

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEPATİT B VİRUSU (HBV) İLE KRONİK ENFEKTE  
HASTALARDA HBV BAZAL KOR PROMOTER/PREKOR  
GEN MUTASYONLARI VE GENOTİP  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Seda TEZCAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ

MERSİN- 2009

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEPATİT B VİRUSU (HBV) İLE KRONİK ENFEKTE  
HASTALARDA HBV BAZAL KOR PROMOTER/PREKOR  
GEN MUTASYONLARI VE GENOTİP  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Seda TEZCAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından “SBE TM (ST) 2008-9 DR” nolu proje olarak desteklenmiştir.

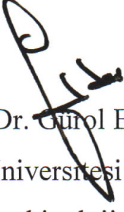
Tez No: .....

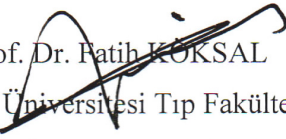
MERSİN- 2009

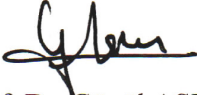
**Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**


Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan  
**“Hepatit B Virus (HBV) ile Kronik Enfekte Hastalarda HBV Bazal Kor  
Promoter/Prekor Gen Mutasyonları ve Genotip Değerlendirilmesi”** adlı çalışma,  
aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

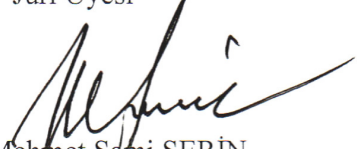
Tez Savunma Tarihi 16/11/2009

  
Prof. Dr. Gürül EMEKDAŞ  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı/Danışman

  
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

  
Prof. Dr. Gönül ASLAN  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

  
Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

  
Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN  
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı  
kararı ile kabul edilmiştir.

  
Enstitü Müdürü  
Doç Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans, doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince, her konuda yardım ve desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, görüşleriyle beni yönlendiren, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkını ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a;

Lisansüstü eğitimim süresinde emeği geçen, destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU ve Sayın Doç. Dr. Feza OTAĞ'a;

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN'e;

Tez çalışmamız için gerekli hasta serum örneklerinin toplanmasında yardımcı olan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Orhan SEZGİN, Sayın Doç. Dr. Engin ALTINTAŞ ve Uzm. Dr. Enver ÜÇBİLEK'e;

Tezimin bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN ve Araştırma Görevlisi İter HELVACI'ya;

Tez çalışmam sırasında laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'mızda görev yapan tüm arkadaşlarıma;

Teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni manevi açıdan sürekli olarak destekleyen aileme;

Sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
ÖZET.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. HBV'unun Genomik Yapısı ve Gen Ürünleri.....	8
2.2. HBV Genleri.....	10
2.2.1. S Geni.....	10
2.2.2. C Geni.....	10
2.2.3. X Geni.....	11
2.2.4. P Geni.....	11
2.3. HBV Enfeksiyonunun Replikatif Siklusunu.....	12
2.4. HBV Enfeksiyonunun İmmunolojik Özellikleri.....	18
2.5. HBV-DNA'sında Meydana Gelen Dizi Değişiklikleri.....	19
2.5.1. HBV Genotipleri ve Alt Genotipleri; HBsAg Alt Tipleri.....	20
2.5.1.1. HBV Sekans Heterojenitesi.....	24
2.5.1.2. HBV Genotiplerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	24
2.5.2. HBV Enfeksiyonunun Doğal Seyri Sırasında Mutant Virüslerin Gelişmesi.....	25
2.5.2.1. HBcAg ve HBeAg.....	26
2.5.2.2. Kronik HBV Enfeksiyonu ve HBeAg.....	27
2.5.3. Kronik HBV Enfeksiyonu Sırasında Gelişen Mutantlar.....	28
2.5.3.1. Prekor Gen Bölgesindeki Mutasyonlar.....	28
2.5.3.1.1. HBV Genotip ve Prekor Gen Mutasyonlarının İlişkisi.....	31

2.5.3.2. Kor Promoter (Bazal Kor) Gen Bölgesindeki Mutasyonlar.....	33
2.5.3.3. Kor Gen Bölgesindeki Mutasyonlar.....	37
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) Tekniği.....	37
2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri.....	40
2.6.2. “Hot Start” (Sıcak Başlangıç) PCR Tekniği.....	45
2.6.3. “Nested” PCR Tekniği.....	45
2.7. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analizi.....	47
2.8. Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi.....	48
2.9. DNA Dizi Analizi.....	49
2.9.1. Dizi Analizi Uygulamaları.....	50
2.9.2. DNA Dizi Analizi Yöntemleri.....	51
2.9.3. Dizi Verilerinin Değerlendirilmesi.....	56
2.10. Moleküler Filogenetik Analizi.....	57
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>59</b>
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	59
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	59
3.1.2. Kullanılan Bilgisayar Yazılım Programları.....	60
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	60
3.1.4. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	61
3.1.4.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar.....	61
3.1.4.2. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar.....	62
3.2. Serum Örneklerinin Toplanması.....	63
3.3. Yöntemler.....	64
3.3.1. Biyokimyasal Analiz.....	64
3.3.2. Serolojik Analiz.....	64
3.3.2.1. HBV Serolojik Belirteçlerinin Tespiti.....	64
3.3.3. Moleküler Analiz.....	64
3.3.3.1. Serum HBV DNA Seviyelerinin Kantitatif Olarak Tespit Edilmesi.....	64
3.3.3.2. Bazal Kor/Prekor Mutasyonlarının Tespit Edilmesi.....	65
3.3.3.2.1. DNA Ekstraksiyonu.....	65
3.3.3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulaması.....	66
3.3.3.2.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi.....	69

3.3.3.3. DNA Dizi Analizi.....	70
3.3.3.3.1. Dizi Analizi Verilerinin Analizi.....	72
3.3.3.4. HBV Genotiplerinin Belirlenmesi.....	73
3.3.3.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulaması.....	73
3.3.3.4.2. RFLP Analizi.....	75
3.3.3.5. Pre-S Gen Bölgesinin Dizi Analizi.....	76
3.3.3.5.1. Dizi Analizi Verilerinin Analizi.....	76
3.3.3.5.2. Filogenetik Analiz.....	77
3.3.4. İstatistiksel Analiz.....	77
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>78</b>
4.1. Serum Biyokimyasal Analiz Sonuçları.....	78
4.2. Serum HBV Belirteçleri.....	78
4.3. Serum HBV DNA Seviyeleri.....	79
4.4. Bazal Kor/Prekor Gen Bölgesinde Tespit Edilen Mutasyonlar.....	80
4.5. HBV Genotiplerinin Belirlenmesi.....	91
4.5.1. Hasta Örneklerinin PCR-RFLP Genotipleme.....	91
4.5.2. Hasta Örneklerinin Filogenetik Analiz İle Genotiplerinin Belirlenmesi.....	96
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>107</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>120</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>123</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>132</b>
<b>EK-1.....</b>	<b>132</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>139</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HBV genomik organizasyonu.....	9
Şekil 2.2. Hepadnavirus replikasyon şeması.....	13
Şekil 2.3. HBV genomunun sirküler haritası.....	16
Şekil 2.4. RNA elementinin çift boyutlu yapısı.....	17
Şekil 2.5. HBV prekor ve kor gen ürünleri.....	27
Şekil 2.6. Prekor gen bölgesinde, pregenomik RNA'nın polimeraza bağlanan U şeklindeki (hairpin) yapısı .....	29
Şekil 2.7. Kor promoter ve prekor dizileri ile TA değişimi ve G1896A (stop kodon) mutasyonunun yerleşimi.....	30
Şekil 2.8. HBV prekor gen “ilmik gövde” (stem loop) bölgesi ve genotipler ile ilişkisi.....	32
Şekil 2.9. PCR aşamaları.....	38
Şekil 2.10. Zincir uzaması.....	39
Şekil 2.11. PCR döngüleri.....	40
Şekil 2.12. “Nested” PCR tekniğinin şematik gösterimi.....	46
Şekil 2.13. DNA dizi analizi ile DNA nükleotid dizilerinin ortaya çıkarılması.....	50
Şekil 2.14. Deoksi ve dideoksinükleotid.....	54
Şekil 2.15. Deoksinükleotidlerle uzamış ve dideoksi nükleotidler ile sonlanmış çeşitli uzunlukta diziler.....	54
Şekil 2.16. Nükleotidin poliakrilamid jel elektroforezi.....	55
Şekil 2.17. Otomatize sistemlerde oluşan nükleotid renk pikleri.....	56
Şekil 3.1. HBV bazal kor promoter ve prekor gen bölgeleri.....	67
Şekil 4.1. Bazal kor/prekor gen bölgesinin yaklaşık 330 bp hizasındaki amplifikasyon ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	81
Şekil 4.2. Bütün hastaların bazal kor ve prekor gen bölgelerinin DNA dizileri.....	82
Şekil 4.3. “Hot start” PCR tekniği ile çoğaltılan ~446 bp ve 300 bp hizasındaki pre-S gen bölgesinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.....	92
Şekil 4.4. Anormal sonuç veren örneklerin PCR görüntüleri.....	93
Şekil 4.5. Serum örneklerinden HBV pre-S gen bölgesi PCR-RFLP analizi sonucu elde	



edilen kesim paternleri.....	94
<b>Şekil 4.6.</b> HBV pre-S gen bölgesinin PCR-RFLP analizi sonucu elde edilen en yaygın kesim paternleri.....	96
<b>Şekil 4.7.</b> 18 çalışma ve 43 GenBank'dan elde edilen HBV dizisinin pre-S gen bölgesinin filogetik analizi ile oluşturulan filogenetik ağaç.....	98
<b>Şekil 4.8.</b> AY721607 referans HBV genotip D pre-S gen dizisinin <i>AvaII</i> ve <i>MboI</i> restriksiyon haritası.....	99
<b>Şekil 4.9.</b> AY796031 referans HBV genotip D2 pre-S gen dizisinin <i>AvaII</i> ve <i>MboI</i> restriksiyon haritası.....	100
<b>Şekil 4.10.</b> AY741796 referans HBV genotip D1 pre-S gen dizisinin <i>AvaII</i> ve <i>MboI</i> restriksiyon haritası.....	100
<b>Şekil 4.11.</b> Dizi analiz yapılan 18 örneğe ait pre-S gen bölgesinin <i>AvaII</i> ve <i>MboI</i> restriksiyon alanları.....	101
<b>Şekil 4.12.</b> GENEDOC programında dizisi çıkarılan 18 örnek ile 43 referans HBV dizisi.....	103

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> <i>Hepadnaviridae</i> ailesi.....	4
<b>Çizelge 2.2.</b> Aminoasitler ile HBsAg alt tipi'nin tahmin edilmesi ve HBV ORF'lerinin tahmin edilen DNA dizisi.....	21
<b>Çizelge 2.3.</b> HBV genotip ile HBsAg alt tipleri arasındaki sabit ilişki ve başlıca coğrafik dağılımları.....	22
<b>Çizelge 2.4.</b> Türkiye'de HBV genotiplerinin dağılımı.....	23
<b>Çizelge 2.5.</b> Bazal kor promotör ve prekor gen bölgelerinde bildirilen önemli mutasyonlar.....	36
<b>Çizelge 3.1.</b> Bazal kor/prekor gen bölgelerini hedefleyen spesifik primer dizileri .....	67
<b>Çizelge 3.2.</b> Bazal kor/prekor gen bölgesinin amplifikasyonunda her bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	68
<b>Çizelge 3.3.</b> Birinci ve ikinci tur bazal kor/prekor PCR koşulları.....	69
<b>Çizelge 3.4.</b> “Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit” bileşenleri.....	70
<b>Çizelge 3.5.</b> “Cycle Sequencing” reaksiyonunda uygulanan sıcaklık ve süreleri.....	71
<b>Çizelge 3.6.</b> IUPAC tek harf kodları.....	72
<b>Çizelge 3.7.</b> HBV genotiplerinin tespitinde kullanılan pre-S gen bölgesini hedefleyen primer dizileri.....	74
<b>Çizelge 3.8.</b> HBV genotiplerinin belirlenmesinde, RFLP analizinde kullanılan enzimler.....	74
<b>Çizelge 3.9.</b> Pre-S gen bölgesinin amplifikasyonunda her bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	74
<b>Çizelge 3.10.</b> Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri.....	75
<b>Çizelge 3.11.</b> Restriksiyon enzimleri ile inkubasyon koşulları.....	76
<b>Çizelge 4.1.</b> HBeAg negatif ve HBeAg pozitif hasta serumlarında ALT, AST ve DNA düzeylerinin ortanca değeri.....	79
<b>Çizelge 4.2.</b> Hastaların demografik ve klinik özellikleri.....	80
<b>Çizelge 4.3.</b> HBeAg negatif ve HBeAg pozitif hastalarda bazal kor ve prekor gen bölgelerinde en sık görülen mutasyonların dağılımı.....	87

<b>Çizelge 4.4.</b> Bazal kor ve prekor gen bölgelerinde görülen mutasyon paternlerinin dağılımı.....	89
<b>Çizelge 4.5.</b> Bazal kor/prekor gen bölgelerindeki mutasyonların HBeAg negatif ve pozitiflerdeki dağılımı.....	89
<b>Çizelge 4.6.</b> HBV bazal kor ve prekor mutasyonlarının tespit edilemeyen düzeydeki HBeAg ile ilişkisi.....	91
<b>Çizelge 4.7.</b> Bazal kor 1753. nt, 1762/1764. nt mutasyonları ve prekor 1896. nt mutasyonları ile serum ALT, AST ve HBV DNA seviyeleri arasındaki ilişki.....	91
<b>Çizelge 4.8.</b> Amplifiye edilen PCR fragment büyüklükleri ve <i>AvaII</i> ve <i>MboI</i> ile kesim sonrası tahmin edilen RFLP paternleri.....	95
<b>Çizelge 4.9.</b> Tüm örneklerin PCR-RFLP sonucu ve genotip değerlendirilmesi.....	102

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>aa</b>	Aminoasit
<b>ALT</b>	Alanin Amino Transferaz
<b>Anti-HBc</b>	Hepatit B kor (core) antikoru
<b>Anti-HBe</b>	Hepatit B “e” antikoru
<b>Anti-HBs</b>	Hepatit B yüzey (surface) antikoru
<b>Anti-HBx</b>	Hepatit B x antikoru
<b>Arg</b>	Arjinin
<b>bp</b>	Base Pair (Baz Çifti)
<b>cccDNA</b>	Covalently Closed Circular DNA (kovalent olarak bağlanmış sirküler DNA)
<b>cDNA</b>	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
<b>dATP</b>	Deoksiadenozin Trifosfat
<b>dCTP</b>	Deoksisitozin Trifosfat
<b>ddNTP</b>	Dideoksiribonükleotid Trifosfat
<b>dGTP</b>	Deoksiguanozin Trifosfat
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleotid Trifosfat
<b>DR1</b>	Direkt Tekrar Dizisi-1 (Direct Repeat-1)
<b>DR2</b>	Direkt Tekrar Dizisi-2 (Direct Repeat-2)
<b>dsDNA</b>	Çift Zincirli DNA
<b>dTTP</b>	Deoksitimidin Trifosfat
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>ER</b>	Endoplazmik Retikulum
<b>Et-Br</b>	Etidyum Bromid
<b>HBcAg</b>	Hepatit B kor (core) antijeni
<b>HBeAg</b>	Hepatit B “e” antijeni
<b>HBsAg</b>	Hepatit B yüzey (surface) antijeni

<b>HBV</b>	Hepatit B Virus
<b>HBxAg</b>	Hepatit B x antijeni
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency virus (İnsan immün yetmezlik virusu)
<b>HNF-1</b>	Hepatosit Nükleer Faktör-1
<b>HSK</b>	Hepatosellüler Karsinoma
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>Kb</b>	Kilobaz
<b>KCl</b>	Potasyum Klorür
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>L</b>	Large
<b>LIPA</b>	Line Probe Assay (ters hibridizasyon DNA probe tekniği)
<b>Lys</b>	Lizin
<b>M</b>	Medium
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	Magnezyum İyonu
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum Klorür
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mRNA</b>	Mesenger RNA (Mesaj taşıyan RNA)
<b>nt</b>	Nükleotid
<b>ORF</b>	Open Reading Frame (Açık okuma çerçevesi)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>pgRNA</b>	Pregenomik RNA
<b>Pol</b>	Polimeraz
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>RT</b>	Reverse Transkriptaz
<b>S</b>	Small
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat

<b>S gen</b>	Yüzey geni
<b>ssDNA</b>	Tek Zincirli DNA
<b>TBE</b>	Tris-Borik Asit-EDTA
<b>Tris-HCl</b>	Tris-Hidroklorid
<b>UV</b>	Ultraviole (Mor ötesi)
<b><math>\epsilon</math></b>	Epsilon
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	Mikrolitre

## ÖZET

### Hepatit B Virusu (HBV) ile Kronik İnfekte Hastalarda HBV Bazal-Kor Promoter/Prekor Gen Mutasyonları ve Genotip Değerlendirilmesi

Hepatit B Virusu (HBV) genotipleri oldukça farklı coğrafik dağılıma sahiptir. Ayrıca HBV genomunun bazal kor promoter ve prekor gen bölgelerinde oldukça fazla genetik değişkenlik tanımlanmıştır. Bazal kor promoter ve prekor gen bölgeleri viral replikasyon ve “e” antijen sentezinde öneme sahip olduğu için, yaptığımız tez çalışmasında bu bölgeler doğal olarak meydana gelen mutasyonlar yönünden ve bu mutasyonların genotip ve “e” antijen durumu ile olan ilişkisi incelenmiştir. Ayrıca çalışmada, oldukça sınırlı bir coğrafi bölge olan Mersin ilinde daha önce çalışılmamış olan HBV genotiplerinin lokal olarak tanımlanması, bazal kor ve prekor gen bölgelerindeki genetik heterojenitenin araştırılması ve sonrasında da predominant olarak görülen mutasyon paternlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) ile tespit edilebilir DNA'ya sahip 54 adet kronik hepatit B hastası toplanmıştır. Kronik HBV enfeksiyonlu bütün hastaların, serum HBV DNA düzeyi, serolojik markırlar (HBsAg, Anti-HBs, HBeAg, Anti-HBe, Anti HBc) ve biyokimyasal profili analiz edildi. HBV genotipi, pre-S geninin PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analizi ile belirlendi. Bazal kor promoter ve prekor gen bölgeleri PCR ile belirlendi ve bu bölgelerdeki mutasyon, PCR ürünlerinin direkt dizi analizi belirlenmesinden sonra bilinen wild-tip HBV genotipleri ile hizalanarak karşılaştırılması ile tespit edildi.

Çalışmadaki 54 hastanın 35 (%64.8)'i HBeAg negatif ve 19 (%35.2)'u ise HBeAg pozitifdir. HBV DNA ortanca değeri, HBeAg pozitif hastalarda, HBeAg negatifler ile karşılaştırıldığında belirgin olarak yüksek bulunmuştur ( $P=0.001$ ). HBeAg pozitif ve HBeAg negatif hastalar arasında ALT ( $P=0.356$ ) ve AST ( $P=0.800$ ) düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Hastaların hepsinde (%100) D genotipi bulunmuştur. Bazal kor promoter (1753-1762/1764) ve/veya prekor (1896) mutasyonları serumunda tespit edilir düzeyde DNA bulunan hastaların %87.75 (43/49)'inde bulunmuştur. HBeAg negatif hasta grubunda mutasyon oranı %97.1 (33/34) ve HBeAg pozitif hasta grubunda ise %66.7 (10/15) olarak tespit edilmiştir ( $P=0.008$ ). Prekor G1896A mutasyonu HBeAg negatif hastalarda, HBeAg pozitif olanlardan oldukça yaygın olarak bulunmuştur (%73.5 - %20,  $P=0.001$ ). İki grup arasında meydana gelen bazal kor promoter mutasyonları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $P=0.331$ ), buna karşın bazal kor promoter ve prekor birlikte mutasyon oranı HBeAg negatif hastalarda oldukça yüksek olarak bulunmuştur ( $P=0.008$ ). Bazal kor ve/veya prekor stop kodon

mutasyonuna sahip hastaların serum HBV DNA seviyeleri ile mutasyona uğramamış virus taşıyan hastalar arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmıştır.

Yaptığımız bu çalışma, Mersin’de görülen başlıca genotipin, genotip D olduğunu göstermiştir. Hastaların önemli bir kısmı basal kor ve prekor varyantları ile infektidir. Birden fazla gen bölgesinde görülen mutasyonlar ise oldukça yaygındır. Prekor gen bölgesinde görülen G1896A stop kodon mutasyonu ise Mersin ilindeki HBV ile kronik olarak infekte hastalardaki HBeAg kaybında önemli bir role sahip olarak görünmektedir.

