, Akarca US, Ayola B, Lok AS.: High degree of conservation in the hepatitis B virus core gene during the immune tolerant phase in perinatally acquired chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* ; 26: 508-516, 1997.
19. Bozkaya H, Ayola B, Lok AS.: High rate of mutations in the hepatitis B core gene during the immune clearance phase of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* ; 24: 32-37, 1996.
20. Brand, N., Petkovich, M., Krust, A. et al.: Identification of a second human retionic acid receptor. *Nature*, 332: 850-853, 1988.
21. Brechot, C., Pourcel, C., Hadchoule, M., DeJean, A., Louise, A., Scotto, J.,Tiollais, P.: State of hepatitis B virus DNA in liver diseases. *Hepatology*, 2: 27-34, 1982.
22. Bressac, B., Kew, M., Wands, J., Oztürk, M.: Selective G to T mutations of p 53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350: 429-431, 1991.
23. Brunetto MR, Giarin M, Saracco G, Oliveri F, Calvo P, Capra G, Randone A, Abate ML, Manzini P, Capalbo M, et al.: Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. *Gastroenterology*; 105: 845-850, 1993.

24. Brunetto MR, Rodriguez UA, Bonino F.: Hepatitis B virus mutants. *Intervirology* ; 42: 69-80, 1999.
25. Cakaloglu Y, Okten A, Yalçın S.: Türkiye'de Hepatit B Virüsü enfeksiyonu seroepidemiolojisi. *Turkish J Gastroenterohep.* 1:49-53, 1990.
26. Capovilla A, Carmona S, Arbuthnot P.: Hepatitis B virus X-protein binds damaged DNA and sensitizes liver cells to ultraviolet irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* ; 232: 255-260, 1997.
27. Carman W F, Boner W, Fattovich G, Colman K, Dornan E S, Thursz M, Hadziyannis S.: Hepatitis B virus core protein mutations are concentrated in B cell epitopes in progressive disease and in T helper cell epitopes during clinical remission. *J Infect Dis.* 175: 1093-1100, 1997.
28. Carman W F, Trautwein C, van Deursen F J, Colman K, Dornan E, McIntyre G, Waters J, Kliem V, Muller R, Thomas H C, Manns M P.: Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* ; 24: 489-493, 1996.
29. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC.: Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336: 325-329, 1990.
30. Chen, D.S., Hoyer, B.H., Nelson, J., Pourcell, R.H., Germ, J.L.: Detection and properties of hepatitis B viral DNA in liver tissues from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1: 42-46, 1982.
31. Chen, H.S., Knew, M.C., Hornbuckle, W.E., Tenant, B.C., Cote, P.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H., Miller, R.H.: The precore gene of woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. *J. Virol*, 66: 1218-1226, 1992.
32. Chen.C.J., Wang, L.Y., Lu, S.N., Wu, M.H., You, S.L., Zhang, Y.J., Wang L.W., Santella, R.M.: Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 24: 38-42, 1996.
33. Cheung, R.C., Robinson ,W.S., Marion, P.L., Greenberg, H.B.: Epitop mapping of neutralizing monoclonal antibodies against Duck hepatitis B virus. *J. Virol*, 63 2445-2451, 1989.