**Anahtar kelimeler: Hepatit B virus, hepatit B “e” antijeni (HBeAg), nükleotid mutasyonu, bazal kor promotör, prekor, genotip**



## ABSTRACT

### Basal Core Promoter/Precore Gene Mutations in Chronically Infected Patients with Hepatitis B Virus and Genotype Evaluation

Hepatitis B virus (HBV) genotypes have distinct geographic distribution. Moreover much genetic variability has been described in basal core promoter and precore gene regions of HBV genome. Since basal core promoter and precore regions important to viral replication and “e” antigen synthesis, these regions were examined for naturally occurring mutations and their correlations with the genotype and “e” antigen status. Furthermore the aim of present study, local definition of HBV genotypes, investigation to genetic heterogeneity and then determination predominant mutation patterns of basal core and precore region, because of has not been studied previously, in our restricted region, Mersin-Turkey.

A total of 54 chronic hepatitis B patients with detectable HBV DNA by a polymerase chain reaction (PCR) were enrolled in the study. Serum HBV DNA level, serological markers (HBsAg, Aanti-HBs, HBeAg, anti-HBe, Anti HBc) and biochemical profile (ALT and AST) were analyzed in all patients with chronic HBV infections. Genotype of HBV was determined by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) base on pre-S gene. Basal core promoter and precore gene regions were determined by PCR and mutations of these regions were determined direct sequencing of PCR products then aligned with known wild-type HBV sequences.

Of the 54 patients, 35 (64.8%) were HBeAg negative and 19 (35.2%) were HBeAg positive. HBV DNA median values were found significantly higher than HBeAg positive patients compared with HBeAg negative patients ( $P= 0.001$ ). There were not found significant relation to ALT ( $P= 0.356$ ) and AST ( $P= 0.800$ ) levels in between HBeAg positive and negative patients. HBV genotype D was found in 100% of the patients. Basal core promoter (1753-1762/1764) and/or precore (1896) mutations were detected in 87.75% (43/49) out of patients with detectable DNA levels in serum. In HBeAg negative patient group, mutation rate were detected in 33/34 (97.1%) and in 10/15 (66.7%) of the HBeAg positive patient group ( $P= 0.008$ ). Precore G1896A mutation was more common found in HBeAg negative samples than in HBeAg positive samples (73.5% vs. 20%,  $P= 0.001$ ). There was no significant differences in the occurrence basal core promoter mutations between the two groups ( $P= 0.331$ ), while the rate of basal core plus precore mutants was higher in HBeAg negative patients ( $P= 0.008$ ).

Our study shows that type D is the main HBV genotype in Mersin, Turkey. Significant numbers of patients have basal core and precore variants. Mutations at more than one site are common. G1896A stop codon mutation in precore region

**seems to have a significant role in the loss of HBeAg in our patients from restricted region, Mersin. Serum HBV DNA levels of having basal core mutation and/or precore stop codon mutation were not significant different from the other non-mutated virus carrying patients.**

**Key words: Hepatitis B virus, hepatitis B “e” antigen (HBeAg); nucleotide mutation; basal core promoter, precore, genotype**

# 1. GİRİŞ

Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu tüm dünyada mevcut olan yaygın bir sağlık problemidir. Dünya çapında yaklaşık olarak 2 milyar insan HBV ile enfekte olup, bunlardan 350 milyonunda kronik HBV enfeksiyonu geliştiği bildirilmektedir. Kronik hepatitin klinik seyri ve gelişen sekeller enfekte bireyler arasında değişkenlik göstermektedir (1). Enfeksiyon akut kendini sınırlayan hastalık ve inaktif taşıyıcılıktan, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinomayı (HSK) içine alan kronik karaciğer hastalığına kadar değişen oldukça geniş bir klinik görünümüne sahiptir (2).

Viral faktörler ve konak immün yanıtı, HBV enfeksiyonunun patogenezi ve klinik sonucundan sorumlu tutulmaktadır. Aktif replikasyon sırasında üretilen yüksek viral kopya sayısı ve HBV polimerazın hata düzeltme (proof reading) aktivitesinin olmaması nedeni ile HBV, konak immunitésinin baskısı altında yüksek mutasyon oranına sahiptir (1).

HBV genomik dizi varyasyonlarının hepatit B “e” antijeni (HBeAg) ekspresyonuna etki edebileceği bildirilmektedir (3). HBV’nin bazal kor ve prekor gen bölgelerinde, HBV replikasyon yeteneğini ters yönde etkilemeksizin HBeAg sentezini azaltabilen veya önleyebilen çeşitli mutasyonlar gelişmektedir. Bu hastalardaki klinik sendrom: en az 6 ay süresince hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) pozitif, serumda tespit edilebilir DNA seviyesi ile birlikte HBeAg negatif, HBe antikoru (anti-HBe) pozitif ve yüksek aminotransferaz (AST veya ALT) seviyesi ile ortaya konulan aktif karaciğer hastalığı, sirozun bulunduğu veya bulunmadığı ya da klinik siroz belirtileri ile kronik hepatiti gösteren karaciğer histolojisi; “HBeAg negatif kronik hepatit B” olarak adlandırılabilir (4).

HBeAg negatif kronik hepatit B ilişkili olarak en yaygın çalışılan mutasyon, prekor bölgesinde, HBeAg sentezini prematür bir şekilde sonlandıran, 1896. nükleotid (nt)’de guanin (G)’nin adenin (A)’e dönüşmesi ile stop kodon (TAG) oluşumuna neden olan nükleotid değişimidir. Kor promoter bölgesi, prekor bölgesinin transkripsiyonunu düzenlemektedir. Bu sebeple, bu bölgedeki bazı mutasyonlar HBeAg sentezini etkileyebilmektedir. Özellikle 1762. nt’de timin (T)’den A’e ve 1764. nt’de A’dan G’e

dönüşüm ile karakterize ikili (dual) mutasyon, prekor ulak RNA (mesanger RNA, mRNA) ve HBeAg üretimini azaltabilmektedir (4).

HBV nükleotid dizisinin tamamındaki %8'den fazla veya yüzey geni (S gen) dizilerindeki %4'den fazla nükleotid dizi ayrımına göre, virusun A'dan H'ye kadar sekiz genotipi belirlenmiştir. HBV genotipleri açık bir şekilde coğrafi dağılım farklılığı ve etnik özellik göstermekle birlikte, genotiplerin hastalığın klinik özelliklerine, seyrine ve antiviral tedaviye karşı yanıtına da etki ettiği ortaya konmuştur. Bazal kor 1762/1764. nt'lerdeki ve prekor 1896. nt mutasyonunun prevalansının toplumun etnik yapısı, HBV genotipleri ve hastalığın ciddiyeti ile ilişkili olabileceği bildirilmektedir. Ayrıca HBeAg negatif hastalarda mutasyon oranı, HBeAg pozitif olan gruplardan daha yüksek olduğu belirtilmektedir (5).

HBV enfeksiyonunun coğrafik dağılımında ülkemizdeki prevalansın orta düzeyde olduğu ve 3-4 milyon insanın kronik olarak enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizde yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda %100 oranında genotip D'nin görüldüğü bildirilmektedir (6, 7, 8). Daha önce yapılan çalışmalarda, HBeAg pozitif ve negatif kronik HBV hastalarında HBV genomunun bazal kor promoter, prekor ve kor gen bölgelerinde mutasyonlar tanımlanmıştır. Yapılan bu çalışmalarda HBeAg negatif fenotipin virusun prekor gen bölgesindeki mutasyonla ilişkili olduğu belirtilmiştir (6, 7).

Predominant olarak D genotipinin görüldüğü ülkemizde bu mutasyonların prevalansı ve klinik önemi ile ilgili oldukça sınırlı sayıda çalışmalara rastlanmıştır ve diğer bölgelerden de çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir.

Bu doğrultuda, yapılan bu tez çalışmasında, HBV ile kronik olarak enfekte hastalardaki viral genomun bazal kor promoter ve prekor gen bölgelerindeki genetik heterojenitenin araştırılması ve böylece predominant olarak görülen mutasyonların belirlenmesi planlanmıştır. Ayrıca virusun coğrafi olarak dağılımının değişkenliği ve farklı coğrafik bölgeler arasındaki göçlerin olabileceği de göz önünde bulundurularak, çalışılan hastaların HBV genotiplerinin de araştırılması amaçlanmıştır.

Hiç şüphesiz ki HBV'nün moleküler morfolojisi ile hastalığın klinik seyri arasında sıkı bir ilişki vardır. Başlangıçta wild-tip HBV virusu ile enfekte bireylerde, konak bireyin immun baskısı altında gelişen kronik enfeksiyonun seyri sırasında dereceli olarak mutant suşlar meydana gelmektedir. Bu viral mutasyonların durumunun

anlaşılması ise hiç şüphesizdir ki, HBV enfeksiyonuna karşı doğru immunoprofilaksi ve antiviral tedavi stratejilerinin tasarlanmasına yardımcı olacaktır. Yaptığımız bualışma bölgemizde ilk defa gerçekleştirilmiş olacak ve bu olası mutasyonların oranı ve paterni ortayaıkarılarak, virusun sahip olduğu genetikeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Hepatit B virus (HBV) *Hepadnaviridae* ailesine bağılı bir hepatotropik DNA virusudur (9, 10, 11). “*Hepa*, hepatotropik özelliğinden, *dna* ise DNA genomuna sahip olmasından gelmektedir. Hepadnaviruslar iki genus içermektedir (Çizelge 2.1). *Orthohepadnavirus* genusu memeli viruslarını, *Avihepadnavirus* genusu ise kuş viruslarını içermektedir (12).

Memeli virusları; insanların HBV’unu, dağ sıçanı HBV’unu (woodchuck HBV-WHBV), tarla sincabı HBV’unu (ground squirrel HBV-GSHV) ve siyah derili büyük maymunlar (woolly monkey), orangutanlar, goriller, gibbonlar ve şempanzeleri kapsayan Eski Dünya ve Yeni Dünya primat viruslarını içermektedir. Primat viruslarının hepsi birbiri ile yakın ilişkilidir ve genellikle tek bir virus türünün suşları olarak kabul edilmektedirler. Ancak bunlardan sadece woolly monkey virusu, diğerlerinden %20 oranında nükleotid dizi farklılığı gösterdiği için, ayrı bir tür olarak kabul edilmektedir. İnsan virusu dışındakiler de, non-human primat virusları olarak ayrılmaktadır. Rodent virusları ise, primat viruslarından farklı olup, HBV’den %40 oranında çeşitlilik göstermektedir (12).

Kuş virusları; duck HBV’unu (DHBV), heron (balıkçıl) HBV’unu (HHBV), Ross’ goose HBV’unu, snow goose HBV’unu ve stork HBV’unu içermektedir. Bu viruslar oldukça yaygın görülmekte olup, Kuzey Amerika’da yaşayan balıkçılların %50 kadarının doğal olarak HHBV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Kuş virusları farklı kökenden gelmektedirler. Bu viruslar, başka bir kuş virusu ile yakın ilişkili olup, memeli virusları ile oldukça uzak ilişkilidirler (12).

İsminden de anlaşıldığı gibi, bilinen tüm hepadnaviruslar hepatotropik olup, karaciğer hücrelerini enfekte etmektedirler ve doğal konaklarında hepatite neden olabilmektedirler. Tüm hepatit virusları, oldukça dar konak aralığına sahip olup, en azından hücreye girişte kullandıkları reseptörlerin benzerlikleri ile belirlenebilmektedirler (12).

**Çizelge 2.1.** *Hepadnaviridae* ailesi (HSK; hepatosellüler karsinoma) (12).

Genus/üyeler	Virus isim kısaltmaları	Doğal konak(ları)	Taşınma	Hastalık
<i>Orthohepadnavirus</i>				
Hepatit B virus	HBV	İnsanlar, şempanzeler, gibbonlar	Horizontal, vertikal, enjeksiyonla ilaç kullananlar, cinsel, kan	Asemptomatik taşıyıcılık, hepatit, siroz, HSK
Ground squirrel hepatit B	GSHV	Tarla sincapları (ground squirrel), dağ sıçanları (woodchuck), çizgili sincaplar	Horizontal, cinsel, kan	Asemptomatik taşıyıcılık, hepatit, HSK
Woodchuck hepatit B	WHBV	Dağ sıçanları (woodchuck)	Horizontal, cinsel, kan	Asemptomatik taşıyıcılık, hepatit, HSK
Woolly monkey hepatit B	WMHBV	Siyah derili büyük maymunlar (woolly monkey)	Horizontal, cinsel, kan	Hepatit
<i>Avihepadnavirus</i>				
Duck hepatit B virus	DHBV	Ördekler, kazlar	Ağırlıklı vertikal	Asemptomatik taşıyıcılık, hepatit
Heron hepatit B virus	HHBV	Balıkçılar (heron)	Ağırlıklı vertikal	

İnsanlarda etkenin neden olduğu enfeksiyon geniş spektrumlu bir klinik özelliğe sahiptir. Enfeksiyonun klinik sonucu, akut kendini sınırlayan hastalık ve inaktif taşıyıcılıktan, karaciğer sirozu ve HSK'yı içine alan kronik karaciğer hastalığına kadar değişmektedir (1, 2, 10, 13, 14). Kronik HBV enfeksiyonu, %50 oranında karaciğer sirozu ve %70-90 oranında da HSK'ya neden olmaktadır (4). HBV enfeksiyonunun patogenezi, virus ile virusun kodladığı antijenlere karşı konak immun yanıtı arasındaki etkileşim ile ilişkilidir (14). Hastalığın ciddi bir sonucu olan HSK'nın gelişmesine katkıda bulunan en önemli viral faktörler ise, virusun genotipi, spesifik genetik mutasyonlar ve diğer hepatit virusları ile ko-enfeksiyonların olduğu belirtilmektedir (2).

Yenidoğanlar veya çok küçük çocuklarda HBV enfeksiyonu genellikle asemptomatiktir, ancak buna rağmen enfeksiyon ciddi sonuçlara sahiptir. Erişkinlerdeki enfeksiyonunun yaklaşık 1/3'ü sarılık ile birlikte bulunan karaciğer disfonksiyonu ile karakterizedir. Ancak fulminant hepatit sebebi ile ölüm çok yaygın değildir (fatalite

oranı, akut vakaların %1'i civarında). İnkübasyon periyodu uzundur (45-120 gün) ve iyileşme genellikle uzamaktadır (2 aydan fazla), ancak HBV ile enfekte erişkinlerin %90'ından fazlası tamamen iyileşmektedir (12).

Erişkinlerdeki vakaların %10'undan daha azında ise, enfeksiyon temizlenmemekte ve kronik hale gelmektedir. Yenidoğan veya küçük çocuklardaki enfeksiyon yüksek seviyede kronikleşme ile sonuçlanır. HBV ile enfekte yenidoğanların %90 kadarı, kronik olarak enfekte hale gelirler ve 3 yaşındaki çocuklardaki enfeksiyonun kronikleşme oranı %30'dur. Çok gençlerde, immun sistemin henüz olgunlaşmadığı aşamanın, kronik enfeksiyonun gelişmesinde önemli olduğu düşünülmektedir. Kronik enfeksiyon asemptomatik olarak kalabilmekte ve vakaların küçük bir kısmında (özellikle erişkinlerdeki) iyileşme ile sonlanabilmektedir. Ancak diğer hastalarda kronik aktif hepatit gelişmekte olup, siroz ve ölüm ile sonuçlanabilmektedir (12).

HBV, primer olarak kontamine kan ile temas, cinsel temas ve anneden bebeğe doğum veya süt ile beslenme sırasında yayılmaktadır. Persistan olarak enfekte bireyler, kanlarında çok yüksek titrelerde virusa sahip olabilmekte,  $10^{10}$ /mL seviyesine kadar ulaşabilmektedir ve virus kurumaya karşı 1 haftaya kadar dayanabilmektedir. Bu sebeple virus taşınması için, enfekte kan ile temasın çok yoğun olması gerekmemektedir. Ev halkı ile temasın, örneğin ortak jilet kullanımının virusun yayılmasına öncülük ettiği vurgulanmaktadır. Sağlık personelinin hastalarından virusun bulaşmasında risk altında bulunmasında, sadece iğne batması sorumlu değildir, birçok vakada bireylerin aşılammamış olması da zemin hazırlamaktadır. Kan transfüzyonu önceleri virusun yayılmasında oldukça önemli bulaş kaynağı olarak bilinmekteydi. Ancak virusun varlığının tespitine yönelik duyarlı testlerin gelişmesi ile kan transfüzyonunu takiben enfeksiyon gelişme riskinin, günümüzde gelişmiş ülkelerde 1/200.000 olduğu belirtilmektedir (12).

Doğumda kazanılan kronik enfeksiyon, doğada virusun persistan kalmasında en büyük mekanizmadır. HBV ile akut veya kronik olarak enfekte ve HBeAg pozitif annelerden doğan bebeklerin %90 kadarı HBV ile enfekte olabilmekte ve bunlardan çoğu kronik olarak enfekte hale gelmektedirler (12).

Dünyada 350 milyondan fazla insan HBV'ü ile kronik olarak enfektedir (2, 4, 14, 15) ve bunların 250 milyondan fazlası Asya'da bulunmaktadır (16). HBV enfeksiyonu,



hepatit B aşılmasına rağmen tüm dünyada yıllık 1 milyondan fazla ölümden sorumludur (10). Bu sebeple de HBV enfeksiyonu büyük halk sağlığı problemi olarak görülmektedir (2, 4, 14, 15).

Kronik HBV taşıyıcılarının prevalansı dünyanın farklı bölgelerinde değişkenlik göstermektedir (17). HBV Sahraaltı Afrika, Çin ve Güney-Batı Asya'da oldukça endemiktir. Ayrıca Akdeniz havzasında da oldukça endemik olup, birçok gelişmiş ülkede önemli seviyede bulunmaktadır (15). En fazla Asya ve Afrika kıtasında görülmektedir (%10-20), Güney ve Doğu Avrupa, Kuzey Afrika, Orta Asya ve Güney Amerika'da orta düzeyde (%3-10) ve Batı Avrupa ile Kuzey Amerika'da düşük düzeyde (%0.3-1) görülmektedir (17). Türkiye orta düzeyde endemik bölge olarak kabul edilmektedir ve nüfusunun yaklaşık %5'inin kronik HBV taşıyıcısı olduğu bildirilmektedir (18, 19).

Viral faktörler ve konak immün yanıtı, HBV enfeksiyonunun patogenezi ve klinik sonucundan sorumlu tutulmaktadır. Aktif replikasyon sırasında üretilen yüksek viral kopya sayısı ve HBV polimerazın 3'-5' "proof reading" aktivitesinin olmaması nedeni ile HBV, konak immunitésinin baskısı altında yüksek mutasyonel orana sahiptir. Enfeksiyonun doğal sürecinde ise gelişen mutasyonların HBV genomunda birikebileceğinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bu HBV mutantları, konak immün sistemi tarafından tanınmada önemli rol oynayan epitoplarda değişiklik gösterebilmektedirler. Böylece virusun replikasyon seviyesi artarak, antiviral tedaviye direnç geliştirip veya virusun hücreye tutunma/penetrasyonunun kolaylaşması ile virulansı artabilmektedir (1).

HBV taşıyıcılarının %7-30'unun HBeAg çok az veya hiç eksprese etmeyen HBV varyantları ile enfekte olduğuna inanılmaktadır. Tipik hepatit B enfeksiyonu süreci, yüksek serum HBV DNA seviyesi ile HBeAg pozitif fazı içermektedir. Daha sonrasında da hasta HBeAg'nin kaybolduğu ve HBeAg'ye karşı antikorların (anti-HBe) ortaya çıktığı bir serokonversiyon sürecine girer. Genellikle bu süreç, HBV DNA seviyesindeki azalmayı ve aminotransferaz seviyesinin normal değerine dönmesini işaret etmektedir. Bazı hastalar arasında, henüz açık olmayan sebepler nedeni ile serokonversiyon ile ilişkili immün baskı HBeAg'yi az veya hiç eksprese etmeyen HBV varyantları seçilmektedir. Hastada anti-HBe gelişmesine rağmen, karaciğer hasarı ile ilişkili aktif HBV DNA replikasyonu devam etmektedir (4).

## 2.1. HBV'unun Genomik Yapısı ve Gen Ürünleri

HBV'u, *Hepadnaviridae* ailesinin prototip üyesidir (20) ve genomu kısmen çift zincirli sirküler bir DNA molekülü olup, yaklaşık 3.200 nükleotid uzunluğundadır (12, 13, 21). DNA zincirlerinden biri, negatif (-) zincir, tam uzunluktadır ve 5' ucuna kovalent olarak tutunmuş bir proteine sahiptir. Diğer zincir olan pozitif (+) zincir, değişken uzunlukta olup, tam uzunluktaki zincirden daha kısadır ve 5' ucunda RNA oligonükleotidine sahiptir. Bu sebeple hiçbir DNA zinciri kapanmamaktadır ve sirkülerlik yapışkan (kohezif) uçlarla sürdürülmektedir (12).

Hepadnavirus virionları zarflıdır ve yaklaşık 42 nm çapındadır. Virion nükleokapsid veya kor yapısı HBV kor (core) antijeni (HBcAg) olarak adlandırılan büyük bir kor proteini içermektedir. Eksternal glikoproteinler HBV yüzey (surface) antijeni (HBsAg) olarak adlandırılmaktadır (12).