34. Chisari F.V., Ferrari C.: Hepatitis B Virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immuno*, 13: 29-60, 1994.
35. Chisari, F.V.: Hepatitis B virus transgenic mice: Models of viral immunobiology and pathogenesis. *Current topics in microbiology and immunology*, Springer - Verlag, Heidelberg , 206:149-173, 1994.
36. Colgrove, R., Simon, G., Ganem, D.: Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for replication. *J. Virol.*, 63: 4019-4023, 1989.
37. Cote, P.J., Korba, B.E., Steinberg, H., Ramirez-Mejia.C., Baldwin, B., Hombuckle, W.E., Tennat, B.C., Gerin, J.L.: Cyclosporin A modulates the course of woodchuck hepatitis infection and induce chronicity. *J. Immunol.*,146: 3138-3144,1991.
38. Courouce AM, Holland P, Muller PV, Soulier JP.: HBs antigen subtypes: Proceedings of the International Workshop on HBs antigen subtypes. *Bibl Hematol*; 42: f-158.1976.
39. Courouce-Pauty AM, Lemaire M, Roux Jf.: New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category. *Vox Sang* ;35:304-30Q ,1978.
40. Dane D S, Cameron, Briggs.: Virus like particules in serum of patients with Australian antigen associated hepatitis. *Lancet*, 1:694-698, 1970.
41. Eble, B.E., MacRae, D.R., Lingappa, V.R., Ganem, D.: Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of hepatitis B surface antigen. *Mole. Cell Biolo.*, 7: 3591-3601, 1987.
42. Eddieston AL, Interferons in the treatment of chronic hepatitis infection. Dixon B (eds), Panine Press, 1990.
43. Ehata T, Omata M, Chuang WL, Yokosuka O, Ito Y, Hosoda K, Ohto M.: Mutations in core nucleotide sequence of hepatitis B virus correlate with fulminant and severe hepatitis. *J Clin Invest* ; 91: 1206-1213, 1993.
44. Ehata T, Omata M, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M. Variations in codons 84-101 in the core nucleotide sequence correlate with hepatocellular injury in chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* ; 89: 332-338, 1992.
45. Etiemble, J., Degott, C., Renard, CA., Fourel, G., Shamooun, B., Vitviski-Trepo, L.,Hsu, T.Y., Toillas, P., Babinet, C.: Liver- specific expression and high

- oncogenic efficiency of a c-myc transgene activated by woodchuck hepatitis virus insertion. *Oncogene*, 9: 727-737, 1994.
46. Fang, Z-L, Ling, R, Wang, S S, Nong, J, Huang C S, and Harrison T J. HBV core promoter mutations prevail in patients with hepatocellular carcinoma from Guangxi, China. *J Med Virol* 56: 18-24, 1998.
 47. Farshid, M., Tabor, E.: Expression of oncogenes and tumor suppressor genes in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines . *J. Med. Virol.*, 38: 235-239, 1992.
 48. Feitelson MA, Duan LX, Guo J, Sun B, Woo J, Steensma K, Horiike N, Blumberg BS.: X region deletion variants of hepatitis B virus in surface antigen-negative infections and non-A, non-B hepatitis. *J Infect Dis* ; 172: 713-722, 1994.
 49. Feitelson, M.A., Duan, L.X. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol.* 150, 1141-1157, 1997
 50. Fujimori, M., Tokino, T., Hino, O., Kitagawa, T., Imamura, T., Okamoto, E., Mitsunobu, M., Ishikawa, T., Nakagawa, H., Harada, H., Yagura, M., Matsubara, K., Nakamura, Y.: Allotype study of primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Resear.*, 51: 89-93, 1991.
 51. Gerlich W H, Goldmann, Muller, Sibbe, Wolff.: Specificity and localization of a hepatitis B virus associated protein kinase. *J. Virol.* 42:762-766, 1982.
 52. Gerlich W H, Robinson.: HBV contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell*, 21:801 -809, 1980.
 53. Gotoh K, Mima S, Uchida T, Shikata T, Yoshizawa K, Irie M, Mizui M.: Nucleotide sequence of hepatitis B virus isolated from subjects without serum anti-hepatitis B core antibody. *J Med Virol* ; 46: 201-206, 1994.
 54. Gozdasoglu R, Dagalp K, Kutluay T.: Hastane personelinde HBsAg ve Ab oranı, *TKI Tıp Bilimleri Araştırma Dergisi.* 1:71 -76, 1983.
 55. Gramantieri, L., Melchiorri, C., Chieco, P., Gaiani, S., Stecca, B., Casali, A. M., Bolondi, L.: Alteration of DNA ploidy and cell nuclearity in human hepatocellular carcinoma associated with HBV infection. *J. Hepatol.*, 25: 848-853, 1996.

56. Guidotti, L.C., Ando, K., Hobbs, M.V., Ishikawa, T., Runkel, R.D., Schreiber, R.D., Chisari, F.V.: Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism of gamma interferon. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,91, 3764-3768, 1994 (a).
57. Guidotti, L.G., Eggerds, M., Raney, A.K., Chi, S.Y., Peters, J.M., Goanzalea , F.J. McLachlan, A.: In vivo regulation of hepatitis B virus replication by peroxisome proliferation. *J. Virol.*, 173: 10377-10386, 1999.
58. Harrison T J.: Genetic variants of HBV. In *Hepatitis B Virus*. Eds. R Koshy and W H Caselman, Imperial College Press, London. pp 93-110. 1998.
59. Hausen, H.Z.: Viruses in human cancers. *Science*, .254: 1167-1172, 1991.
60. Hollinger F B, Glombicki.: Hepatitis A virus. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, In Mandell, Douglas, Benett eds. 1383,London Churchill Livingstone, 1990.
61. Howard T.: *Classification and nomenclature of viruses*. Springer, Vienna, pp 11-116, 1991.
62. Hsia C.C, Yuwen H., and Tabor E.: Hot-spot mutations in Hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma. *Lancet* 348: 625-626, 1996.
63. Hsia CC, Nakashima Y, Tabor E.: Deletion mutants of the hepatitis B virus X gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*; 241: 726-729, 1997.
64. Hsia, C.C., Bisceglie, A.Di., Kleiner, D.E., Farshid, M.Jabor, E.: RB tumor supressor gene expression in hepatocellular carcinomas from patients infected with the hepatitis B virus. *J. Medi. Virol.*, 44: 67-73, 1994,
65. Hunter, T.: Braking the cycle. *Cell*, 75: 839-841, 1993.
66. Jean- Jean O, Weimer, T., De Recondo, A.M., Will, H., Rossignol, J.M.: Internal entry of ribosomes and ribosomal scanning involved in hepatitis B virus P gene expression. *J. Virol.*,63: 5451-5454 , 1989,
67. Jongerius JM, Wester M, Cuypers HT, van Oostendorp WR, Lelie PN, van der Poel CL, van Leeuwen EF.: New hepatitis B virus mutant form in a blood donor that is undetectable in several hepatitis B surface antigen screening assays. *Transfusion* 38: 56-59, 1998.

68. Kanai K, Kako M, Aikawa T, Hino K, Tsubouchi H, Takehira Y, Iwabuchi S, Kawasaki T, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M.: Core promoter mutations of hepatitis B virus for the response to interferon in e antigen-positive chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* ; 91: 2150-2156, 1996.
69. Kane M A, Ghendon Y, Lambert P H.: Hepatitis B in 1990- where are we and where are we going? The WHO programme for control of viral hepatitis, "Viral hepatitis and liver disease, Eds F B Hollinger, S M Lemon, H S Margolis" kitabinda s.706, Williams and Wilkins, Baltimore 1991.
70. Kane M.: Control of hepatitis B virus infection. *Viral Hepatitis management symp. Abstract Book* 16,21-23 May 1992.
71. Kaplan P M, Greenman, Gerin, Purcell, Robinson.: DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virol.* 12:995-1005, 1973.
72. Karasawa T, Aizawa Y, Zeniya M, Kuramoto A, Shirasawa T, Toda G.: Genetic heterogeneity in the precore region of hepatitis B virus in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients: spontaneous seroconversion and interferon-induced seroconversion. *J Med Virol* 45: 373-380, 1994.
73. Kekule, A.S., Lauer, U., Mayer, M., Casselman, W., Hofschneider, P.H., Koshy, R.: The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature*, 343: 457-461, 1990.
74. Kekule, AS., Lauer, U., Weiss, L., Luber, B., Hofschneider, PH.: Hepatitis B virus transactivator HBX uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature*, 361: 742-745,1993.
75. Khakoo, S.I., Grellier.L.F.L., Soni, P. N., Bhattacharya S.,Dusheiko, G.M.: Etiology, screening and treatment of hepatocellular carcinoma. *Med. Clin. North Am.*, 80: 1121-1145,1996.
76. Kılıçturgay K, 1994, *Viral Hepatit*, Kılıçturgay (ed). *Viral Hepatitle Savaşım Derneği*, 1-37, 1994.
77. Krausslich, H.G.: Current topics in microbiology and immunology, morphogenesis and maturation of retroviruses, *Hepatology*, 214: Springer-Verlag, 297-337,1996.
78. Kremsdorf D, Garreau F, Duclos H, Thiers V, Schellekens H, Petit MA, Brechot C.: Complete nucleotide sequence and viral envelope protein expression of a