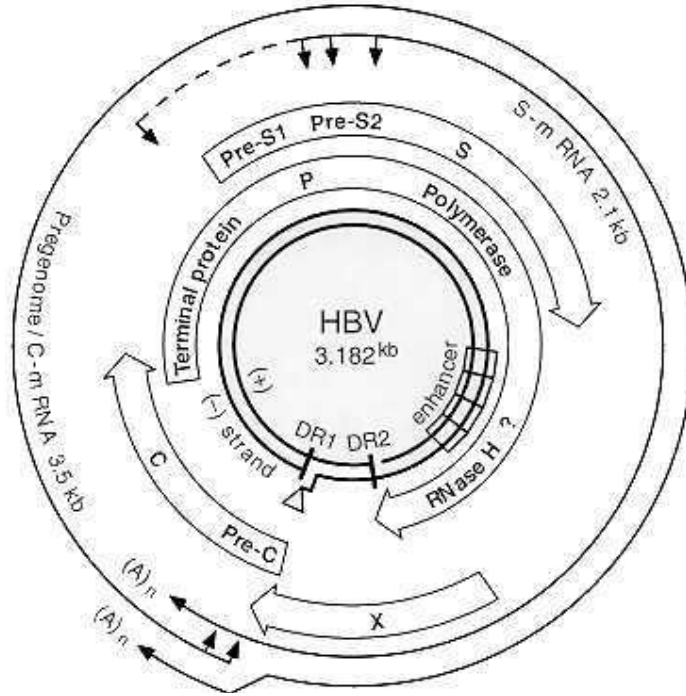
Genom oldukça kompakt bir yapıya sahiptir (20) ve kısmen üst üste binen (22), 7 viral proteini kodlayan 4 adet "open reading frame" (açık okuma çerçevesi-ORF)'den oluşmaktadır (Şekil 2.1) (21): **S ORF** (3 zarf proteini; HBsAg, gp36 [Pre-S1] ve gp42 [Pre-S2]), **C ORF**, **P ORF**, ve **X ORF**'dir (21, 22).

S geni (nt. 2848-nt.833; tip ayw<sub>3</sub>); majör antijen olarak adlandırılan 226 aa'ten oluşan bir protein (S) kodlamaktadır. Pre-S2 geni; önceki major antijen ile birlikte medium (M) antijeni oluşturan 55 aa'ten oluşan bir protein kodlamaktadır. Pre-S1 geni; bir önceki medium antijen ile birlikte large antijeni (L) oluşturan 108 aa'ten oluşan bir proteini kodlamaktadır. C geni (nt.1814-nt.2450); sırayla viral nükleokapsidin bir parçası olan kor proteinini (HBcAg) veya kanda sekrete edilen HBe antijenini (HBeAg) kodlamaktadır. P geni (nt.2307-nt.1621) ise; viral DNA polimeraz (reverse transcriptase-RT) proteinini kodlamaktadır. X geni (nt.1374-nt.1836); HBV X proteini olarak adlandırılan (HBxAg) çeşitli gen-düzenleyici fonksiyonlara sahip transkripsiyonel *trans*-aktivatör proteinini kodlamaktadır (20, 21, 22).

Bu proteinlerden HBxAg ve HBeAg dışındaki bütün proteinler virion ile birleşmiş haldedirler. HBeAg ise kor proteininin tüm aminoasit sekansını içermekte ve virus partikülüne katılamamasına rağmen solubl halde enfekte hücreden sekrete edilmektedir. Bu ORF'lere ilaveten HBV genomu; iki arttırıcı (enhancer) dizisi, her iki zincirin 5' ucuna yerleşmiş iki adet 11 bazlık direkt tekrar dizileri (direct repeat; DR1,

DR2), bir poliadenilasyon sinyali ve glikokortikoid yanıtı için bir alan (GRE) içermektedir (Şekil 2.1) (21).

HBsAg'ye karşı antikorların bulunması geçirilen doğal enfeksiyonun iyileşmesi veya HBV immunizasyonunun koruyucu etkisini göstermektedir. Kronik HBV enfeksiyonu için serum belirteçleri ise HBsAg, HBeAg ve antikorları, kor antikor (anti-HBc) ve HBV DNA'dır (22).



Şekil 2.1. HBV genomik organizasyonu (21).

Kronik HBV enfeksiyonlu hastalarda plazma HBV'u yaklaşık 24 saat gibi nispeten oldukça kısa yarı ömre sahiptir. Buna karşın enfekte karaciğer hücreleri 10-100 gün gibi oldukça uzun değişken yarı ömre sahiptir. Plazma HBV üretiminin ortalama toplam miktarı ise günde  $1.3 \times 10^{11}$  partiküldür. Toplam serum virus yükü farklı hastalarda ortalama  $2.2 \times 10^{11}$  olmak üzere  $10^{10}$  ile  $10^{12}$  partikül arasında değişmektedir (22).

## **2.2. HBV Genleri**

### **2.2.1. S Geni**

S geni 3 bölge içermektedir ve sadece N-uçlarının uzunlukları değişkenlik gösteren 3 farklı glikoprotein kodlamaktadır. Gen ürünleri; sadece S-bölgesinden kodlanan S (small)-HBsAg (veya majör HBsAg), preS2-bölgesinden kodlanan M (medium)-HBsAg (281 aa) ve preS1-bölgesi, preS2-bölgesi ve S-bölgesinden kodlanan L (large) HBsAg (alttıpe bağlı olarak 400 veya 389 aa) olarak adlandırılmaktadır (20).

HBsAg, önemli bir zarf proteinidir ve nötralizan antikolar tarafından tanınan başlıca epitoplara olup, hücre membranına enfeksiyöz partiküllerin tutunmasında rol oynayan bölgeleri içermektedir. Nötralizasyon özellikle HBsAg'nin "a" antijenik determinantında bulunan epitoplara antikorun bağlanması ile gerçekleşir. Bu "a" antijenik determinanı tüm HBsAg alttıplerinde ortaktır ve akut enfeksiyon sonrasında veya başarılı bir aşılardan sonra iyi bir immün korunmaya izin verir (21).

HBsAg, enfekte hücrelerden sferik veya flamentöz agregatlar şeklinde sekrete edilir ve konak immün yanıtı ile kompleks etkileşimler yolu ile HBeAg ile birlikte, viral persistansın oluşmasında ve kronik enfeksiyonun sürdürülmesinde önemli rol oynar (21).

### **2.2.2. C Geni**

C geni, 2 bölge içermektedir, bunlar; viral nükleokapsidi kodlayan (HBcAg) 183 aa kalıntısından oluşan kor bölgesi ve kor gen bölgesi ile birlikte kanda sekrete edilen HBeAg'yi kodlayan ATG başlangıç kodonu ile başlayan, 29 aa kalıntısından oluşan prekor gen bölgesidir (23, 24). Bazal kor promoter gen bölgesi ise, prekor gen bölgesinin hemen üst kısmındadır ve 1744-1804. nt'ler arasında yer almaktadır. Bazal kor promoter gen bölgesi, prekor ve kor RNA'sının üretimini kontrol etmektedir. Kor RNA'sı birçok fonksiyona sahiptir: major kapsid proteini olan kor proteinini kodlamaktadır, pregenomik RNA (viral kora paketlenmektedir) olarak görev

yapmaktadır ve pregenomik RNA'yı kısmen çift zincirli genomik DNA'ya çeviren "reverse transkriptase" yani DNA polimerazı kodlamaktadır (25). Kor gen ürünü olan kor antijeni (HBcAg) hepatosit yüzeyinde eksprese edilmektedir. Bazı kor partikülleri ise, HBV DNA ve DNA polimeraz içermektedir ve bu partiküller zarf proteini ile çevrelendiklerinde HBV partiküllerini oluşturmaktadırlar (23). Prekor RNA ise, "e" antijeni prekürsörü olan prekor proteinini kodlamaktadır. Prekor proteini, kor proteini ve "e" antijeninin sekresyonu için gerekli sinyal dizisini içeren öncü sekansı kodlayan tüm yapıyı (frame) içermektedir. Sinyal dizisi endoplazmik retikulumda sinyal peptidazlar yardımı ile prekor sekansından çıkartılarak, p22 türev prekor proteini oluşturmaktadırlar. p22 proteini daha sonra post-endoplazmik retikulum bölmelerinde proteazlar tarafından kesilerek (klevaja uğratarak) hepatositlerden sekresyona hazır olgun "e" antijenleri oluşmaktadır (23, 25). Olgun bir virion genellikle 20-29 aa'lık prekor sekansını ve 1-149 aa'lık kor sekansını içermektedir. Normal HBe sekansına ilaveten 1-19 aa'lık prekor bölgesi ile devam eden başka HBeAg'ler de tespit edilebilmektedir (20). HBeAg aktif viral proliferasyonun bir göstergesidir ve anti HBe'nin ortaya çıkması karaciğerde viral replikasyonun durması ile ilişkili olabilmektedir ve ayrıca düşük enfektiviteyi göstermektedir (24).

### **2.2.3. X Geni**

X-ORF, HBx olarak adlandırılan 154 aa'den oluşan bir protein kodlamaktadır. HBx çeşitli hücresel ve viral genleri, *cis* ve *trans* aktive edici elementle transaktive etmektedir ve HSK'nın gelişmesinde önemli rol oynayabilmektedir (20).

### **2.2.4. P Geni**

P-ORF, polimeraz (Pol) olarak adlandırılan çok fonksiyonlu bir enzim (831 aa; 93 kDa) kodlamaktadır. Polimeraz enzimi, pregenomik RNA'nın çift zincirli DNA'ya reverse transkripsiyonundan sorumludur (20).

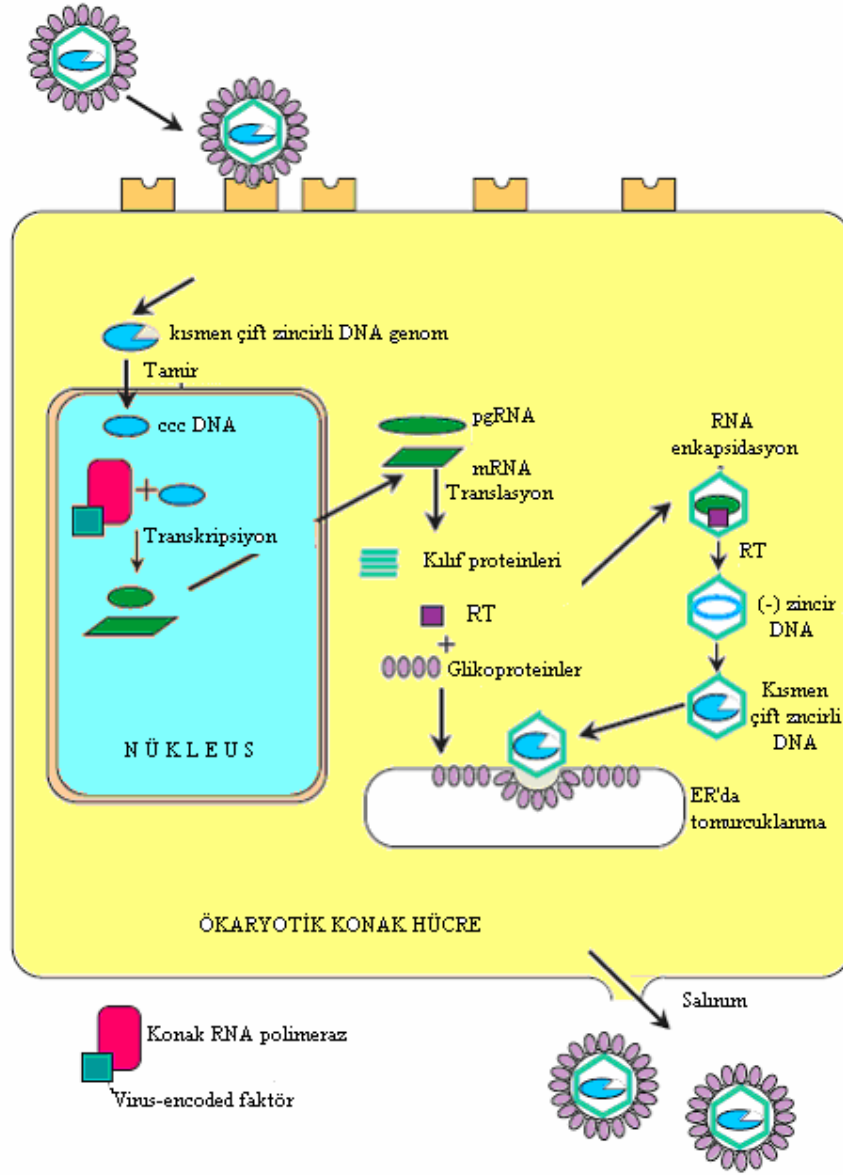
### 2.3. HBV Enfeksiyonunun Replikatif Siklusu

HBV, RNA aracılı ilginç bir replikatif sıklusa sahiptir. HBV'nin yaşam siklusu Şekil 2.2'de şematize edilmiştir.

#### *Viral DNA transkripsiyonu:*

Hepatositlerin enfeksiyonundan sonra viral nükleokapsid nükleusa taşınır. Transport, kapsid proteinin fosforilasyonuna bağlıdır ve  $\alpha$  ve  $\beta$  hücrel transport reseptörleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Kapsid büyüklüğü yaklaşık 35 nm olup, nükleer porlardan transport için üst limitte bulunmaktadır. Viral genom nükleusta kapsidinden ayrılır ve “covalently closed circular” çift iplikçikli DNA (cccDNA) molekülüne dönüştürülmektedir. Bu işlem sırasında, negatif (-) zincire tutunan protein uzaklaştırılmakta, pozitif zincirin 5' ucundaki RNA oligonükleotid tarafından boşluk tamamlanmakta ve DNA zincirinin ucu kapanmaktadır. Konak tamir enzimlerinin bu süreci gerçekleştirdiği sanılmaktadır. Oluşan cccDNA ne konak genomuna entegre olmaktadır, ne de epizom olarak replike olmaktadır, daha ziyade sirküler tek bir DNA kopyası olarak bulunmaktadır (12).

cccDNA, hücrel RNA polimeraz II ile transkribe edilmekte ve çeşitli mRNA'lar oluşmaktadır. Sadece bir zincir transkribe olmaktadır. DNA'daki 4 farklı promoter 3.5, 2.4, 2.1 ve 0.7 kb uzunluğundaki transkriptlerin üretimine neden olmaktadır ve bunların hepsi aynı “poly (A)” ucu ile sonlanmaktadır. Daha sonra da, RNA transkriptleri poliadenillenmektedir. Memeli hepadnaviruslarının poliadenilasyon sinyalini “TATAAA” dizisi oluşturmaktadır (12).



**Şekil 2.2.** Hepadnavirus replikasyon şeması. Virion içindeki kısmen çift zincirli DNA genomu; tam uzunluktaki negatif (-) zincirli DNA ve değişen uzunluktaki pozitif (+) zincirli DNA'dan oluşmaktadır. Virusun hücreye girmesinden sonra, genom nükleusta tamir edilerek "covalently closed circular DNA (cccDNA)" şeklini alır. Konak RNA polimeraz enzimi yardımı ile, pregenomik RNA (pgRNA) dahil çeşitli uzunluklarda mRNA'lar transkribe edilir. Bu mRNA'lar sitoplazmaya taşınır ve sitoplazmada translasyonla viral proteinleri sentezlerler. Endoplazmik retikulum (ER) dan tomukcuklanmadan önceki son basamak ise DNA'nın pozitif (+) zincirinin kısmen sentezlenmesidir (12).

Viral RNA transkripsiyonu, yoğun olarak hepatositlerde gerçekleşmektedir. Çünkü bazı promoterler optimal aktivite için, hepatositlerde bulunan “hepatosit nükleer faktör-1, (HNF-1)” gibi transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca DNA’da hepatositlerde etkili bir şekilde fonksiyon gören iki arttırıcı (enhancer) dizinin bulunduğu bilinmektedir (12).

Dört sınıf mRNA sitoplazmaya translasyon ve virion birleşmesi (assembly) için taşınmaktadır. Çıkış, post-transkripsiyonel regülatör element (PRE) olarak adlandırılan yaklaşık 500 nt’lik bir dizi elementi ile kolaylaştırılmaktadır. Bu elemente, büyük hepadnaviral RNA’lar uç uca eklenemediği (splice edilmediği) için ihtiyaç duyulmaktadır (12).

#### *Viral proteinlerin sentezi:*

Viral proteinlerin sentezi komplekstir. Genellikle 4 gen bilinmektedir. Kor geni; prekor ve kor (HBcAg) olarak adlandırılan iki ürün vermektedir. Polimeraz geni; RT-RNase-H (genellikle polimeraz veya Pol olarak adlandırılmaktadır) oluşturmaktadır. Yüzey (surface) proteini geni; pre-S1, pre-S2 ve S (HBsAg olarak da adlandırılmaktadır) olarak adlandırılan 3 protein üretmektedir. X geni; asıl fonksiyonu bilmediğinden X olarak adlandırılan bir protein oluşturmaktadır (12).

Kor ve polimeraz proteinleri en büyük (3.5 kb) mRNA’dan transkribe edilmektedir. İki mRNA aynı promoterdan üretilmeye başlamaktadır. mRNA’lardan biri prekor olarak adlandırılan proteini üretmek üzere translasyona uğrar, diğeri ise pregenomik RNA (pgRNA) olarak da adlandırılmaktadır. Bu mRNA’nın alt kısmındaki AUG aynı okuma çerçevesinde bulunan kor proteininin translasyonunun başlatılmasında kullanılmaktadır. Kor proteini virionun major kapsid proteinidir. Prekorun akibeti ise daha farklıdır. Sentez sırasında endoplazmik retikuluma yerleşir ve salgısal veziküller ile taşınır. Amino (N)-terminal ucu sinyal dizileri ve bazı karboksi (C)-terminal ucu kalıntıları uzaklaştırılır. Hücreden HBeAg olarak adlandırılan 17-kDa’luk proteinler şeklinde sekrete edilir (12).

Polimeraz proteinini kodlayan polimeraz geni kor geninin alt kısmında bulunmaktadır. Kor geninden farklı bir okuma çerçevesi içindedir ve kor geni ile kısmen



üst üste binmiştir. Polimeraz geninin translasyon mekanizması henüz açık değildir. Kor ile aynı mRNA'dan transkribe edilmektedir, ancak başlangıç internaldir (12).

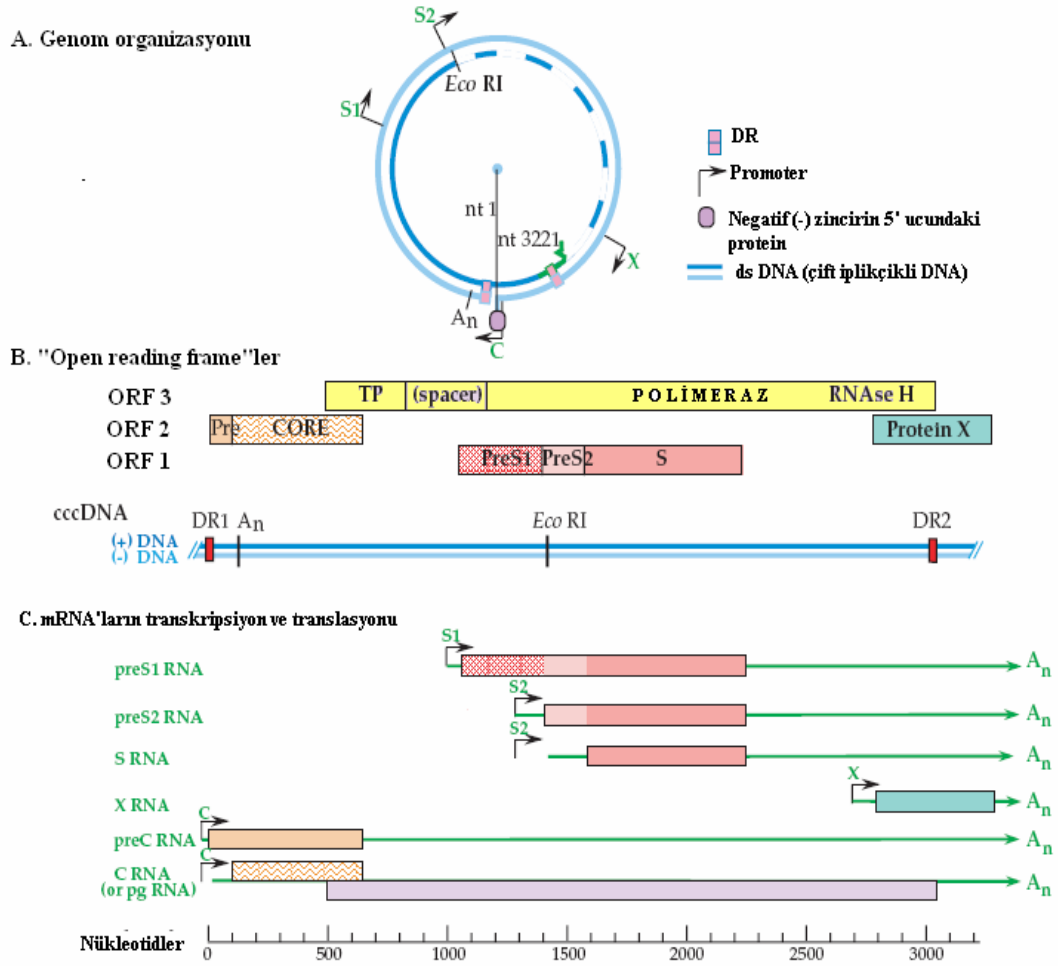
Yüzey proteini 3 formda üretilmektedir. Uzun olanı, L (large) veya preS1 olarak, orta olanı M (medium) veya preS2 olarak ve kısa olanı ise S olarak adlandırılmaktadır. Bunlar N uçlarına göre ayrılmaktadırlar ve aynı çerçevedeki farklı AUG başlangıç kodonlarının kullanılması ile üretilmektedirler. PreS1; 2.4 kb'lık mRNA'dan tercüme edilmektedir, preS2 ve S ise; prekor ve kora benzer bir şekilde 2.1 kb'lık mRNA'dan tercüme edilmektedirler (Şekil 2.3) (12).