- hepatitis B virus DNA derived from a hepatitis B surface antigen-seronegative patient. *J Hepatol* ; 18: 244-250, 1993.
79. Laskus T, Persing DH, Nowicki MJ, Mosley JW, Rakela J.: Nucleotide sequence analysis of the precore region in patients with fulminant hepatitis B in the United States. *Gastroenterology*; 105: 1173-1178, 1993.
 80. Lavine, AJ., Momand, J., Finlay, C.A.: The p-53 tumor suppressor gene. *Nature*, 351: 453-456, 1990.
 81. Lavine J., Hirsch, R.: A system for studying the selective encapsidation of hepadna virus RNA.: *J. Virol.*, 63: 4257-4263, 1989.
 82. Lee YI, Hur GM, Suh DJ, Kim SH.: Novel pre-C/C gene mutants of hepatitis B virus in chronic active hepatitis: naturally occurring escape mutants. *J Gen Virol*; 77: 1129-1138 1996.
 83. Lee, William.: Hepatitis B virus infection. *The New Engl.J.Medic.*, 337:1733-1745,1997.
 84. Li J S, Tong S P, Wen Y M, Vitvitski L, Zhang Q, Trepo C.: Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J Virol* ; 67: 5402-5410, 1993.
 85. Liang T J, Hasegawa K, Munoz S J, Shapiro C N, Yoffe B, McMahon B J, Feng C, Bei H, Alter M J, Dienstag J L.: Hepatitis B virus precore mutation and fulminant hepatitis in the United States. A polymerase chain reaction-based assay for the detection of specific mutation. *J Clin Invest* ; 93: 550-555, 1994.
 86. Limmer, J. Fleig, W.E., Leupold, D., Bittner, R., Ditscheuneist, H., Berger, H.G.: Hepatocellular carcinoma in type I glikogen storage disease. *Hepatol.*, 8: 531-537,1988.
 87. Lindh M, Andersson AS, Ousdal A.: Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* ; 175:1285-1293, 1997.
 88. Lindh M, Horal P, Dhillon A P, Furuta Y, Norkrans G.: Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology* ; 24: 494-501, 1996.
 89. Lohr H, Goergen B, Weber W, Godderz W, Meyer zum Buschenfelde K H, Gerken G.: Mixed cryoglobulinemia type II in chronic hepatitis B associated with

- HBe-minus HBV mutant: cellular immune reactions and response to interferon treatment. *J Med Virol*; 44: 330-335 1994.
90. Lok AS, Akarca U, Greene S.: Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4077-4081, 1994.
 91. Lioriot MA, Marcellin P, Talbodec N, Guignon V, Gigou M, Boyer N, Bezeaud A, Erlinger S, Benhamou J P.: Low frequency of precore hepatitis B virus mutants in anti-hepatitis B e-positive reactivation after loss of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*; 21: 627-631 1994.
 92. Maguire, H.F., Hoeffler, J.P., Siddiqui, A.: HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science*, 252 842-844, 1991.
 93. Marinos G, Torre F, Gunther S, Thomas MG, Will H, Williams R, Naoumov NV. Hepatitis B virus variants with core gene deletions in the evolution of chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 1996; 111: 183-192.
 94. Marquardt O, Heeman, Seifer, Gerlich.: Cell type specific expression of a HBV surface antigen. *Arc. Virol.* 96:249-256, 1987.
 95. Mast E E, Alter: Epidemiology of viral hepatitis: an overview. *Seminars in Virol.* 4:273,1993.
 96. McMillan J S, Bowden D S, Angus P W, McCaughan G W, Locarnini S A.: Mutations in the hepatitis B virus precore/core gene and core promoter in patients with severe recurrent disease following liver transplantation. *Hepatology*; 24: 1371-1378, 1996.
 97. McMillan J.S., Shaw ,T., Angus, P. W., Locarnini, S.A.: Effect of immunosuppressive and antiviral agents on hepatitis B virus replication in vitro. *Hepatol*, 22: 36-43.1994.
 98. Mehdi, H., Kaplan, M .J., Aniar F.Y., Yang, X., Bayer, R., Sutherland, K., Peeples, M.E.: Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J. Virol.*, 68: 2415-2422, 1994.
 99. Mehta, R.: The potential for the use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 93: 85-102, 1994.