X proteini ise 0.7-kb'lık mRNA'dan tercüme edilmektedir (12).

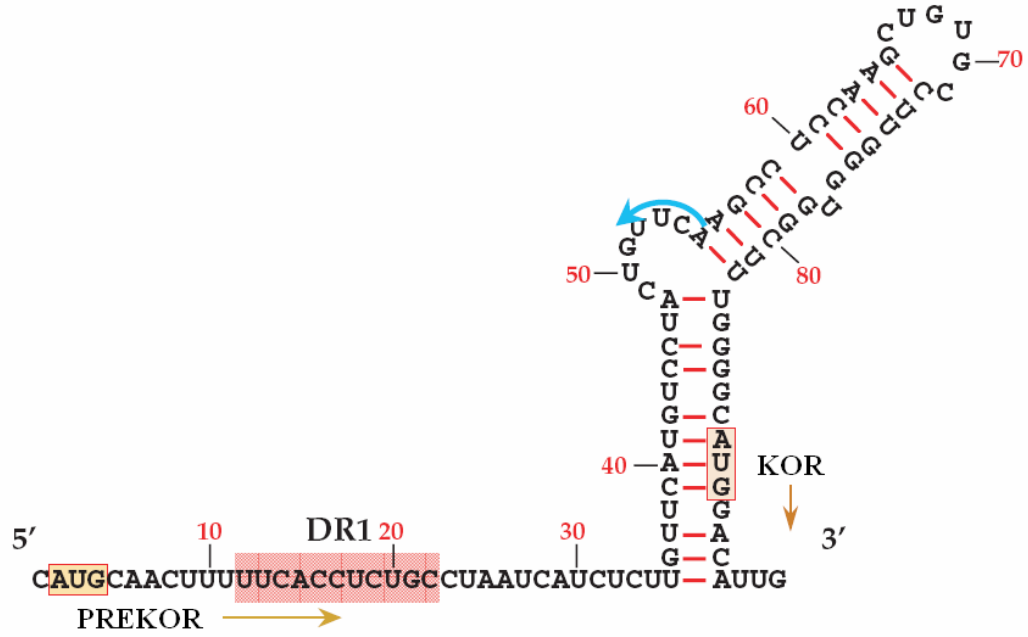
#### *Viral genomun replikasyonu:*

3.5-kb'lık pgRNA sadece mRNA olarak görev yapmaz, ayrıca viral genom replikasyonu için aracı olarak da bulunmaktadır. Reverse transkripsiyon aktivitesine (RNase H) sahip protein P, virionda bulunan çift iplikçikli DNA'yı yapmak üzere bu RNA'yı kalıp olarak kullanır. İlk zincir sentezlendikten sonra protein P ilk zincirin 5' ucuna kovalent bağlarla tutunur (12).

DNA sentezi kapsid içinde olmaktadır, bu sebeple de ilk basamak pgRNA'nın enkapsidasyonudur. Sadece pgRNA paketlenir. Bu RNA, kor ve polimeraz genleri için mesaj taşımakta olup, enkapsidasyon için bu her iki gen de gerekmektedir. Protein P RNA'nın 5' ucunda bulunan epsilon ( $\epsilon$ ) olarak adlandırılan spesifik diziye bağlanır. Bu sinyal, RNA'nın her iki ucunda da bulunan yaklaşık 200 nt'lik direkt tekrar (Direct repeat, DR) dizileri içinde bulunan "ilmik gövde" (stem loop) yapısı içinde bulunmaktadır. "ε" sinyali RNA'nın her iki 5' ve 3' ucunda bulunmasına rağmen sadece 5' ucundaki enkapsidasyon için sinyal fonksiyonu görmektedir. P proteini ε'a bağlandığında, kor toplanarak, kapsid şekillenir (Şekil 2.4) (12).



**Şekil 2.3.** (A) HBV genomunun sirküler haritası. Tekrarlayan elementler (DR1 ve DR2)'in, bilinen dört promotörün (siyah oklar) ve DNA'nın pozitif (+) zincirindeki değişen uzunluktaki "gap-boşluk"ın lokalizasyonu gösterilmektedir. Bu genom haritası, pgRNA'nın başlangıcından itibaren numaralandırılmıştır. Bazı yazarlar, *EcoRI* restriksiyon alanından (burada 1407. nt'e karşılık gelmekte) itibaren nükleotidleri numaralamaktadırlar. (B) "Open reading frame-ORF"leri gösteren cccDNA'nın doğrusal haritası. Burada altı tane RNA ve bunlardan tercüme edilen proteinler (renkli bloklar) görülmektedir. Prekor RNA ve kor RNA (pgRNA)'nın uzunluğu genomunkinden daha fazladır ve bütün mRNA'lar 121. nt'de poliadenilasyon alanı ile son bulur. (C) mRNA'ların transkripsiyon ve translasyonu. Bütün transkriptler, kalıp olarak kullanılan negatif (-) zincirli DNA'dan yapılmaktadır (12).



**Şekil 2.4.** RNA elementinin çift boyutlu yapısı, HBV RNA'daki paketleme (enkapsidasyon) sinyalini oluşturmaktadır. Prekor ve kor proteinleri için başlangıç kodonları işaretlenmiştir, direkt tekrarlayan diziler (*direct repeat sequence*, DR) gölgelendirilmiştir ve mavi çizgiler DNA replikasyonunun başlangıç dizisini göstermektedir (12).

Nükleokapsid içinde, ilk zincir 3' ucundan 5' ucuna doğru, P proteini yardımı ile sentezlenir. P proteininin RNase H aktivitesi ile ilk DNA zincirinin sentezlendiği RNA yıkılır (degrade edilir), ancak RNA'nın 5' ucu yıkılmaz, ikinci zincir DNA'nın sentezi için primer görevi görür. İkinci zincir de sentezlenir, ancak genelde bu sentez tamamlanmaz, bu yüzden de genomik çift zincirli DNA, uzunluğu değişen tek zincirli bir boşluğa sahip olmaktadır (12).

Böylece, viral DNA genom kopyasını içeren olgun kapsid oluşur. Yeniden nükleusa taşınır ve DNA'sı serbest kalarak, yeni bir replikasyon siklusunu başlatır. Bu nükleusta mRNA sentezi için kalıp görevi gören viral DNA'nın yaklaşık 20 kopyasının toplanması ile sonuçlanır. Bu süreç, büyük miktarda S proteininin birikmesinden önce, enfeksiyonun erken safhalarında olmaktadır (12).

#### *Virionun birleşmesi (assembly):*

Kısmen çift zincirli DNA içeren korlar, Dane olarak adlandırılan olgun virionları oluşturmak üzere intrasellüler membranlardan tomurcuklanır. 42 nm çapındaki virion zarfı, L (pre-S1) ve S proteinlerinin her ikisini içermektedir (12).

42 nm çapındaki Dane partiküllerine ilaveten, 20 nm çapındaki partiküller de bol miktarda üretilmektedir (Dane partiküllerinden  $10^4$ - $10^6$  kat daha fazla). Bu partiküller S ve M proteinlerini içermektedir. Ancak L proteini ya çok azdır ya da hiç yoktur, kor proteini ise bulunmamaktadır. Bu partiküller hücreden sadece S proteini eksprese edildiğinde oluşmaktadır, ancak diğer viral komponentler olmasa da hücreden tomurcuklanabilmektedirler. Virus, 20 nm çapındaki partikülleri çok miktarda üretebilmektedir. İmmun sistemin tolere edebilmesi için, serumda  $10^{13}$ /mL konsantrasyonuna kadar ulaşabilmektedirler. Bu partiküllerin içerdiği HBsAg konsantrasyonu 100 µg/mL'ye kadar ulaşabilmektedir (12).

#### **2.4. HBV Enfeksiyonunun İmmunolojik Özellikleri**

HBV enfekte ettikleri hepatositler üzerinde direkt sitopatik etkiye sahip değildir. (12, 20, 26). *In vivo* hücre kültürü çalışmalarında virusun persistan, non-sitolitik enfeksiyona sebep olduğu ortaya konmuştur (12). HBV enfeksiyonu sırasında karaciğer hasarına sitotoksik T lenfositlerinin aktivitesi gibi faktörler sebep olmaktadır (12, 20, 26). Hepatositlerden eksprese edilen viral proteinler, T hücreleri için hedef oluşturmaktadır. T-hücre aracılı immün yanıt akut kendini sınırlayan hepatitte viral temizlenme için en önemli mekanizmadır (20). Sitotoksik T lenfosit yanıtının gücü, enfeksiyonun sürecini belirlemektedir. Güçlü immün yanıt, virusun temizlenmesi ve iyileşme ile sonuçlanmaktadır, ancak sarılığın geliştiği hepatit olguları da sıklıkla iyileşme ile sonuçlanabilmektedir. Zayıf immün yanıt sonucu ise az semptomlu kronik hepatit ile sonuçlanmaktadır. Orta şiddette yanıt ise, kronik hepatit ile karakterize, kronik enfeksiyon ile sonuçlanmaktadır (12).

Bu nedenle enfeksiyonun seyri; enfeksiyonun yaşı, konak genetik faktörleri (HLA tipi gibi) ve viral antijenlerin ekspresyonunu etkileyen virusun genetik değişkenliği gibi, immün yanıtı etkileyen çeşitli faktörlere bağlıdır (26).

HBV kronik enfeksiyonunun diğer insanları enfekte etme potansiyelindeki ciddiyet sebebi ile kronik olarak enfekte hastalarda enfeksiyonun kontrol edilmesindeki ve temizlenmesinde kullanılacak metodların geliştirilmesindeki çabalar devam etmektedir. HBeAg son yıllara kadar enfektivite belirteci olarak kullanılmaktaydı. Ancak günümüzde tedavi yanıtının değerlendirilmesinde direkt olarak viral titre ölçülmektedir. Yüksek doz interferonun (bir sitokin olup, immün yanıtı arttırmaktadır) kullanıldığı ilk tedavide, kısmi bir başarının gözlemlendiği bildirilmektedir. Enfeksiyonun temizlenmesinde hastaların çok az bir kısmında başarı elde edilmiştir. HBV tedavisinde kullanılan ilaçlar, pahalı ve toleransı zayıf olup, çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır. HBV enfeksiyonunun kontrol edilmesinde, nükleosid analoglarının etkinliği ile ilgili denemeler halen devam etmektedir. Nükleosid analogları içinde lamivudin tedavisinin hastaların %50'sinden fazlasında iyileşme ile sonuçlandığı ve %16'sında da enfeksiyonun açıkça temizlendiği bildirilmektedir. Dirençli viruslar vakaların %10'unda ortaya çıkmaktadır, bu da devam eden tedavinin etkinliğini sınırlandırmaktadır. Ancak kombinasyon tedavisinin başarı oranını artıracığı belirtilmektedir. Bazı hastalarda karaciğer transplantasyonu gerekmektedir. Ancak sirkülasyondaki virus, greftin reenfeksiyonunu kaçınılmaz hale getirmektedir (12).

## **2.5. HBV-DNA'sında Meydana Gelen Dizi Değişiklikleri**

HBV'nin genetik değişkenliği; taşıyıcı popülasyonda viral genomun ayrıntılarını yansıtan genotiplerin gelişmesinde ve enfekte kişilerde mutasyonların ortaya çıkması şeklinde gözlenmektedir (21, 26).

### 2.5.1. HBV Genotipleri ve Alt Genotipleri; HBsAg Alt Tipleri

HBV genom replikasyonu, viral DNA'nın reverse transkripsiyonu ile sentezlenen tam uzunluktaki RNA aracısını içermektedir. Sentez viral DNA polimerazda bulunan "reverse transkriptase" aktivitesi ile gerçekleşmektedir. RT, transkripsiyon hatalarını düzeltmediği için, HBV genom replikasyonu sırasındaki mutasyonların sıklığı (aynı RNA viruslarındaki gibi), karakteristik DNA viruslarından daha yüksektir. Sonuç olarak da, HBV popülasyonları, çevresel faktörlere karşılık olarak birçok DNA viruslarından daha çabuk evrim geçirebilmektedir ve böyle faktörlerin baskısı altında HBV mutantlarının ortaya çıkması muhtemelen daha sık gelişen bir olaydır (21).

Bu faktörlerin hepsi HBV suşlarının yaygın çeşitliliğine katkıda bulunmaktadır. Genotipler, alt-genotipler ve HBsAg alt-tipleri; ortak, aynı evrimsel tarihi paylaşan genetik olarak stabil viral popülasyonları göstermektedir. Bunların spesifik insan popülasyonlarında ortaya çıkması ve dünyanın başka bölgelerine konakları ile birlikte göç etmesi, bunların coğrafik dağılım göstermesine neden olmaktadır. Mutasyon ve mutant seleksiyondan kaynaklanan ilave stabil değişiklikler de gözlenmektedir. Bu viral alt popülasyonlar, HBV varyantları olarak bilinmektedir. (21).

HBV izolatlarının HBsAg alt tiplerine göre gruplandırılması 30 yıl önce gerçekleştirilmiştir. Alt tip spesifiklerinin ekspresyonuna katılan HBsAg epitoplari molekülün 2 eksternal ilmeğini (loop) (110-180) içeren bir bölgedir ve HBV suşlarını antijenik olarak çeşitli yapmaktadır. Aynı bölge bilinmeyen sayıda epitop içermektedir. Bu epitoplar bütün wild-tip HBV suşlarında ortak olarak bulunan HBsAg'nin "a" determinanti olarak tanımlanmaktadır. Belirli HBsAg alt tipleri tarafından "a" determinantına karşı oluşturulan antikorlar HBV partiküllerinin enfektivitesini nötralize edebilmektedir, bu da bütün alt tiplere karşı çapraz korumayı ve mevcut HBV aşılı tarafından indüklenen koruyucu immunitiyi oluşturmaktadır. HBsAg alt tip identifikasyonu, poliklonal antikor veya monoklonal antikorların referans panelleri ile test edilmesini gerektirmektedir. Ancak spesifik pozisyonlarda kodlanan aa'leri identifiye ederek, HBsAg'yi kodlayan viral genom bölgesinin sekansı da tahmin edilebilmektedir (Çizelge 2.2). HBsAg alt tipleri; ortak bir örnek determinantların iki seti ile (d/y ve w/r), 4 farklı alt özellikte "w" determinanti (w1-w4) ve eksprese edilen üçüncü bir determinant (q) ile tanımlanmaktadır. HBsAg alt tiplerinin gösterilmesi ise;

ortak “a” determinantı ile başlamakta, sonrasında da sušta identifiye edilen alttip determinantları ile devam etmektedir (örneğin, “adw2”, “ayr”) (21).

**Çizelge 2.2.** Aminoasitler ile HBsAg alt tipi'nin tahmin edilmesi ve HBV ORF'lerinin tahmin edilen DNA dizisi (21).

HBsAg pozisyonunda aa							Tahmin edilen HBsAg alt-tipi
122	127	134	159	160	177	178	178
Lys	Pro	Phe	Ala	Lys	Val	Pro	adw2
Lys	Thr	Phe	Ala	Lys	Val	Pro	adw3
Lys	Leu	Phe	Gly	Lys	Val	Gln	adw4q-
Lys	Pro	Phe	Ala	Arg	Ala	Pro	adr
Lys	Pro	Phe	Val	Arg	Val	Pro	adrq-
Arg	Pro	Phe	Ala	Lys	Val	Pro	ayw1
Arg	Pro	Tyr	Gly	Lys	Val	Pro	ayw2
Arg	Thr	Phe	Gly	Lys	Val	Pro	ayw3
Arg	Leu/Ile	Phe	Gly	Lys	Val	Pro	ayw4
Arg	Pro	Phe	Ala	Arg	Val	Pro	ayr

Bu virusların nükleotid sekans analizine dayanan karşılaştırmalı filogenetik analizi ile tüm genom içinde %8'den büyük (13) ve S gen seviyesinde %4'den daha fazla farklılık ile A'dan H'ye kadar 8 genotip içinde sınıflandırılmıştır (11, 13, 22). ORF'lerin uzunlukları ve kodlanan protein büyüklükleri yönünden genotipler arasında bazı farklılıklar bulunmaktadır (22).

Okamoto ve arkadaşları, 1988 yılında ilk defa, tüm HBV genomu içinde %8 veya daha fazla ayrılık ile A'dan D'ye kadar 4 genotipi tanımlamıştır (27). Norder ve arkadaşları (28), 1992 yılında daha önceden Okamoto ve arkadaşları tarafından sınıflandırılan HBV genomlarının S gen dizilerini sınıflandırarak, genomlar arasında %4.1 kadar küçük farklılığı göstermişlerdir. Bu nedenle de, E ve F olarak adlandırılan iki yeni genotipi S gen seviyesinde en az %4 oranındaki farklılığı kullanarak tanımlamışlardır. Daha sonra da, Belçika ve Orta Amerika'dan D ve H genotipleri bildirilmiştir (29, 30).

HBV genotiplerinin dağılımının ise etnik kökenle ilişkili farklı coğrafik dağılıma sahip olduğu bildirilmektedir (2, 13). Genotip A; Avrupa, Kuzey Amerika, Brezilya, Güney Afrika ve Hindistan'da daha prevalan olmasına karşın, Genotip B ve C; Asya'da daha sık bulunmaktadır (22, 31). Genotip D; Akdeniz bölgeleri, Güney Avrupa, Orta

Asya, Hindistan’da daha sıklıkta bulunmaktadır. Genotip F; Güney ve Orta Amerika’da, genotip G; Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.) ve Avrupa’da (Fransa), genotip H ise; Orta Amerika (Meksika) (31, 32) ve Güney Amerika (Kaliforniya)’da görülmektedir (17, 33).

HBV genotipleri ile HBsAg alt tipleri arasında bazı ilişki gözlenmiştir. Ancak birçok genotip iki veya daha fazla alt tip ile ilişki içinde bulunabilmektedir (Çizelge 2.3). Her bir genotip/alt genotip arasındaki ilişki ile tanımlanan HBV grupları, sıklıkla tipik bir coğrafi dağılım göstermektedir ve bu özellik popülasyonlarda görülen HBV suşlarının öneminin belirlenmesinde kullanılmaktadır (21). Ayrıca HBV genotip/alt genotiplerinin biyolojik özelliklerinde farklılık da olabileceği belirtilmektedir. HBV genotip/alt genotiplerinin küresel dağılımındaki heterojenite, sadece farklı popülasyonlarda HBV mutasyonlarının prevalansındaki farklılığa sebep olmayıp, HBV enfeksiyonlarının klinik seyri ve antiviral tedaviye yanıtındaki farklılıktan da sorumlu olabileceği giderek anlaşılmaktadır (11).

**Çizelge 2.3.** HBV genotip ile HBsAg alt tipleri arasındaki sabit ilişki ve başlıca coğrafi dağılımları (21).

HBV genotip	HBV alt-genotip	HBsAg alt-tip	Sıklık	Başlıca coğrafi dağılım
A	A2	adw2	Yüksek	Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya
	A1	ayw1, adw2	Yüksek	Afrika
B	B1, B2, B3	adw2	Yüksek	Uzak Doğu
	B4	ayw1	Yüksek	Uzak Doğu
	B2	adw3	Düşük	Uzak Doğu
C	C1, C2, C4	adr	Yüksek	Uzak Doğu
	C3	adrq-	Yüksek	Yeni Gine, Pasifik
	C1, C2	ayr	Yüksek	Uzak Doğu
	C1, C3	adw2	Düşük	Uzak Doğu
	C4	ayw3	Düşük	Uzak Doğu, Pasifik
D	D1, D3, D4	ayw2	Yüksek	Batı Asya, Doğu Avrupa, Akdeniz
	D2, D3	ayw3	Yüksek	Tüm Dünya
	Tanımlanmamış	adw3	Düşük	Doğu Avrupa, İspanya
	D2	ayw4	Düşük	Doğu Avrupa, İspanya, Amerika Birleşik Devletleri
E	-	ayw4	Yüksek	Afrika
F	F1, F2	adw4q-	Yüksek	Latin Amerika, Alaska, Pasifik
	F1, F2	ayw4	Düşük	Latin Amerika
G	-	adw2	Düşük	Avrupa, Kuzey Amerika
H	-	ayw4	Düşük	Orta Amerika



Bunlardan HBV genotip D enfeksiyonunun ciddi karaciğer hastalığı ile ilişkili olduğu ve asemptomatik taşıyıcılar ile karşılaştırıldığında HSK'lı hastalarda genotip D'nin genotip A'dan daha yüksek prevalansa sahip olduğu bildirilmektedir (2, 34).