100. Melegari M, Scaglioni P P, Wands J R.: Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 27: 628-633, 1998.
101. Mizokami M, Nakano T, Onto E, et al.: Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Letters* ;450:66-71, 1999.
102. Molnar-Kimber K.L, Jarocki,W., Dheer, S.K., Vernon S.K, Conley A.J, Davis A.R, Hung P.P. : Distinctive properties of the hepatitis B virus envelope proteins. *J. Virol.*, 62: 407-416, 1988.
103. Monges B, Remade, Payan.: Apport de la microscopie electronique dans l'etude de serum de subject HBsAg positives. *Path Biol*, 29-143, 1981.
104. Moradpour, D., Wands, J.R.: The molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J.Viral Hepatitis*, 1:17-31,1994.
105. Moriyama, T., Guilhot, S., Klopchin, K., Moss, B., Pmkert, C.A.,Palmiter, R.D.,Kanagawa, O.,Chisari, F.V.: Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science*, 248: 361-364,1990.
106. Naoumov N V, Thomas M G, Mason A L, Chokshi S, Bodicky C J, Farzaneh F, Williams R, Perrillo R P.: Genomic variations in the hepatitis B core gene: a possible factor influencing response to interferon alfa treatment. *Gastroenterology* ; 108: 505-514, 1994.
107. Nash A A: Tolerance and suppression in virus diseases. *Britt. Med Bull*, 41:557-561,1984,
108. Nassal, M.: Novel molecular approaches toward therapy of chronic hepatitis B. *Arch. Virol*, 142: 611-628,1997.
109. Nassal, M.: The arginin- rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol.*, 66: 4107-4116, 1992.
110. Neurath, A.R., Kent, S.B., Strick, N., Parker, K.: Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell*, 46: 429-436,1986.

111. Niitsuma H, Ishii M, Saito Y, Miura M, Kobayashi K, Ohori H, Toyota T.: Prevalence of precore-defective mutant of hepatitis B virus in HBV carriers. *J Med Virol* ; 46: 397-402, 1994.
112. Norder H, Courouce AM, Magnius L.: Complete genomes. Phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*; 198:489-503, 1994.
113. Ogata N, Zanetti A R, Yu M, Miller R H, Purcell R H.: Infectivity and pathogenicity in chimpanzees of a surface gene mutant of hepatitis B virus that emerged in a vaccinated infant. *J Infect Dis* ; 175: 511-523, 1997.
114. Okada K, Kamiyama, Inomata, Mayumi.: HBeAg and antiHBe in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of HBV to their infants. *K. N. Engl. J Med*: 294:746-9, 1976.
115. Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M.: Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* ; 68: 8102-8110, 1994.
116. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* ;69:2575- 2583, 1988.
117. Okuda, K.: Hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 32: 225-237, 2000.
118. Olgun N.: Izmir yoresinde HBV'nin perinatal geiş sıklığı. *İnfeksiyon dergisi* 5, 117-120,1991.
119. Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M.: Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med* ; 324: 1699-1704, 1991
120. Ozer A. The molecular structure of the hepatitis B virus (Review). *Marmara Med J* ;8:157-162, 1994.
121. Patzer, E.J., Nakamura, G.R., Simonsen, C.C., Levinson, A.D., Brands, R.:Intracellular assembly and packing of hepatitis B virus surface antigen particle occur in the endoplasmic reticulum. *J. Virol*, 58: 884-892, 1986.
122. Perillo RP.: Transmission and natural history. *Viral Hepatitis Management Symposium*, p. 15 of abstract book, 1992.

123. Pignatelli M, Waters.: Lever CTL responses to the nucleocapsid proteins of HBV in chronic hepatitis. *J Hepatol*, 4:15-21, 1987.
124. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N.: Identification of four conserved motifs among the RNA dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* ; 8: 3867-3874,1989.
125. Pollicino T, Zanetti A R, Cacciola I, Petit M A, Smedile A, Campo S, Sagliocca L, Pasquali M, Tanzi E, Longo G, Raimondo G.: Pre-S2 defective hepatitis B virus infection in patients with fulminant hepatitis. *Hepatology* ; 26: 495-499, 1997.
126. Protzer U, Trippler M, Ohl J, Knolle P, Duchmann R, Meyer zum Buschenfelde K H, Gerken G.: Rare pre-core stop-codon mutant nt. 1897 predominates over wide-spread mutant nt. 1896 in an unusual course of chronic hepatitis B. *J Viral Hepatol* ; 3: 155-162, 1996.
127. Protzer-Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, Berg T, Hopf U, Meyer zum Buschenfelde K H, Neuhaus P, Gerken G.: Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation. *Hepatology* ; 27: 254-263, 1998.
128. Pugh, J.C., and Bassendine, M.F.: Molecular biology of hepadnavirus; replication. *British Medic. Bull.*, 46: 329-353, 1990.
129. Qu ,J-H., Yeh, C.T., Yen, T.S.B.: Transport of hepatitis B virus precore protein in to the nucleus after cleavage of its signal peptide. *J. ViroL*, 63: 5238-5243, 1989.
130. Reifenberg, K., Wilts, H., Lohler, J., Nusser, P., Hanano, R., Guidotti, L.G., Chisari, .F.V.,Schlicht, H.J.: The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression in vivo. *J. ViroL*,73: 10399-10405, 1997.
131. Robinson, W.S.: Molecular Events in the pathogenesis of hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma. *Ann. Rev. Med.*, 45:297-323,1994.
132. Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, Guardia J.: Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* ; 22: 1641-1647, 1994.
133. Rossner, M.T.: Hepatitis B virus X-gene product: A promiscuous transcriptional activator. *J. Med. Virol.*, 36: 101-117.1992.

134. Ruiz PA., Norder H., Robertson BH, Magnius LO.: Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen Virol.*,83: 2059-2073,2002.
135. Sakamoto, M., Hirohashi, S., Tsuda, H., Shimosato, Y., Makucchi, M., Hosoda, Y.: Multicentric independent development of hepatocellular carcinoma revealed by analysis of hepatitis B virus integration pattern. *The Am. J. Surg.Pathol*, 13: 1064-1067, 1989.
136. Schafritz, D.A., Knew, M.C.: Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas. *Hepato*, 1: 1-8,1981.
137. Schepis F, Verucchi G, Pollicino T, Attard L, Brancatelli S, Longo G, Raimondo G.: Outcome of liver disease and response to interferon treatment are not influenced by hepatitis B virus core gene variability in children with chronic type B hepatitis. *J Hepato* ; 26: 765-770, 1997.
138. Schirmaher, P., Wang, H., Stahnke, G., Will, H., Rogler, C.E.: Sequences and structures at hepadnaviral integration recombination sites implicate topoisomeras 1 in hepadnaviral DNA rearrangement and integration. *J. Hepato*, 22:21-33, 1994.
139. Seeger, C., Ganem, D., Varmus, H.E.: Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science*, 232: 477-484, 1986.
140. Shafritz, D.A., Shouval, D., Sherman, H.J., Hadziyannis, S.J., Kew, M.C.: Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *The New Engl. J. Med.*, 305: 1067-1073, 1981.
141. Shiina S, Infiino H, Uta Y, et al.: Relationship of HBsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease. *Am J Gastroenterol* ,86:866-871, 1991.
142. Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremsdorf D, Brechot C.: Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene* ; 18: 4848-4859,1999.
143. Spandau, D. F. and Lee, C.H.: Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J. Virol.*, 62: 427-434, 1988.