HBV genotiplerine ilaveten, genotip A, B, C, D ve F içinde alt genotipler de identifiye edilmiştir. Alt genotipler, genotip E, G ve H içinde henüz belirlenmemiştir (11, 21).

Türkiye'de şimdiye kadar yapılan çalışmalarda HBV genotiplerinin dağılımı incelendiğinde ağırlıklı olarak (%100) D genotipinin bulunduğu gözlenmektedir (8, 35, 36, 37, 38, 39, 40) (Çizelge 2.4). Kaya ve arkadaşlarının Isparta bölgesinde yaptığı çalışmada %84.1 genotip D/E, %4.4 Genotip A, %1.4 Genotip C ve %0.7 Genotip F'ye rastladıkları bildirilmiştir (41). Genotip D, özellikle Akdeniz havzası ve Orta Doğuda daha sıklıkta gözlenmektedir. Bununla bağlantılı olarak Türkiye'nin coğrafi yerleşimi ile Güney doğu Avrupa ve Asya arasında köprü görevi görmesi nedeniyle genotip D'nin yaygın görülme sebebini açıklamaktadır.

**Çizelge 2.4.** Türkiye'de HBV genotiplerinin dağılımı (ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction-Restriction fragment length polymorphism).

Araştırmacı	Yıl	Çalışılan hasta sayısı	Gen bölgesi	Genotip	Yöntem
Serin ve ark (8)	2005	50	S geni	%100 Genotip D	DNA dizi analizi
Özdemir ve ark (35)	2005	54	S geni	%100 Genotip D	PCR-RFLP DNA dizi analizi
Yalçın ve ark (36)	2004	44	S geni	%100 Genotip D	DNA dizi analizi
Sünbül ve ark (37)	2005	78	Pre-S bölgesi	%100 Genotip D	PCR-RFLP
Sertöz ve ark (38)	2008	54	S geni	%100 Genotip D	PCR-RFLP DNA dizi analizi
Aksoy ve ark (39)	2006	127	S geni	%100 Genotip D	PCR-RFLP
Leblebicioğlu ve ark (40)	2004	147	Pre-S bölgesi	%100 Genotip D	PCR-RFLP Genotip spesifik PCR
Kaya ve ark (41)	2007	135	Pre-S bölgesi	%85.1 Genotip D/E %4.4 Genotip A %1.4 Genotip C %0.7 Genotip F	ELISA

### 2.5.1.1. HBV Sekans Heterojenitesi

Günümüzde bilinen HBV genotiplerine ilaveten genotipler arasında yeni HBV varyantlarını oluşturan rekombinasyonların olduğu bildirilmiştir ve bu da virusun genetik çeşitliliğinin artmasına sebep olmaktadır. Bununla birlikte, genotip B, C ve D arasında birçok rekombinasyonun varlığı bildirilmiştir. Ancak hepatit B'nin tanısı ve enfeksiyonun takibinde bu rekombinantların etkisinin henüz tanımlanmadığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, akut HBV enfeksiyonunun kötüye gitmesinde, HBV genotipleri ve moleküler varyantları arasında gittikçe artan bir ilişkinin olduğu bildirilmektedir (13).

### 2.5.1.2. HBV Genotiplerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Tüm genomun %92'den daha fazla veya daha az nükleotid dizi benzerliğine dayanan orjinal sınıflandırması, dizi analizi ve filogenetik ağaç oluşturulması ile gerçekleştirilmektedir (42). Genotipleme, HBV genomunun pre-S ve S genlerinin bir kısım dizilerinin ortaya çıkarılmasıyla da yapılabilmektedir (43). PCR, HBV'nin genomik tiplendirilmesini kolaylaştırmaktadır. Tip spesifik primerler ile amplifikasyon ve "restriction fragment length polymorphism (RFLP)"e dayanan tiplendirme teknikleri bulunmaktadır (42). Ayrıca, "line probe assay (LIPA)" ve "enzyme-linked immunoassay (ELISA)" teknikleri de bulunmaktadır (36, 44).

Serotipleme, 1970'li yılların öncesinde uygulanmaya başlanmıştır ve HBsAg'de bulunan 3 antijenik determinanta karşı seroreaktiviteyi ifade etmektedir. Bu determinantlar ortak "a" determinatı ve birbirinden bağımsız özel (mutually exclusive) "d/y" ile "w/r" olup, bunlarla 4 büyük serotip; *adw*, *ayw*, *adr* ve *ayr* tanımlanmıştır. Daha sonrasında da bunlarında dahil olduğu toplam 9 serotip tanımlanmıştır. Seroreaktivitenin genomik temeli S geninin dizi analizi ile açıklanmıştır ve serotiplendirmenin filogenetik ilişkiyi doğru olarak yansıtmadığı gösterilmiştir (42).

Günümüzde RFLP yöntemi, HBV genotiplendirmesinde en yaygın kullanılan metottur (36). RFLP ile genotiplendirme yöntemi, güvenilir bir şekilde genotip farklılığını yansıtmakla birlikte, bu farklılığın tanınmasına izin veren restriksiyon

alanlarının belirlenmesini de sağlamaktadır (42). S geninin analizine dayanan RFLP ile tiplendirme yöntemi Lindh ve arkadaşları (45) tarafından tanımlanmıştır. Ancak bazı serum örneklerinin bu metod ile atipik restriksiyon paterni gösterdiği veya tiplendirilemediği bildirilmiştir. Bu sebeple, genotipler arası değişkenliği gösteren, genotipler içindeki oldukça korunmuş bir bölgeyi yansıtan pre-S bölgesinin RFLP yöntemi ile analizine dayanan ilave bir metod geliştirmişlerdir. Bu metodun, pre-S bölgesinin 446 bp'lik bir segmentinin amplifikasyonu ve arkasından da *AvaII* ve *DpnII* restriksiyon enzimleri ile RFLP analizine dayanan bir yöntem olduğu belirtilmiştir (42).

Otomatize DNA dizi analizi cihazlarında belirlenen HBV dizileri, bilgisayar programları kullanılarak, GenBank'dan elde edilen referans nükleotid dizileri ile eşleştirilmekte (hizalanmakta) ve daha sonrasında da filogenetik ağaçlar oluşturulabilmektedir (36).

RFLP ve LIPA gibi metodların uygulanması kolay ve hızlı olmalarına karşın, bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu metodlar yeni genotiplerin, mutasyonların ve ikili mutasyonların tespit edilmesinde yetersiz kalmaktadırlar (36).

### **2.5.2. HBV Enfeksiyonunun Doğal Seyri Sırasında Mutant Virusların Gelişmesi**

Virus “proof reading” aktivitesi olmayan yani spontan hata oranı yüksek viral “reverse transcriptase” enzimini kullanarak, transkripsiyonla 3.5 kb'lık pregenomik RNA aracılığı ile replike olduğu için yüksek oranda mutasyon sergilemektedir (9, 14, 46). HBV'deki bu mutasyon oranının birçok DNA virusunda görülen mutasyon oranından 10 kat daha yüksek olduğu bildirilmektedir (46). Özellikle uzun süre takip edilen hastalarda bu varyasyonlara sıklıkla rastlanmaktadır. HBV'nun her alanında yıllık nükleotid değişim oranının yaklaşık olarak retroviruslardakine ( $10^{-5}$ ) benzer bir şekilde  $1.4-5 \times 10^{-5}$  olarak tahmin edilmektedir. Ancak bu oran viral DNA genomuna sahip viruslardan  $10^4$  kez daha yüksektir. Her hangi bir zamandaki virus popülasyonu ise türümsü olarak adlandırılan çeşitli oranlarda bir grup farklı mutantların karışımından oluşabilmektedir (22). Bu varyant popülasyonlar, enfeksiyon sırasında replike olan virusların çevre değiştirmeleri ile sürekli bir şekilde seleksiyona uğramaktadır (15).

Bununla birlikte virus-konak etkileşiminin bir sonucu olarak, enfeksiyonun doğal seyri sırasında konak immun yanıtının antiviral baskısı altında veya spesifik tedavi ile HBV genomunda dereceli olarak meydana gelen bazı değişikliklerin de mutasyon gelişiminde katkısının oldukça önemli olduğu belirtilmektedir (2, 14, 22). HBV nükleotid sekanslarının özellikle bazı bölgelerinin (hot spot) mutasyonlara duyarlı olduğu belirtilmektedir (22). Ancak, ORF'lerin üst üste binmesinin (overlap) de mutasyonların gelişmesini zorunlu hale getirdiği bildirilmektedir (9).

HBV mutasyonları viral yapı proteinleri ve HBV genomu tarafından transkripsiyonu yapılan RNA veya DNA'nın üç boyutlu yapısını değiştirebilmektedir. Bu da büyük olasılıkla HBV'nun klinik önemine etki etmektedir (46).

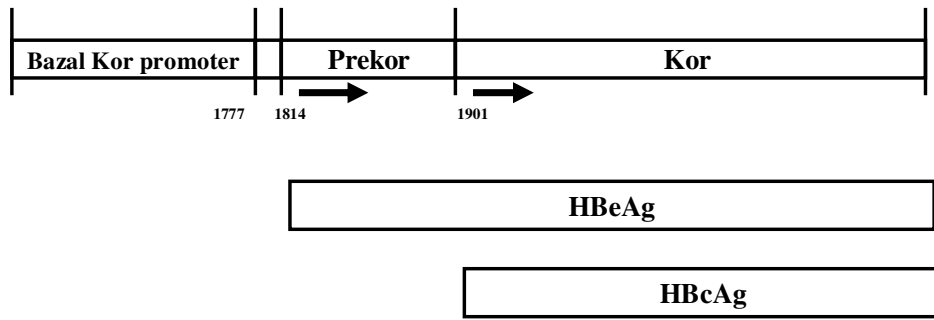
Bu HBV mutantları, konağın immun sistemi tarafından tanınmasında önemli epitoplarda değişim, HBV replikasyon seviyesinde artma ile birlikte artmış virulans, antiviral tedaviye karşı direnç veya konak hücreye tutunma/penetrasyonda kolaylaşma gösterebilmektedir (14).

### 2.5.2.1. HBcAg ve HBeAg

HBc proteini viral kapsidin yapısal bir proteini olup, pregenomik RNA'dan tercüme edilmektedir. İkozahedral kapsid "kor antijeni" olarak adlandırılan 183-kalıntı protein dimerlerinden oluşturulmuştur. HBcAg'nin 150-183 kalıntı proteinleri RNA paketlenmesi için gerekli protamin-benzeri bir domain, 1-149-kalıntı proteinleri genellikle alfa helikal yapıda olan "assembly domaini ve 78-137-kalıntı proteinleri ise spike (çıkıntı) domainleri olarak bilinmektedir. Alt ünitelerin dimer gruplaması 4 uzun alfa-heliks radial grubunu içeren iskelet yüzeyinde sivri uçlu çıkıntıları (spike) oluşturmaktadır (46).

HBeAg prekürsörü, prekor bölgesi ve kor geni tarafından kodlanmaktadır (Şekil 2.5) (46, 47). HBeAg *in vitro* HBcAg dimerizasyonunu engelleyerek yavaş HBV DNA replikasyonu ile gözlenmektedir bu sebeple pregenomik RNA enkapsidasyonunu azaltmakta ve immunolojik toleransa sebep olabilmektedir. HBcAg ve HBeAg aynı genden orjin almasına rağmen antijenik olarak çapraz reaksiyon göstermezler. HBcAg, kor geninin 1-183 aa kalıntılarında oluşmuştur (46). Buna karşın HBeAg,

hepatositlerden sekresyon sırasında N-terminal ucundan 19 aa ve C-terminal ucundan 34 aa kaybetmektedir ve albumin ve immunoglobulinler gibi plazma proteinleri ile birlikte sirküle olmaktadır (47). Ancak HBeAg'nin immunodominant epitoplarının yaygın bir peptid zinciri olduğu düşünülmektedir. HBcAg dimerler içermesine karşın HBeAg'nin monomerik olduğu düşünülmektedir. Bunların bir örnek antijeniteleri muhtemelen bu proteinlerin farklı fiziksel safhalarında ortaya çıkmaktadır. Hatta büyük HBc epitopu, HBc agregasyonunu gerektiren bir konformasyonel epitoptur. Eğer agregatlar denatüre edilir ise HBc antijenitesi kaybolmaktadır (46).



Şekil 2.5. HBV prekor ve kor gen ürünleri.

### 2.5.2.2. Kronik HBV Enfeksiyonu ve HBeAg

Prekor ve kor genleri tarafından kodlanan HBeAg HBV enfeksiyonunda önemli bir enfektivite belirteçidir (22). Kronik hepatit B'li hastalar tipik olarak serumda tespit edilebilen DNA seviyesi ile birlikte HBeAg pozitifler (16). HBeAg konak sitotoksik T hücrelerinin hedefi olarak bilinmekte ve bu antijenin ortadan kaybolması HBV'nin immun sistem tarafından temizlenmesi anlamına geldiği bildirilmektedir. HBeAg antijenemisine karşı serokonversiyon ile oluşan anti-HBe antikoru, kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyri sırasında spontan bir şekilde meydana gelebilmektedir (22). Bu süreç genellikle, karaciğerde HBV replikasyonunun azaldığını ve enfeksiyonun doğal seyri sırasındaki düşük enfektiviteyi göstermektedir (16, 22). Yaklaşık 30 yıl öncesinde, HBeAg'nin HBV replikasyonunun güvenli ve duyarlı bir belirteci olduğu düşünülmekteydi. Ancak bazı HBeAg negatif hastalarda, HBV replikasyonu, anti-

HBe'nin varlığında bile yüksek seviyelerde devam etmektedir. HBV'nin HBeAg'nin yokluğunda replike olabileceği açık hale gelmiştir. Hastalığın bu şekli HBeAg negatif kronik hepatit B olarak bilinmektedir (16).

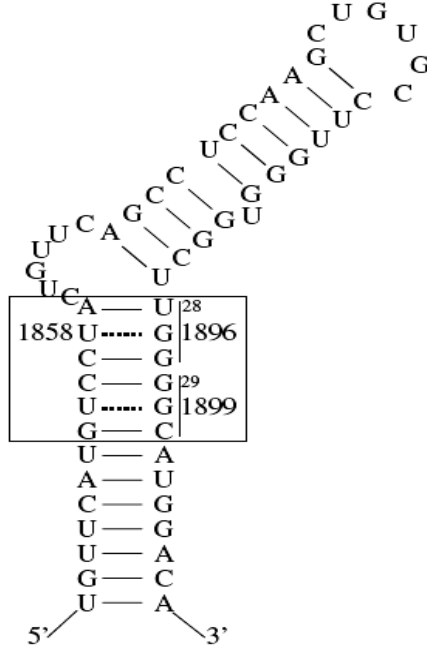
HBeAg negatif kronik hepatit B'li hastaların toplam sayısının Akdeniz bölgesinde daha yüksek olduğu belirtilmekte ve %33'e kadar ulaştığı tahmin edilmektedir. Ancak HBeAg seroklirensi gerçekleşmiş hastalar arasındaki HBeAg negatif kronik hepatit B prevalansının Asya'lı hastalarda (%36), Akdenizli hastalardan (%24) daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Asya'lı hastalarda HBeAg negatif hastalar daha yüksek oranda aktif karaciğer hastalığına sahip olduğu belirtilmektedir (16).

### **2.5.3. Kronik HBV Enfeksiyonu Sırasında Gelişen Mutantlar**

HBV genomunda mutasyon ve delesyonlara sıklıkla persistan enfeksiyonlar sırasında rastlanmaktadır. Viral genomun mutasyonel aktif (hot-spot) bölgesi olarak prekor ve kor promoterları ile prekor ve kor gen ORF'leri ve pre-S gen bölgesi belirlenmiştir (48). Prekor, kor gen ve bazal kor promoter bölgesi viral persistans ve kronik hepatitin klinik seyriyle en sıklıkla ilişkili gen bölgeleridir (9). Daha önce yapılmış olan çalışmalarda, prekor ve bazal kor promoter ve pre-S gen bölgelerindeki mutasyonların HBV enfeksiyonunun ilerlemesinde veya fulminant bir şekilde sonuçlanmasıyla ilişkili olabileceği ortaya konmuştur (13, 14).

#### **2.5.3.1. Prekor Gen Bölgesindeki Mutasyonlar**

Prekor gen bölgesi, pregenomik RNA'nın polimeraza bağlanan "U şeklinde kıvrılan" (hairpin) yapısını (nt. 1855-nt. 1899 ile nt. 1858- nt. 1896 ile eşleşmiştir, (Şekil 2.6) oluşturduğu için, replikasyonda önemli bir rol oynar. Bu protein RNA etkileşimi pregenomik RNA'dan henüz olgunlaşmamış kor partikülüne enkapsidasyonunun ilk basamağı olarak göz önünde bulundurulmaktadır. Ayrıca, (-) DNA zincirine reverse transkripsiyon bu "U şeklinde kıvrılan yapı" içinde başlatıldığı bulunmuştur. Ayrıca bu "U şeklinde kıvrılan yapı"nın oldukça korunmuş olduğu belirtilmektedir (20).



**Şekil 2.6.** Prekor gen bölgesinde, pregenomik RNA'nın polimeraza bağlanan U şeklindeki (hairpin) yapısı (46).

İnterferon tedavisi başarısız olan kronik hepatit B'li viremik HBeAg negatif hastalar arasında yapılan çalışmalar, HBV'nun prekor bölgesi defektif varyantlarının ortaya çıkarılmasına sebep olmuştur (21). Kronik HBV enfeksiyonlu birçok HBeAg negatif hastada HBV genomunun prekor bölgesinde mutasyonlar bildirilmiştir (3, 24, 49). HBV prekor ve kor ORF'si HBeAg proteinini kodlar. Bir hastanın serumunda HBeAg'nin varlığı aktif viral replikasyon ve yüksek enfektif durum ile ilişkilidir. Sonrasında serumda HBeAg'nin kaybı ile hastada anti-HBe serokonversiyonu gelişir. Genellikle bu viral replikasyonun azaldığının ve karaciğer hastalığının gerilediğinin işaretidir. Ancak HBV varyantlarında, enfeksiyöz virionların replikasyonunun devamına rağmen HBeAg üretiminin durduğu tanımlanmaktadır (9).

Bu bölgedeki mutasyonlar ile hepatositlerde, enkapside olmamış replikasyon araçlarının birikmesi ve viral birleşmenin (viral assembly) bloke olması ile viral replikasyonu etkilerler. Bu durum, replikasyon araçlarının kromozomal DNA'ya entegrasyonunu artırarak hepatokarsinogeneze katkıda bulunmaktadır (24).





Prekor gen bölgesindeki delesyon mutantları da HSK riski artırabilmektedir. HBV varyantları ile enfeksiyon, HBeAg sentez boyutunda bozukluk meydana gelir ve Akdeniz bölgesi, Uzak Doğu'daki kronik karaciğer hastalarında yaygınlıkla görülmektedir (24).

HBeAg'de kısaltmaya neden olan 1817, 1874 ve 1879. pozisyonlarda mutasyonlar da bildirilmiştir. Ayrıca, 1814, 1815 ve 1816. pozisyonda başlangıç kodonunu etkileyen nükleotid değişiklikleri de bildirilmiştir (44).

Prekor bölgesinde görülen stop kodon oluşumu ile sonuçlanan mutasyon yaygınlıkla HBeAg negatif kronik taşıyıcılarda görülmekle birlikte, HBeAg pozitif asemptomatik taşıyıcılar ve anti-HBe pozitif kronik aktif hepatitli hastalarda bu bölgede nükleotid değişimine artan bir eğilimin olduğu bildirilmektedir (46).

#### **2.5.3.1.1. HBV Genotip ve Prekor Gen Mutasyonlarının İlişkisi**

HBV genomunun sekans heterojenitesi, farklı coğrafik dağılıma sahip 8 genotipin oluşmasına yansımaktadır ve pregenomik RNA seviyesinde baz eşleşmesinin gerekliliği nedeni ile (9) prekor bölgesinde G1896A nokta mutasyonunun viral genotipler arasındaki dağılımı da farklılık göstermektedir (46).

Prekor bölgesi, HBV'nin etkili bir şekilde replikasyonunda önemli yere sahip olan HBV pregenomundaki RNA enkapsidasyon sinyali ile üst üste binen bir gen bölgesidir. Bu sebeple prekor bölgesinde nükleotid değişimi veya delesyona sahip mutantlar enkapsidasyon sinyalindeki "ilmik gövde"nin yapısını değiştirerek işlevini bozmaktadırlar (Şekil 2.8). Genotip B, C, D ve E gibi 1858. nt.'de T'e sahip genotiplerde, enkapsidasyon sinyali G1896A prekor mutasyonu taşıyan dizilerde daha stabildir (46). Bu sebeple G1896A mutasyonunun varlığının, genotip B, C, D ve E gibi, T1858'e sahip genotipler ile sınırlı olduğu düşünülmektedir (9, 49).

1858. nükleotid (C) RNA enkapsidasyon sinyalinin sekonder yapısındaki 1896. nükleotide komplementer yapı olup 1896 (G) numaralı nükleotid ile karşılıklı gelmektedirler. Sekonder yapının oldukça stabil olduğu belirtilmektedir (46, 52, 53). Bu stabilite ise Watson-Crick'in G=C baz eşleşmesi ile desteklenmektedir. Genotip A ve F'de ise 1858. nükleotide T yerine C bulunmaktadır. Bu sebeple G1896A mutasyonu



### 2.5.3.2. Kor Promoter (Bazal Kor) Gen Bölgesindeki Mutasyonlar

Bazal kor gen bölgesi, prekor gen bölgesinin üst kısmındadır (upstream) ve bu bölge viral replikasyonu düzenlemektedir. Bazal kor gen bölgesi TA-yönünden zengin diziler içermekte olup, prekor mRNA'sı ve kor mRNA/pregenom transkripsiyonunun başlatılması için başlatıcı ve "TATA bölgesi" (TATA box) olarak görev yapmaktadır (24). Yani bazal kor gen bölgesi, prekor mRNA'sı ve pregenomik mRNA'nın transkripsiyonunu düzenlemektedir (46). Bazal kor gen bölgesindeki mutasyonlar, pregenomik RNA'nın ve prekor mRNA'nın transkripsiyonunu azaltır ve HBeAg sekresyonunda azalmaya neden olur (24). Yapılan çalışmalarda, kor promoter bölgesindeki mutasyonların birçok HBeAg negatif hastada bulunabileceği bildirilmektedir (49). Bazal kor promoter bölgesinde en yaygın mutasyon; 1762/1764. nükleotidlerdeki AGG'den TGA'ya dönüşüm (TA değişimi) şeklinde olan ikili mutasyonun (bazal kor promoter mutasyonu) olduğu bildirilmektedir. Bu mutasyonun, kor mRNA transkripsiyonunu etkilemeksizin prekor RNA transkripsiyonunu önleyerek (baskı altında tutarak), HBeAg ekspresyonunu azalttığı belirtilmektedir (9, 15, 46, 47). Bu değişimin, kor promoterda nükleer reseptör bağlanma alanının, hepatosit nükleer faktör-1 (HNF-1) bağlanma alanına dönüşmesine neden olduğu düşünülmektedir. Böyle mutasyonların daha az prekor mRNA'sı oluşturduğu ve pregenomik RNA'ya etkisi olmadığından (46), artmış viral replikasyonla ilişkili olduğu ve anti HBe pozitif kronik HBV taşıyıcılarında daha yaygın bulunduğu düşünülmektedir (9, 46).

Çok daha az sıklıkta görülen 1653. nükleotidte C'den T'ye dönüşüm ve 1753. nükleotidte T'den V (C/A/G)'ye dönüşüm şeklinde ortaya çıkan mutasyonlar da büyük öneme sahip olduğu bildirilmektedir (46).

Bazı hastalarda TA değişiminin, G1896A mutasyonu ile ilişkili olmaması, kor promoter bölgesinde bu mutasyonların yalnız başına HBeAg temizlenmesinde rol oynayabileceğini gösterdiği bildirilmektedir. Bu hipotez, in vitro olarak TA değişiminin prekor mRNA transkripsiyonu ve HBeAg sekresyonunu azaltmasının gözlenmesi ile desteklendiği belirtilmektedir. Ancak TA değişiminin, özellikle kronik hepatitli bazı HBeAg pozitif hastalarda da bulunabildiği belirtilmektedir. Bu sebeple kor promoter mutasyonlarının HBeAg temizlenmesindeki rolü açık değildir (49).

Başlangıçtaki çalışmalar, G1896A mutasyonunun özellikle fulminant hepatitli veya kronik aktif hepatitli hastalarda bulunduğunu bildirmiştir, bu da prekor stop kodon mutasyonunun oldukça patojenik olabileceğini göstermekteydi. Daha sonraki çalışmalarda, G1896A mutasyonunun asemptomatik taşıyıcılarda da bulunabileceği gösterilmiştir. Ancak yine de, G1896A gelişmesi ile ilişkili HBeAg serokonversiyonunun, karaciğer hastalığının remisyon ile sonuçlanmasına olan etkisinin daha az olması ile ilgili şüphelerin bulunduğu belirtilmektedir. Benzer bir şekilde ilk çalışmalarda kor promoter mutasyonlarının özellikle fulminant hepatit veya kronik aktif hepatitli hastalarda bulunduğu bildirilmiştir, ancak daha sonraki çalışmalarda TA değişiminin asemptomatik taşıyıcılarda da bulunduğu gösterilmiştir. Bu sebeple, TA değişiminin HBeAg serokonversiyonundan sonra karaciğer hastalığının ciddiyeti veya seyrine olan etkisi açık değildir (49).

Kronik HBV enfeksiyonu haftalar ve yıllar içinde değişim göstermektedir. Tipik olarak başlangıçta HBeAg pozitif fazı, anti-HBe serokonversiyonu izlemektedir ve düşük seviyelerde replikasyon sırasında da HBeAg negatif faz gözlenmektedir. Bu süreç prekor veya kor promoter mutasyonları olmayan wild-tip varyantların, prekor veya kor promoter varyantlarının hakim olduğu viral türümsülere progresif dönüşümü ile karakterizedir. Geçiş aşamasında (serokonversiyon sürecinde), her iki popülasyon çeşitli miktarlarda tespit edilebilmektedir. Bu varyantların, düşük immun tolerans ile ilişkili HBeAg'nin azaldığı zamandaki sitotoksik T lenfositlerinden kaçarak seçildiği ileri sürülmektedir. Seleksiyon baskısının prekor ve kor promoter varyantlarının seleksiyonundan sorumlu tutulduğu, ancak açık olarak belirlenmesi gerektiği bildirilmektedir (15).

HBeAg, prekor mutasyonu gelişmiş HBV varyantları ile enfekte hastalarda, ortamda wild-tip virus varlığı nedeni ile halen tespit edilebilmektedir. Lamivudin tedavisi sırasında, G1896A prekor mutasyonlu veya 1762/1764 kor promoter mutasyonuna sahip HBV varyantı ile enfekte bazı hastalarda HBeAg durumunda eski haline dönme ile karşılaşılabilirdiği bildirilmektedir. Burada wild-tip virusun öncelikli olarak seleksiyonunun söz konusu olduğu belirtilmektedir (44).

Prekor ve kor promoter gen bölgelerindeki mutasyonların asemptomatik hepatit B taşıyıcılarında da bulunabilmesi, akut fulminant hepatitin gelişmesi ile ilişkili evrensel spesifik bir genomik mutasyon paterninin henüz tanımlanmadığı

belirtilmektedir. Bu sebeple prekor ve kor promoter mutantlarının, HBV taşıyıcılarında HBV ile ilişkili ciddi hepatitin gelişmesindeki rolünün tartışmalı olduğu belirtilmektedir. Son zamanlarda da HBV genotiplerinin kronik HBV enfeksiyonunun klinik sonuçlarından, interferon tedavisine yanıtta, spontan HBeAg serokonversiyonu oranından ve lamivudin direncinin gelişmesi ile ilişkili olduğunun gösterildiği belirtilmektedir (14).

Bazal kor promoter ve prekor genlerindeki bildirilen önemli mutasyonlar Çizelge 2.5’de belirtilmiştir (44).

**Çizelge 2.5.** Bazal kor promotör ve prekor gen bölgelerinde bildirilen önemli mutasyonlar (44).

Regülatör bölge veya gen	Mutasyon	Ortaya çıkan amino asit değişikliği	Yorumlar
<b>Bazal kor promotör</b>	A1762T/G	—	HBeAg antijeninin ekspresyonunda azalma. HNF4 bağlanma alanında değişme. Fulminant hepatit ile ilişkili. İn vitro HBeAg ekspresyonu deneyleri gerçekleştirilmiştir.
	G1764A/T	—	HBeAg antijeninin ekspresyonunda azalma. HNF4 bağlanma alanında değişme. Fulminant hepatit ile ilişkili. İn vitro HBeAg ekspresyonu deneyleri gerçekleştirilmiştir.
	T1753A/C	—	HNF4 bağlanma alanında değişme. “Enhancer II” içindeki G1613A ve C1653T ilişkili ilerlemiş karaciğer hastalıkları için potansiyel belirteç.
	5-21 bp’lik delesyonlar	—	Bazı delesyonlar tanımlanmıştır, en yaygın olanları 8 bp’lik olanlardır. Delesyonların çoğu, TATA bağlayan proteine bağlanabilen ikinci TA yönünden zengin bölgeyi etkilemektedir. Bu da HBeAg ekspresyonunda azalma ile sonuçlanmaktadır.
	İnsersiyonlar	—	Yeni HNF bağlanma alanı oluşturduğu bildirilmiştir. Fulminant hepatit ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.
<b>Prekor</b>	A1814T/C	M1L	Start kodonu bozmakta ve HBeAg’de azalmaya neden olmakta.
	T1815C/A/G	M1T/K/R	Start kodonu bozmakta ve HBeAg’de azalmaya neden olmakta.
	G1816A/T	M1I	Start kodonu bozmakta ve HBeAg’de azalmaya neden olmakta.
	C1817A	Q2Stop	Kodon 2’de stop kodon oluşması HBsAg’de kısalma ve azalma ile sonuçlanmaktadır.
	C1856T	P15S	Kodon 1898 ile baz eşleşmesine karışmaktadır.
	C1857T	P15L	Kodon 1897 ile baz eşleşmesine karışmaktadır.
	T1858C	Değişiklik yok	Kodon 1896 ile baz eşleşmesine karışmaktadır; C1858 genotip A ve F’de, ayrıca genotip C’nin bazı suşlarında bulunması, G1896C prekor stop mutantlarının seleksiyonunu engellemektedir.
	A1874T	K20Stop	Kodon 20’de stop kodon oluşması HBsAg’de kısalma ve azalma ile sonuçlanmaktadır.
	G1896A	W28Stop	Kodon 28’de stop kodon oluşması HBsAg’de kısalma ve azalma ile sonuçlanmaktadır.
	G1897A	W28Stop	Kodon 28’de stop kodon oluşması HBsAg’de kısalma ve azalma ile sonuçlanmaktadır.
	G1898A	G29S	Kodon 1856 ile baz eşleşmesine karışmaktadır.
	G1899A	G29D	Kodon 1855 ile baz eşleşmesine karışmaktadır.
	İnsersiyonlar	1838/39 1899/1900	Çerçeve kayması (frame-shift) mutasyonu HBeAg sentezinde bozulma ile sonuçlanmaktadır.
	Delesyonlar	1839	Çerçeve kayması (frame-shift) mutasyonu HBeAg sentezinde bozulma ile sonuçlanmaktadır.

### 2.5.3.3. Kor Gen Bölgesindeki Mutasyonlar

Son zamanlarda, kronik enfeksiyon sırasında kor protein dizisinin, araştırmacıların ilgi merkezi haline geldiği belirtilmektedir (9). HBV kor antijeni (HBcAg), HBV ile enfekte hepatositlerin sitotoksik T lenfosit aracılı lizisinde hedef yapı olduğu için mutasyonlara da duyarlı olduğu belirtilmektedir (22). HBeAg negatif faz sırasında kor geninde, T-hücre epitop bölgesini eksprese eden bölgesinde aminoasit değişikliği ile sonuçlanan, bir grup mutasyonlar/delesyonlar ortaya çıkarılmıştır (9). Tsai ve arkadaşları (56) hepatit B'li hastalarda, HBV ile enfekte karaciğer hücre membranında HLA sınıf I moleküllerinden izole edilen peptid antijeninin analizi ile bu antijenlerin hepatositlerde işlendikten sonra MHC sınıf I moleküllerinde sunulduğunu ve CD<sup>8</sup> sitotoksik T hücreleri tarafından tanındığını ortaya çıkarmışlardır. Kor proteininde mutasyonların sebep olduğu konformasyonel değişiklik sonucu gelişen epitop değişikliğinin, virusun B hücre ve T hücre yanıtından kaçmasına öncülük ettiği bildirilmekte ve viral persistans ve aktif karaciğer hastalığı ile ilişkili olduğu düşünölmektedir (9).

### 2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) Tekniği

PCR, 1985 yılında ilk kez Kary Mullis tarafından amplifikasyona dayanan sistem olarak keşfedilmiştir (57). Günümüzde ise moleküler biyolojinin temel uygulama tekniklerinden birisi olarak kabul edilmektedir.

PCR, nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir tüp test sistemidir. Hedef DNA/RNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna imkan verir. *In vivo* şartlarda bölünen bir hücrede DNA'nın replikasyonu, çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir. Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PCR'de in vivo çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir (58).

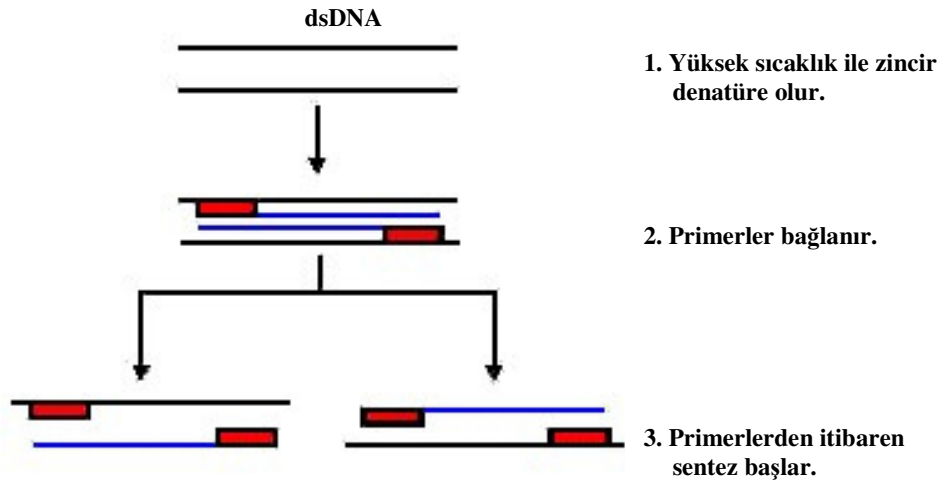
Amplifikasyon bazlı teknikler; birinci reaksiyonda üretilen bütün nükleik asitlerin bir sonraki reaksiyon için kalıp görevi gördüğü, birbirini izleyen siklus serisi içinde tekrarladıkları için ‘zincir reaksiyonu’ (chain reaction) olarak adlandırılmıştır (57).

PCR, dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan DNA parçasını çoğaltmak için kullanılır. İki tane oligonükleotid, DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primerleri olarak kullanılır. Bu oligonükleotidler farklı dizilere sahip olup, kalıp DNA’nın karşılıklı dizilerinde bağlanırlar. Kalıp DNA ilk önce primerlerin varlığında denatüre edilir. Reaksiyon karışımı daha sonra, kalıp dizilere, primerlerin bağlanması için gereken sıcaklığa düşürülür. Bağlanmış olan primerler, uygun sıcaklığa çıkartılarak DNA polimeraz ile uzatılması sağlanır (59).

Kısaca PCR, temel olarak tekrarlayan 3 aşamalı bir yol izler (Şekil 2.9) (60, 61).

Bunlar:

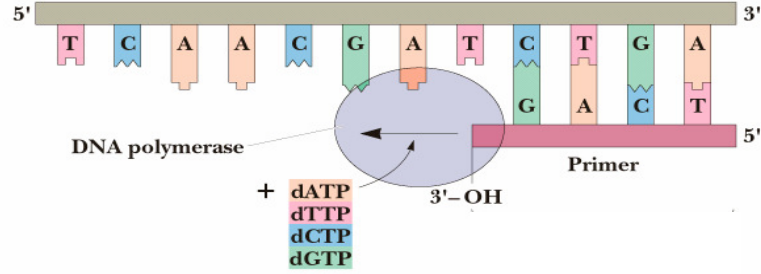
1. Çift iplikli DNA (dsDNA)’nın ısı (90-95°C) ile tek iplikli DNA (ssDNA)’ya denatürasyonu
2. Ortamın 40-60°C’ye soğutulmasıyla primerlerin (spesifik sentetik oligonükleotidler) ssDNA’ya bağlanması (annealing)
3. Sıcaklığın 70-75°C’ye yükseltilmesiyle ssDNA kalıplarına bağlanmış olan primerlerden doğru 5’-3’ yönünde zincir uzamasının (elongasyon) gerçekleşmesi (61).



Şekil 2.9. PCR aşamaları (60).



Zincir uzaması aşamasında kalıp DNA'ya bağlanmış primerlerin 3'-OH gruplarına kalıp DNA'daki bazlara uygun olarak deoksi-nükleotid-tri-fosfatlar (dNTP) bağlanarak zincirin uzaması sağlanır. Bu işlem termo stabil bir DNA polimeraz enzimi olan *Taq* polimeraz ile katalize edilir (Şekil 2.10) (61).

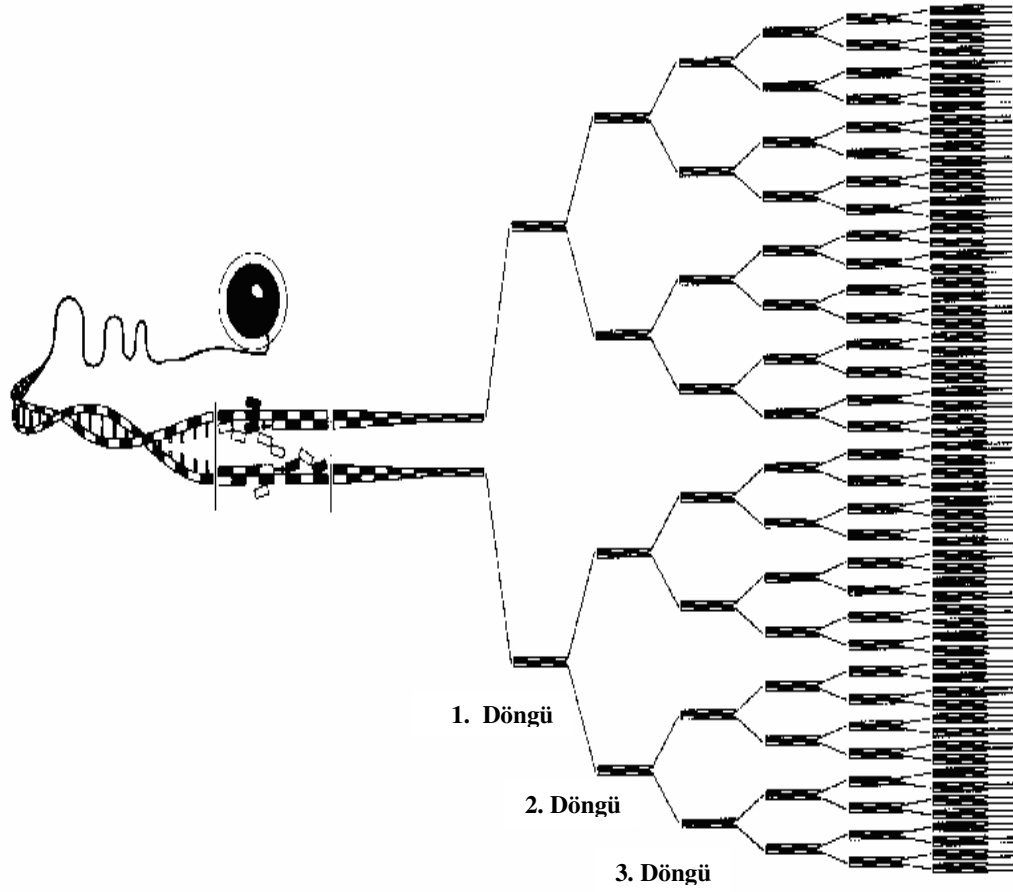


Şekil 2.10. Zincir uzaması (61).

Uzamayı takiben orjinal DNA segmenti; yeni komplementer DNA (cDNA)'lar ve bunu takiben yeni kalıp DNA'lar oluşturur. Böylece her PCR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır (61).

Uygun şartlarda meydana gelen, denatürasyon, bağlanma ve uzama ile meydana gelen ilk basamak amplifikasyon işlemi ile DNA sentezi gerçekleşir. Daha sonra bu işlem bir çok kez tekrarlanır (59). Eğer bu üç siklus tekrarlatılırsa yani yeni zincirleme reaksiyon başlatılırsa, her sıklusta bir öncekinin iki katı DNA molekülü (sadece primerler arasında kalan bölge) elde edilir. Bu düzen dahilinde yapılan yaklaşık 20-35 siklusun tamamlanmasıyla hedef nükleik asitin miktarı görünür bir şekilde milyon-trilyon kez ( $10^9$ - $10^{12}$ ) artmaktadır (Şekil 2.11) (57, 62) .