144. Sterneck M, Kalinina T, Otto S, Gunther S, Fischer L, Burdelski M, Greten H, Broelsch C E, Will H.: Neonatal fulminant hepatitis B: structural and functional analysis of complete hepatitis B virus genomes from mother and infant. *J Infect Dis* ; 177: 1378-1381, 1998.
145. Su, Q., Schroder, H., Hofmann, W.J., Otto, G., Pichlmay, R., Bannasch , P.: Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 27:1109-1120, 1998.
146. Summers, J., Mason, W.: Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription an RNA intermediate. *Cell*, 29: 403-415, 1982.
147. Summers, J.: Replication cycle of hepatitis B viruses. *Cancer*, 61:1957-1962, 1988.
148. Tassopoulos N C, Volpes R, Pastore G, Heathcote J, Buti M, Goldin R D, Hawley S, Barber J, Condearey L, Gray D F.: Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B.Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology* ; 29: 889-896, 1999.
149. Telenta F E S, Poggio O P, Lopez J L, Gonzalez J, Lemberg A, Campos R H.: Increased prevalence of genotype P hepatitis B virus isolates in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol* 35:1873-1875, 1997.
150. Tennant, B.C., Baldwin, B.H., Graham, L A., Ascenzi, M.A.,Hornbuckle, W. E.. Gerin, J.L.: Antiviral activity and toxicity of filavuridine in the woodchuck model of hepatitis B virus infection. *Hepatology*., 26: 179-191,1998.
151. Tillmann H, Trautwein C, Walker D, Michitaka K, Kubicka S, Boker K, Manns M.: Clinical relevance of mutations in the precore genome of the hepatitis B virus. *Gut* ; 37: 568-573, 1994.
152. Tipples G A, Ma M M, Fischer K P, Bain V G, Kneteman N M, Tyrrell L J: Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers re-sistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* ; 24: 714-717, 1996.
153. Tokino, T., Matsubara, K.: Chromosomal sites for hepatitis B virus integration in human hepatocellular carcinoma. *J. Virol.*, 65: 6761-6764, 1991.

154. Tsuei, D.J., Hsu, T.Y., Chen, J.Y., Chang, M.H., Yang, C.S.: Analysis of integrated hepatitis B virus DNA and flanking cellular sequences in a childhood hepatocellular carcinoma. *J. Med. Virol.* 42: 287-293, 1994.
155. Tuttleman, J., Pourcel, C., Summers, J.: Formation of the pool covalently closed circular viral DNA in hepadna virus infected cells. *Cell*, 47: 451-60, 1986.
156. Twu, JR-Shin and Schloemer R. H.: Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J. Virol.*, 61: 3448-3453, 1987.
157. Urashima, T., Saigo, K., Kobayashi, S., Imaseki, H., Matsubara, H., Koide, Y.A. Takehide, K.Y., Koike, K., Isono, K.: Identification of hepatitis B virus integration in hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma tissues. *J. Hepatol.* 26: 771-778, 1996.
158. Uysal P., Oguzoglu N., Ozer A., "HBV Genotyping Using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) on the Turkish Population", *Marmara Medical Journal*, Vol 14, No. 4 pg 213-216, October 2001.
159. Uysal P.: Akut ve kronik hepatitli hastalarda hepatit B virüsü X geninin yapısı. Yüksek Lisans Tezi, 1999.
160. Wang X.W., Forrester, K., Yeh, H. Feitelson, M.A., Gu, J.R., Harris, C.C.: Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity and associated with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 2230-2234, 1994.
161. Wang, G.H., Seeger, C.: Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. *J. Virol.*, 67: 6506-6512, 1993.
162. Wang, J., Chenivesse, X., Henglein, B., Brechot, C.: Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature*, 343: 555-557, 1990.
163. Waters J A, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, Thomas H C.: Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest* ; 90: 2543-2547, 1992.
164. Wright S, Millward, Sadler, Bull.: *Acute Viral Hepatitis, Liver and Biliary Disease* 2, London, Baillier Tindall, 677, 1987.
165. Yet, C.T., Liaw, Y.F., and Qu, J.H.: The arginine rich domain of hepatitis B virus precore and core proteins contains a signal for nuclear transport. *J. Virol.*, 64: 6141-6147, 1990.

166. Yu, M.W., Lien, J.P., Chiu, Y.H., Santell, R.M., Liaw, Y.F., Chen, C.J.: Effect of aflatoxin metabolism and DNA adduct formation on hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B carriers in Taiwan. *J. Virol.*, 27: 320-330, 1997.
167. Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S, Trepo C.: Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis. *Br J Med Virol*; 48:8-16 1996.
168. Zhou, S., and Standring, D.N.: Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:10046-10050, 1992.
169. Zhou, S., Yang, S.Q., Standring DN.: Characterization of hepatitis B virus capsid particle assembly in *Xenopus* oocytes. *J. Virol.*, 66: 3086-3092, 1992.