Reaksiyon ortamındaki tüm bileşenlerin (tampon, nükleotidler, primerler, DNA ve enzim) termostabil olmaları nedeniyle, her siklus için sadece belirtilen sıcaklık değişikliklerinin yapılması yeterlidir. Bu işlem programlanabilir bir cihaz (Thermal Cycler) ile otomatik olarak yapılmaktadır.



Şekil 2.11. PCR döngüleri (62).

### 2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri

Standard bir PCR reaksiyonu genellikle 50-100  $\mu\text{L}$ 'lik bir hacimde, 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  jelatin, 0.25  $\mu\text{M}$  primer çifti, 200  $\mu\text{M}$  dNTP (herbir dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2.5 U *Taq* polimeraz ve örnek DNA'nın varlığında gerçekleştirilir. Reaksiyon ısı (termal) döngülerin programlandığı ve uygulandığı bir "ısı döngü cihaz" (Thermal Cycler)'ında gerçekleştirilir. Genel olarak 94°C'de 20 sn'lik denatürasyon, 55°C'de 20 sn'lik bağlanma ve 72°C'de 30 sn'lik uzamadan oluşan 30 sikluluk bir döngü programı farklı uzunluklardaki birçok hedef dizilerin amplifikasyonu için kullanılabilir (61).

PCR'ın bileşenleri:

- Enzim
- Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTP)
- PCR Tampon içeriği
- Oligonükleotidler (Primer)
- Hedef diziler
- Sıcaklıklar ve döngü Parametreleri

- *Enzim*

Oldukça yaygın kullanılan DNA polimeraz, *Thermus aquaticus*'dan izole edilen *Taq* polimerazdır. *T. aquaticus*'un avantajı, yüksek sıcaklığa dayanıklı olmasıdır. Ancak diğer termostabil DNA polimerazlar da kullanılabilir. *T. thermophilus* DNA polimeraz, *Bacillus stearothermophilus* DNA polimeraz ve *Thermococcus litoralis* DNA polimeraz gibi alternatif termostabil enzimler de kullanılabilir. *Taq* polimerazın aktivitesi kabaca 65-72°C arasında iki katına çıktığı için çalışmadaki ısı da önemlidir. *Taq* polimeraz aktivitesi 10 mM Tris'de 8.2-9.0 pH aralığında (25°C'de ölçülen) optimaldir ancak daha düşük veya yüksek pH aralığında aktivitesi azalmaktadır (63).

PCR protokollerinde kullanılan enzimlerin konsantrasyonu önemli derecede değişkendir. Günümüzde en sıklıkta tercih edilen *Taq* polimeraz çoğunlukla reaksiyonlarda 1-2.5 U/ 100 µL konsantrasyonlarda kullanılır. Enzim konsantrasyonu çok yüksek olduğunda non-spesifik eşleşme, düşük olduğunda ise zayıf amplifikasyon etkisi olur (59).

- *Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTP)*

dNTP'lerin optimal konsantrasyonu her reaksiyon için ayrı ayrı hesaplanmalı ve Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonu ile uyumlu olarak kullanılmalıdır. Genelde dNTP konsantrasyonu 20 ile 200 mM arasındadır. Yüksek konsantrasyonlar düşük reaksiyon spesifitesi ve

yüksek maliyet ile sonuçlanırken, düşük konsantrasyonlar normale göre daha az ürün eldesi ile sonuçlanır (59).

dNTP'lerin herbiri liyofilize veya nötralize sulu solüsyonlar olarak elde edilebilir. -20°C'de herbiri birkaç ay stabildir fakat liyofilize olanların kullanmadan önce KOH ile nötralize edilmeleri gerekebilir. dNTP'ler son konsantrasyonları 100 mM olacak şekilde hazırlandıkları zaman, küçük hacimlerde (herbir 20 mM dNTP'den 50 µl) paylaşılabilirler ve birkaç ay -20°C'de 100 katlı konsantrasyon şeklinde saklanabilirler (63).

- **PCR Tampon İçeriği (Reaksiyon Tamponu)**

Çeşitli reaksiyon tamponu formülasyonları bildirilmiştir fakat 1988'de Saiki ve arkadaşlarının tanımladığına benzer bir görüş birliği ortaya çıkmaya başlamıştır. Buna göre bir PCR tamponu; final konsantrasyonunda, 10 mM Tris (pH 8.4) , 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, %0.01 jelatin, %0.01 NP<sub>40</sub> ve %0.01 Tween 20 içerir. Non-iyonik deterjanlar yerine %0.1'lik Triton X-100 kullanılabilir. Tuz konsantrasyonu değiştirilebilir (KCl'ü azaltmak veya ortadan kaldırmak için) ve yükseltilmiş magnezyum konsantrasyonu ile primerlerin daha iyi çalıştığı gözlenir. Ayrıca dNTP'ler ile magnezyum arasında dayanıklı etkileşimler de gözlenir. Bunun sonucunda dNTP'lerin yüksek konsantrasyonu magnezyuma bağlanır ve mevcut magnezyum konsantrasyonunu azaltır. Bu yüzden eğer dNTP'ler yüksek konsantrasyonda kullanılıyorsa, magnezyum konsantrasyonunu arttırmak gerekebilir (63).

PCR reaksiyon tamponundaki değişiklikler efektif bir amplifikasyonu önemli ölçüde etkilemektedir. Özellikle MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu amplifikasyonun gerçekleşmesinde ve spesifitesinde oldukça önemlidir. Genellikle herbir dNTP'nin 200 mM konsantrasyonunda bulunduğu bir reaksiyonda, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> optimal olarak kullanılabilir. Bununla beraber bazı reaksiyonlarda, farklı Mg<sup>+2</sup> miktarı da gerekebilir. Reaksiyona katılan Mg<sup>+2</sup>, önemli bir enzim kofaktörü olup, sentez olayını katalize etmenin yanında, hedef dizine primerlerin bağlanmasında da ayarlayıcı rolü olan bir elemandır. Konsantrasyondaki artış başlangıçta primer bağlantısının zayıf olmasına ve yanlış eşleşmelere neden olabilmektedir. Diğer taraftan yine yüksek Mg<sup>+2</sup>

konsantrasyonu, zayıf reaksiyon spesifitesine, düşük  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu ise zayıf reaksiyon etkinliğine neden olabilmektedir. Reaksiyonda kullanılacak  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu, nükleotid konsantrasyonu gibi hesaplanmalıdır (61).

- ***Oligonükleotidler (Primerler)***

Oligonükleotidler genellikle 18-30 baz arasında sentezlenir ama daha az karmaşık olan DNA'ların (plazmidler veya daha önceden amplifiye edilen DNA'lar) amplifikasyonu için daha kısa primerler kullanılabilir (63).

Bir PCR'de başarılı bir amplifikasyon için önemli değişkenlerden biri olan primerlerin doğru tasarlanmasıdır. İyi tasarlanmış primerler arka plan ve özgül olmayan ürünlerin oluşmasını engellemeye yardımcı olur (59). Primer dizilerinin G+C içeriği, amplifiye edilecek bölgenin G+C içeriğine yakın olmalıdır. Özellikle 3' ucunda sekonder yapılar taşıyan dizilerden kaçınılmalıdır. Primerler birbirleriyle komplementer oluşturacak nitelikte olmamalıdır. 24-30 bazlık uzun primerler 60°C ve üzerindeki bağlanma sıcaklığında oldukça iyi çalışmaktadır (63).

Düşük konsantrasyonda primer kullanımı az miktarda reaksiyon ürünü elde edilmesine, yüksek konsantrasyonlarda kullanım ise düşük spesifiteye neden olur ki bu durum jelde çok farklı amplikonların tespiti ile mümkündür. Ancak yüksek primer konsantrasyonları, primer-dimer artefaktlarının oluşmasına da neden olmaktadır. Primerlerin genellikle 0.1 ve 0.5  $\mu M$  arasındaki derişimi en elverişli olanıdır (61). Sık aralıklarla tekrarlayan dondurup-çözdürme olmaksızın hazırlanan primerler -20°C'de amonyumlu sıvılarda uygun bir şekilde saklanabilirler (63).

- ***Hedef diziler***

Bir çok farklı kaynak DNA'nın başarılı amplifikasyonu için materyal sağlayabilir. Bunun için DNA'nın amplifiye edilecek kısmının bozulmamış olması gereklidir. Bunun anlamı da parçalanmış DNA kaynağından amplifiye edilen kısımların

daha kısa olacaktır. Reaksiyon inhibitörlerinin (deterjan, EDTA, fenol kalıntısı) olmadığından da emin olmak önemlidir (63).

- ***Sıcaklık ve Döngü Parametreleri***

PCR reaksiyonu için gereken 3 termal aşama ve farklı sayılardaki döngüler günümüzde bir çok üretici firma tarafından üretilen ısı döngü (Thermal Cycler) cihazları ile gerçekleştirilmektedir (61).

PCR sırasında çift zincirli DNA molekülünün, tek zincirli hale gelmesi için denatürasyon işleminin etkili bir şekilde yapılması gerekir. Genellikle başlangıçta örneğin 94°C civarında 5 dakika boyunca ısıtılması başarılı bir denatürasyon için yeterlidir. Başarılı bir PCR'de primerlerin, hedef diziye bağlanabilmesi için moleküler etkileşimlerin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu da kritik bağlanma sıcaklığına bağlıdır (64).

Denatürasyondan sonra ortam sıcaklığı 40-60°C'ye düşürüldüğü zaman reaksiyon karışımındaki primerler komplementer oldukları kalıp DNA dizilerine bağlanırlar (61). Genelde yüksek bağlanma sıcaklığı, primerlerin hedef diziye daha spesifik bağlanmasında ve hedef dizinin çoğaltılmasında (amplifikasyon) oldukça önemlidir. Düşük sıcaklık ise, hedef dizi ile primer dizisi arasında daha fazla uygunsuzluğa neden olabilir ve hedeflediğimiz dizi dışındaki dizilerin non-spesifik olarak çoğaltılmasına neden olabilir. Pratikte 55°C'de gerçekleştirilen bağlanma başarılı bir PCR için uygundur. Optimal bağlanma sıcaklığı, genelde MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu ile optimize edilir (64).

Bağlanmayı takiben ortam sıcaklığı 70-75°C'ye çıkarıldığında, primerlerin 3' ucundan itibaren kalıp DNA'nın kopyasını teşkil edecek şekilde zincir uzamaları (elongasyon) başlar (61). Uzama zamanı hedef dizinin yoğunluğuna, uzunluğuna ve ısıya bağlıdır. Kalıp DNA zinciri üzerindeki primerlerin uzaması için kabul edilen en uygun ısı derecesi 72°C'dir. 1 dakikalık uzama zamanı genellikle uzunluğu 2 kb'a kadar olan ürünler için yeterli olmaktadır (59).

Optimal siklus sayısı 25-30 arasındadır, nadiren 35 siklus uygulanabilir. Bununla beraber, 35'den yüksek (40-45) siklus sayısı uygulandığında genelde ortamdaki PCR

karışımını oluşturan maddelerin azalması ile birbirleriyle olan kritik dengelerin bozulmasından kaynaklanan non-spesifik ürünlerin sentezlenmesi söz konusu olabilmektedir (61).

### **2.6.2. “Hot Start” (Sıcak Başlangıç) PCR Tekniği**

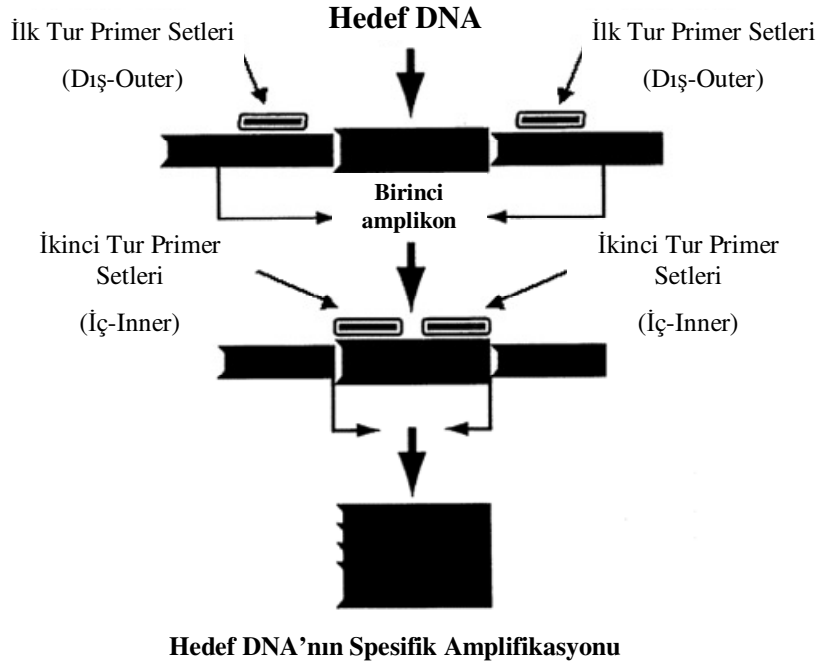
Bir PCR uygulaması sırasında yapılan temel işlem, reaksiyon bileşenlerinin (enzim,  $MgCl_2$ , dNTP'ler, primerler, tampon) bir tüp içinde karıştırıldıktan sonra (mastermix) hedef DNA'nın ortama konularak, thermal cycler da PCR protokolünün tamamlanması beklenir. Tüm bu işlemler sırasında reaksiyon ortamının maruz kaldığı sıcaklık 4-25°C arasında değişir. Hedef DNA eklenip sistem ısı döngü cihazına yerleştirilene kadar olan zaman dilimi içinde, hedef DNA ile primer arasında düşük eşleşme oranlı bir hibridizasyon meydana gelebilir. Bundan sonraki sıcaklık dereceleri 55-60°C'nin altına düşmese bile, spesifik olmayan ürünler sentezlenebilir ve bunlar reaksiyon spesifitesini önemli derecede düşürürler (64). Bu nedenle normal PCR protokolünde amplifikasyon karışımı hazırlanırken hedef DNA ve primerler arasında özgül olmayan bağlanmalar olabilmekte ve bu bağlanmaların polimeraz enzimi ile uzatılması sonucunda çok sayıda istenmeyen bant ortaya çıkabilmektedir. Bu istenmeyen reaksiyonları önlemek için geliştirilmiş olan “hot-start” PCR tekniğinde, temel maddelerden (polimeraz, nükleotidler,  $Mg^{+2}$  veya primerler) biri başlangıçta amplifikasyon tüpüne konulmamaktadır. Bu karışıma ilk denatürasyon işlemi uygulandıktan sonra eksik olan madde eklenir ve sıcaklık normal bağlanma derecesine soğutulur. Böylece özgül primer bağlanması gerçekleşir. Bu aşamadan sonra uygulanan amplifikasyon sonucunda daha net DNA bandı elde edilmiş olur (58).

### **2.6.3. “Nested” PCR Tekniği**

PCR duyarlılığındaki problemler, özellikle düşük kalitede veya düşük kopya sayısına sahip kalıp nükleik asitin bulunduğu durumda, artmaktadır. Nested PCR

teknikinin kullanılması ile amplifikasyondaki duyarlılık ve özgüllük belirgin biçimde artmaktadır (63).

Nested PCR tekniği, PCR ürünlerini doğrulanabilmesinde hızlı ve güvenilir bir yol sağlamaktadır. Genellikle iki primer çifti kullanılmaktadır (64). Bu teknikte birbirini izleyen iki PCR kullanılmaktadır ve her bir reaksiyon genellikle 25 sikluluk amplifikasyonu içermektedir. İlk PCR dış (eksternal-outer) primer çiftlerini içermektedir, ikinci PCR ise ilk primer çiftlerinin iç (internal-inner) kısmında iki nested primer çiftini içermektedir (63). İlk primer çifti ile elde edilen PCR ürünü, ikinci reaksiyonda kalıp olarak kullanılmaktadır ve ikinci primer çifti ile ilk ürünün içinde daha küçük bir yer hedeflenmektedir (Şekil 2.12). Nested PCR'nin doğru ürünlerin tespit edilmesinde duyarlılığın  $10^4$  kat artmasına neden olduğu tahmin edilmektedir. İlk tur PCR ürünü çok zayıf olarak görülse de nested PCR primerleri ile etkili bir amplifikasyonu takiben spesifik hedef güçlenebilmektedir (64). Bu muhtemelen ilk tur amplifikasyondan ikinci reaksiyona eklenen daha küçük fragmentlerin etkili bir şekilde denatürasyonunun olmaması sebebiyledir (63).



Şekil 2.12. "Nested" PCR tekniğinin şematik gösterimi (65).



Hedef dizin çok iyi bilinmemesi durumunda örneğin sadece sınırlı sayıda peptid dizi verileri bulunduğunda, iki internal (iç) primeri tasarlamak güç olabilmektedir. Ancak bu durumda da nested PCR uygulanabilmektedir. Böyle durumlarda, yeni internal primerlerden biri, orjinal primerlerden biri ile birlikte kullanılabilir. Alternatif olarak, orjinal primerlerden biri veya ikisinin 3'-ucundaki iki ve üç nükleotidin aynı olması, nested PCR'nın spesifitesini artırmada yeterli olabilmektedir. Çünkü PCR primerlerinin 3'-ucu, PCR amplifikasyonunun spesifitesini belirlemede oldukça önemlidir. 3'-nükleotidin kalıp ile komplementer olmaması durumunda amplifikasyon olmayabilmektedir. Bu sebeple nested PCR primerlerinin iki veya üç nükleotidi, nested primerlerin orjinal primerler ile overlap yapmasına rağmen, spesifik hedefin amplifikasyonuna izin vermektedir (64).

Manüplasyonları azaltmak ve kontaminasyon problemlerini engellemek için, ilk ve nested PCR reaksiyonları tek bir tüp içinde gerçekleştirilebilmektedir. Her iki primer çifti, PCR'nın bağlangıcında reaksiyona eklenir, ancak bu durumda nested primerlerin, ilk primer çiftinden daha düşük  $T_m$  değerinde tasarlanmaları gerekmektedir. Bu nested primerlerin annealing sıcaklığının üzerinde primer hedefin amplifikasyonuna izin vermektedir. Daha sonra ikinci PCR programı düşük annealing sıcaklığında gerçekleştirilir, bu da ilk PCR ürününden nested primer çiftleri ile spesifik PCR ürününün amplifikasyonuna izin vermektedir. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edilebilmektedir ve daha küçük nested amplifikasyon ürünü ile primer amplifikasyon ürününün her ikisi gözlenebilmektedir (64).

Orjinal ilk PCR ürününün amplifikasyonunu engellemek için, ilk PCR ürünü dilüe edilerek ikinci tur reaksiyon ayrı bir tüp için gerçekleştirilebilmektedir. Böylece ilk tur PCR ürünü tamamen ortadan kaldırılabilir (64).

## **2.7. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analizi**

RFLP, restriksiyon (kesim) enzimlerinin seçici DNA kesimi özelliği kullanılarak PCR ürünlerinin tanımlanmasında oldukça kullanışlı bir araçtır. Kesim enzimleri, çift zincirli DNA'yı nükeotid dizisi ile belirlenen belirli bölgelerden kesen enzimlerdir. Her enzim genellikle 4, 5, 6 veya 8 nükleotid uzunluğunda özgül nükleotid dizisini

tanılmaktadır. Tanıma bölgesi içindeki bir nükleotid değişse de enzim hedef DNA'yı artık o noktada kesmemektedir (66). RFLP analizi PCR ürünlerinin kesilmesi ve sonrasında da DNA parçalarının ayrıştırılması için agaroz jel elektroforezinden oluşmaktadır. Elektroforez sonrasında da kesim ürünleri jelin boyanması ile görüntülenmektedir. Bir PCR ürününün RFLP analizinde hangi kesim enzimi ya da enzimlerinin kullanılacağı, hangi nükleotid veya nükleotidlerin sorgulandığına bağlıdır (66).

Günümüzde, seçilebilecek yüzlerce enzim ticari olarak temin edilebilmektedir. Enzim kesimi için gerekli süre enzimin kesim etkinliğine ve kesilecek DNA miktarına bağlıdır. Kesim süresi, bir saat gibi çok kısa bir süreden bir gece gibi çok uzun süreye kadar değişebilmektedir (66).

## **2.8. Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi**

### *Agaroz jel elektroforezi:*

Hedef bölgenin amplifikasyonundan sonra, elde edilen ürünlerin bir şekilde belirlenmesi ve analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla uygulanan en basit klasik yöntem agaroz jel elektroforezidir (61). Agaroz, deniz yosunlarından elde edilmiş lineer bir polimerdir. Ticari olarak elde edilen agaroz tamamen saf değildir. Polisakkarid, tuz ve proteinler ile kontamine haldedir. Bu kontaminasyonun miktarı DNA'nın jelde göçünü etkileyebilmektedir. Bu yüzden firmalar agarozun kimyasal olarak formüle edilmiş formunu satmaktadırlar (67).