9. ÖZGEÇMİŞ

Eğitim	1999–	Marmara Üniversitesi	Istanbul, Türkiye
	•	PhD – Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	
	1996–1999	Marmara Üniversitesi	Istanbul, Türkiye
	•	Yüksek Lisans - Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	
	1992 - 1996	Istanbul Üniversitesi	Istanbul, Türkiye
	•	Lisans – Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	
İş Deneyimi	2001 -	UCL Royal Free Hospital	Londra, UK
	Misafir Öğrenci		
	1999 -	Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi , İstanbul, Türkiye	
	Araştırma Görevlisi		
	1997–1999	Analiz Laboratuvarları	Istanbul, Türkiye
	Laboratuvar Sorumlusu		
	1995 - 1996	Alman Hastanesi	Istanbul, Türkiye
	Laboratuvar Görevlisi		
Katıldığı Kurslar	•	Devam ediyor, Advanced Course in Immunology 2003, 13 Jan-17 Mar 2003, Windeyer Institute-UCL UK.	
	•	Biological Safety in Laboratories, 7 Nov 2001, Occupational Health & Safety Department, Royal Free Campus- UCL UK.	
Yabancı Dil	İngilizce (İleri düzey), Almanca (Orta düzey)		
Poster ve Yayın Listesi	•	Uysal P., Oguzoglu N., Ozer A., “ <i>Fragment Length Polymorphism (RFLP): Optimisation of the method for HBV genotyping in randomly sampled Turkish clinical patients</i> ”, IV. National Hepatology Conference, 14-16 June 2001, Istanbul – Turkey	
	•	Uysal P., Oguzoglu N., Ozer A., “ <i>HBV Genotyping Using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) on the Turkish Population</i> ”, AASLD 52. Annual Meeting, 9-13 November 2001, Dallas, Texas – USA, Vol. 34, No. 4, Pt. 2 of 2	

- Uysal P., Oguzoglu N., Ozer A., “*HBV Genotyping Using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) on the Turkish Population*”, Marmara Medical Journal, October 2001, Istanbul – Turkey, Vol 14, No. 4 pg 213-216
- Uysal P., Oguzoglu N., Ozer A., “*Pre core- core Regions Mutation Analysis of Hepatitis B Virus among Turkish Patients*”, VI. National Viral Hepatitis Meeting, 31 October-2 November 2002, Ankara- Turkey
- Uysal P., Oguzoglu N., Ozer A., “*Polymorphism Analysis of Pre core- core Region of Hepatitis B Virus in the Turkish Population*”, AASLD 53. Annual Meeting, 1-5 November 2002, Boston, Massachusetts – USA

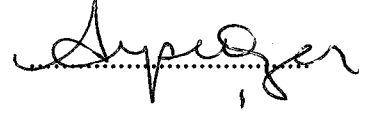


SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

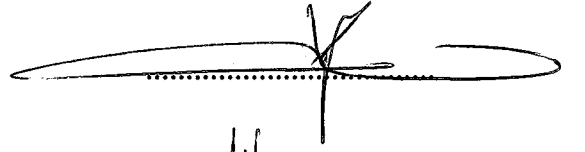
Doktora öğrencisi Pınar UYSAL ONGANER'in, çalışması jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

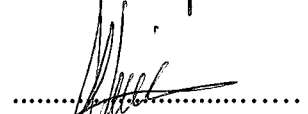
Tez Danışmanı : Prof.Dr.Ayşe ÖZER
Üniversitesi : Marmara



Üye : Prof.Dr.Beyazıt ÇIRAKOĞLU
Üniversitesi : Marmara



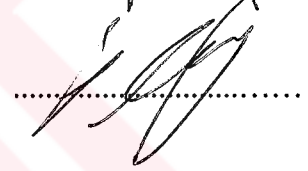
Üye : Prof.Dr.Selma YILMAZER
Üniversitesi : İstanbul



Üye : Prof.Dr.Güner SÖYLETİR
Üniversitesi : Marmara



Üye : Yrd.Doç.Dr.İlter GÜNEY
Üniversitesi : Marmara



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 26 / 03 / 2003 tarih ve 02 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Müdür

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