Elde edilen PCR ürünlerinin fragment büyüklükleri, çalışmanın en başında bellidir. Seçilen veya dizayn edilen primerlerin hedefledikleri bölge ya literatür bilgileri ile bilinir veya ilgili mikroorganizmanın gen haritasına bakılarak bu büyüklük hesaplanır. PCR'da elde edilecek olan fragment büyüklüklerinin de aynı olması gerekir. Bunun tespiti, elektriksel bir ortamda molekül ağırlığına göre ayrımının sağlandığı elektroforez metodlarıyla gerçekleştirilir. DNA negatif elektrik ile yüklü olduğundan dolayı pozitif kutba doğru göç eder. Agaroz jeli, porlu bir yapıya sahip olduğundan,

elektriksel ortamda göç eden DNA fragmentlerini büyüklüklerine göre birbirinden ayırır. Jel, ya elektroforezden önce veya elektroforezden sonra etidyum bromid gibi bir DNA boyası ile boyanır. Bu boya 312 nm dalga boyundaki UV ışığı ile floresan vermektedir (61).

Bu sebeple, etidyum bromid ile boyanmış jel UV transilüminatöründe görüntülenir ve fotoğrafı çekilerek incelenir. İstenen büyüklükteki DNA fragmentlerinin tespit edildiği örnekler “pozitif” kabul edilir. Fragment büyüklüğü hesaplamalarında, ticari olarak temin edilebilen standart DNA molekül ağırlığı belirteçleri kullanılmaktadır (61).

## **2.9. DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizi ya da "DNA Sequencing" bir DNA örneğindeki genetik kodu oluşturan 4 nükleotidin (Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin – A, G, C ve T) sırasının belirlenmesi anlamına gelmektedir (68).

DNA çift polimerdir ve G, C ile ve A, T ile eşleşir. DNA'nın bir zinciri, komplementer zincirin (cDNA) oluşturulmasını sağlar ve bu komplementer zincir orjinal zincirin tekrar oluşturulmasında kullanılabilir. Bu DNA replikasyonunun ve dolayısıyla moleküler biyoloji ve genetiğin temelini oluşturmaktadır (69). DNA dizi analizi yöntemleri temelde aynı prensibe dayalıdır. Bu yöntemler, her biri bir öncekinden bir baz daha fazla içeren seriler halindeki tek zincirli DNA molekülleri oluşturulması esasına dayanırlar. Bu moleküller elektroforezle dizinin okunabilmesini sağlayan merdiven şeklinde gözlenirler (Şekil 2.13).

=====	<b>T</b>	AAGGTAACCCCCCTAGTCGGAT
=====	<b>A</b>	AAGGTAACCCCCCTAGTCGGA
=====	<b>G</b>	AAGGTAACCCCCCTAGTCGG
=====	<b>G</b>	AAGGTAACCCCCCTAGTCG
=====	<b>C</b>	AAGGTAACCCCCCTAGTC
=====	<b>T</b>	AAGGTAACCCCCCTAGT
=====	<b>G</b>	AAGGTAACCCCCCTAG
=====	<b>A</b>	AAGGTAACCCCCCTA
=====	<b>T</b>	AAGGTAACCCCCCT
=====	<b>C</b>	AAGGTAACCCCCC
=====	<b>C</b>	AAGGTAACCCCC
=====	<b>C</b>	AAGGTAACCCC
=====	<b>C</b>	AAGGTAACCC
=====	<b>C</b>	AAGGTAACC
=====	<b>C</b>	AAGGTAAC
=====	<b>A</b>	AAGGTAA
=====	<b>A</b>	AAGGTA

Şekil 2.13. DNA dizi analizi ile DNA nükleotid dizilerinin ortaya çıkarılması.

### 2.9.1. Dizi Analizi Uygulamaları

- Koruyucu hekimliğin bir parçası olarak bireysel insan genomunun dizi analizi
- Genotip-fenotip arasında ilişki kurulmak istendiğinde hızlı hipotez testlerinde dizi analizi
- Çok hücreli organizma gelişmesinin bütün aşamalarında in-vitro ve in-situ gen ekspresyon profilinin çıkarılmasında dizi analizi
- Kanser araştırmaları: örneğin bireysel klonların ayrıntılı mutasyon serilerinin belirlenmesi, heterozigotluk analizi ve teşhis ve prognoz için tümör alt tiplerinin belirlenmesinde dizi analizi
- Bilinen veya yeni patojenlerin identifikasyonu, biyolojik savaş algılayıcılarının gelişmesinde dizi analizi
- Epigenetik yapıların açıklanmasında (kromatin modifikasyonları ve metilasyon paternleri gibi) dizi analizi
- Hücre soy paternlerinin *in vivo* ve *in vitro* ortaya konmasında dizi analizi
- Mikrobiyal suşların karakterizasyonu veya sınıflamadaki yerlerinin belirlenmesinde dizi analizi

- Tarım, çevre ve terapötik amaçlarla ilgili olarak mikrobiyal farklılığın ortaya konmasında dizi analizi
- DNA computing: DNA kütüphanelerinin oluşturulmasında dizi analizi
- Mikroorganizmaların ilaç direncinin belirlenmesinde dizi analizi
- Mikroorganizmalardaki virülans, metabolik enzimler ve düzenleyici genlerin moleküler seviyede incelenmesinde dizi analizi (70).

### 2.9.2. DNA Dizi Analizi Yöntemleri

DNA dizi analizi için çeşitli metodlar bulunmasına karşın, günümüzde en popüler ve yaygınlıkla kullanılan DNA dizim analizi metodu, 1977 yılında Frederick Sanger tarafından geliştirilen metoda dayanmaktadır. Araştırmacı bu buluşundan sonra Nobel ödülü kazanmıştır (68).

#### 1. Geleneksel yöntemler (69)

- a. Maxam-Gilbert dizileme tekniği (kimyasal degradasyon yöntemi): Farklı uzunlukta fragment oluşumu ile sonlanan ve DNA'yı kesmek için kimyasalların kullanıldığı yöntemdir. DNA molekülü radyoaktif madde ile ( $P^{32}$ ) işaretlenmiştir. İki DNA zinciri birbirinden ayrılır ve bu ipliklerden birinin dizi analizi yapılır. Elde edilen bu tek iplik 4 tüpe bölünür. Her örneğe DNA'ları fosfodiester bağlarından kırarak etki eden kimyasal maddeler ilave edilerek diğer bazların tahribatı sağlanır.
- b. Sanger yöntemi (dideoksi zincir sonlanması yöntemi): Dört farklı reaksiyon içinde farklı uzunluklarda DNA zincirlerinin sentezi için enzimatik prosedürün kullanımı, DNA replikasyonunun durdurulmasının dört bazdan biri tarafından gerçekleştirilmesi ve daha sonra oluşan fragmentlerin uzunluklarının belirlenmesi esasına dayanır.

#### 2. Shotgun yöntemi (son yıllarda gündeme gelen): Çok büyük klonlanmış DNA parçalarını birçok parçaya bölerek alt klonlar halinde dizileme yapar (69).

- **Sanger Yöntemi (Dideoksi Zincir Sonlanması Yöntemi)**

Teknik olarak dizi analizinde en fazla kullanılan en popüler yöntemdir. Elektroforeze dayanan bir metod olup DNA zincirindeki her bir bazın pozisyonu tek tek belirlenmektedir. Bu yöntemde dört sıra halinde, işaretlenen DNA fragmentleri yüksek çözünürlükteki poliakrilamid jelde ayrılarak DNA zincirindeki baz dizilerinin okunması sağlanmaktadır

Teknik olarak dizi analizi 3 ana basamaktan oluşur.

1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)
2. Dizileme (sekans) reaksiyonu
3. Jel elektroforezi ve bilgisayarda değerlendirme

## **1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction/ PCR)**

Öncelikle hedef dizi, spesifik primer dizileri PCR ile amplifiye edilir.

## **2. Sekans Reaksiyonu**

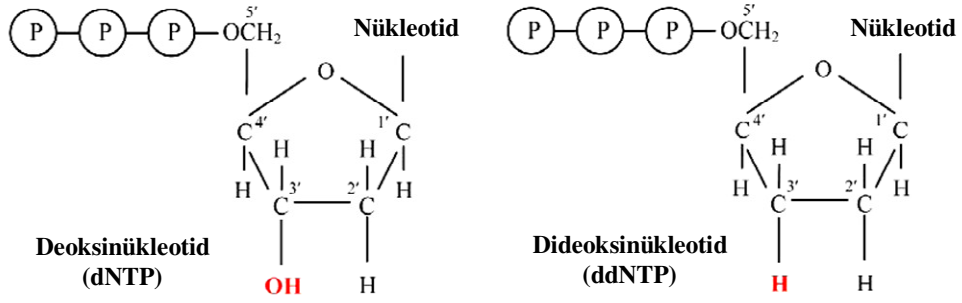
Reaksiyon bileşenleri (69):

- Bir DNA kalıbı (pürifiye edilmiş olması tercih edilir.)
- *Taq* DNA polimeraz
- Primer
- Deoksiniükleotid (dNTP)
- Dideoksiniükleotid (ddNTP)

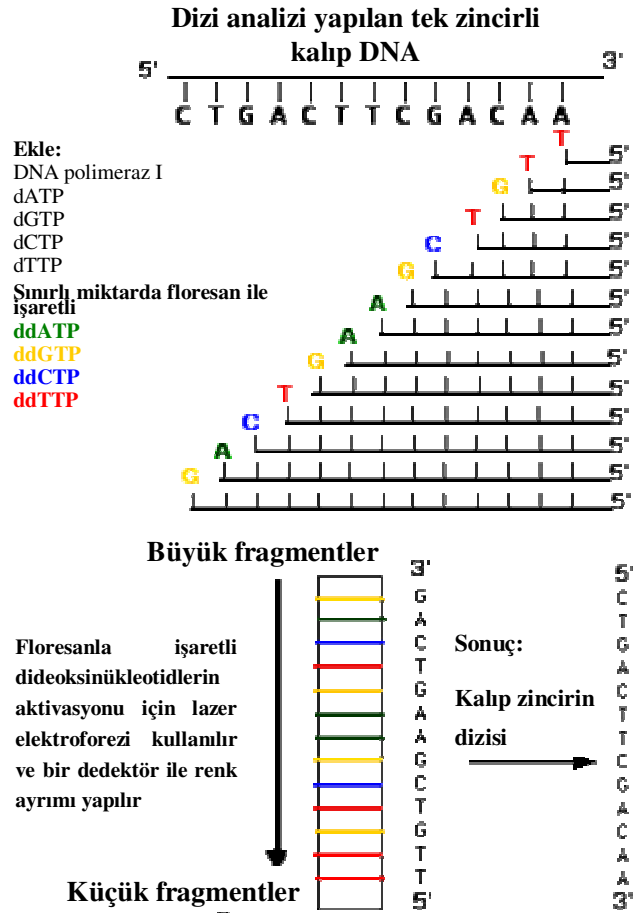
PCR gibi 3 ana basamakta ve ortalama 30–40 döngüde gerçekleşir (68, 69).

1. Basamak: denatürasyon; 94°C’de DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması sağlanır.
2. Basamak: annealing (bağlanma); 50°C’de gerçekleşir. Sekans reaksiyonunda sadece bir primer kullanılır.
3. Basamak: extension (uzama); 60°C’de uygulanır. Polimeraz enzimi normal şartlarda 72°C’de çalışır ancak ortama katılan kimyasal olarak modifiye edilmiş (floresan işaretli) ddNTP’ler bu sıcaklıkla uyum sağlamadıkları için daha düşük ısılar tercih nedenidir.

Reaksiyon sırasında lineer bir artış elde edilir. Bu reaksiyon klasik ısı döngü cihazlarında gerçekleştirilir. Bu yöntemde PCR’ın ana prensibi ile DNA polimeraz ile primerin 3’ ucundan DNA sentezi başlatılmakta ve her bir yeni nükleotid son eklenen nükleotidin 3’-OH grubuna eklenir. Dideoksi metodu ismini reaksiyonda kritik bir rol oynayan 3’ karbon atomunda –OH’in eksik olduğu sentetik nükleotidden alır (Şekil 2.14). Dideoksinükleotidlerin reaksiyona uygun konsantrasyonlarda eklenmesiyle de oluşan DNA oligonükleotid zincirlerinin uzaması, diğer nükleotidin bağlanması için gerekli olan 3’ -OH eksik olduğu için rastgele bir biçimde sonlanmaktadır. Bu sebeple dideoksi metodu zincir sonlanma metodu olarak da adlandırılmaktadır. Sonlandırıcı özellikteki bu bazlar 4 farklı floresan boya (veya radyoaktif madde, kemilüminesans maddeler) ile işaretlenir ve reaksiyon 4 farklı tüpte, 4 ayrı reaksiyon karışımı halinde gerçekleştirilir. Reaksiyonun sonucunda, elimizde deoksinükleotidlerle uzamış ve dideoksi nükleotidlerle sonlanmış çeşitli uzunlukta diziler üretilmiş olur (Şekil 2.15). Tüm dizilerin 5’ uçları aynıdır ancak 3’ uca özgün baza göre uzunlukları değişecektir. Bu dizilerin son bazları otomatik dizi analizi cihazlarında okunabilmektedir. Karakteristik floresan renkleri ise poliakrilamid jelde de belirlenebilmektedir (68, 69).



Şekil 2.14. Deoksi ve dideoksinükleotid (68).



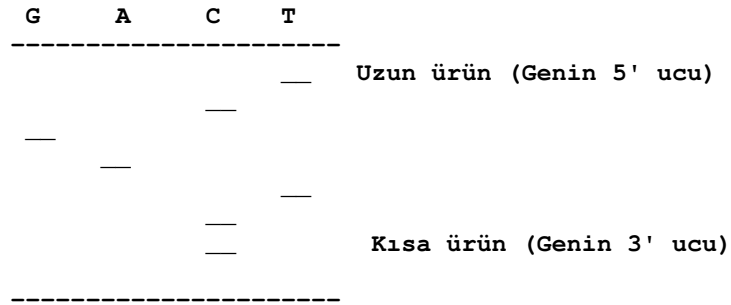
Şekil 2.15. Deoksinükleotidlerle uzamış ve dideoksi nükleotidler ile sonlanmış çeşitli uzunlukta diziler (71).



### 3. Elektroforez Aşaması

Sanger tarafından geliştirilen orjinal metotta, radyoaktif madde ile işaretli DNA primerleri kullanılmaktadır ve dört nükleotidin her biri için ayrı dizi analizi reaksiyonu gerçekleştirilmektedir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra da, her bir nükleotid reaksiyonu için ayrı çizgide elektroforezleri gerçekleştirilir (68).

Jel dökmek için özel olarak hazırlanmış kaset camları arasına akrilamid jel dökerek polimerizasyonun sağlanması beklenir. Ardından jel kaseti dizileme cihazına yerleştirilerek jel kuyucuklarına sonlandırıcıları farklı boya ile işaretli, dizi reaksiyonuna tutulan örnekler yüklenir ve elektroforez başlatılır. DNA'lar negatiften pozitif kutba doğru göç ederler ve molekül ağırlıklarına göre jelde sıralanırlar (Şekil 2.16) (69).

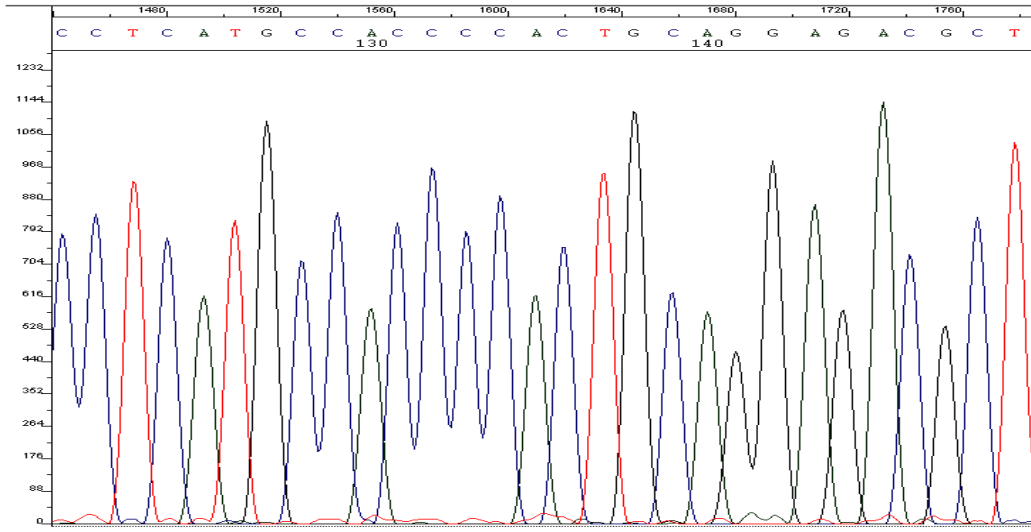


Şekil 2.16. Nükleotidin poliakrilamid jel elektroforezi

Teknolojinin ilerlemesi ve 4 farklı floresan ile işaretli her bir nükleotidin tek bir reaksiyon tüpünde karıştırılabilmesi ile birlikte, dizilerin belirlenmesi ve okunması otomatik kapillar dizi analizi cihazlarında gerçekleştirilmektedir (68). Otomatize sistemlerde, her bir örnek kapillarların içine yüklenir. Elektroforez ile birlikte fragmentler büyüklüklerine göre ayrılırlar. Kapilların alt kısımlarına doğru DNA göç eder ve her bir nükleotid için spesifik floresanı tespit eden lazer tarayıcıdan geçerler. Dört boyanın her biri için renk piki oluşur. Bu bulgular spektrofotometrede yansıttıkları ışığın dalga boyutuna göre okunurlar. Sonlanmış olan her nükleotid bilgisayarda

kaydedilir. Renk pikleri bazlara çevrilir (A, C, G, T) ve lineer bir dizi oluşturulur. Yalnızca bir baz farklılığı bile ayırt edilebilmektedir (68, 69).

Bilgisayar ortamında oluşan pikler ile elektroferogramlar elde edilir (Şekil 2.17). Otomatik dizileme cihazları arasında uygulamada küçük farklılıklar olsa da dizilemenin prensibi aynıdır. Diziler elde edildikten sonra, bilgisayar ortamında bazı kolaylaştırıcı programlar kullanarak diziler değerlendirilir ve yorumlanır (69).



Şekil 2.17: Otomatize sistemlerde oluşan nükleotid renk pikleri (68).

### 2.9.3. Dizi Verilerinin Değerlendirilmesi

Elektroforetik görüntünün anlamlı DNA dizi verilerine dönüştürülmesi için, dizilerin manuel olarak kontrol edilmesi ve bilgisayar destekli algoritmalar gerekmektedir. Elde edilen dizi verisinin kalitesinin değerlendirilmesi için, dizinin öncelikle manuel olarak incelenmesi, kontrol edilmesi gerekmektedir. Dizilerin manuel olarak kontrol edilmesinde, belirli pozisyonlarda karışık nükleotidlerin belirlenmesi oldukça önemlidir. Ayrıca, elektroforezin başlangıcında bağlanmamış floresan işaretlere bağlı olarak ve elektroforezin sonuna doğru floresan sinyal yoğunluğunun azalmasına bağlı olarak pikler genişler ve baz yakalama olasılığı azalır. Bu nedenle dizinin başlangıç ve son kısımlarının dikkatli bir şekilde incelenmesi, komplementer zinciri ile beraber değerlendirilmesi gerekmektedir (66).

Heterojen bazlar elektroforez verisinde üst üste binen pikler şeklinde görülmektedir. Bu heterojen bazlar dizi analizi reaksiyonu sırasındaki artefaktan veya dizide varyasyondan kaynaklanabilir. İncelenen dizi komplementeri birlikte değerlendirilip, pik yoğunluğu da göz önünde bulundurularak manüel olarak doğrulanması gerekmektedir (66).

DNA dizisi daima 5'-3' yönünde ve aminoasit dizisi de N-ucundan C-ucuna doğru okunmalıdır. Veri bankasından ulaşılan dizilerin okuma yönü de her zaman bunlarla uyumlu olacaktır (69).

DNA dizisinin değerlendirilmesi, raporlanması ve derlenmesi için çok sayıda program ve veritabanı kullanılmaktadır (66).

İki nükleotid veya aminoasit dizisinin kıyaslanabilmesi için dizilerin hizalanması gerekmektedir. Bu işlem sayesinde karşılaştırılan iki dizi elemanlarının ne kadarının eşleştiğini (match), insersiyon ve delesyonları görülebilmektedir. Bu konu ile ilgili programların çoğu, aynı uzunluktaki dizilerin kullanılmasını tercih etmektedir. Kural olarak 100 bp'in üzerindeki dizilerde; bir proteinde bulunan aminoasitlerin %25'inden fazlası ve DNA'da bulunan nükleotidlerin %70'inden fazlası arasında bir benzerlik tespit edilirse, bu iki dizinin tamamına yakın bir şekilde birbirine benzediği söylenebilmektedir (69).

Bir çok dizi hizalama programı bulunmaktadır. CLUSTAL X ilk çoklu dizi hizalama (multiple alignment) programıdır ve biyoinformatik için ana yazılımlardan biri olarak kabul edilmektedir (69).

## **2.10. Moleküler Filogenetik Analizi**

Filogenetik analizi, yaygın bir ata soyundan gelen türlerin soyları hakkındaki hipotezlerin test edilmesi süreci anlamındadır. Başka bir deyişle, bu analiz mevcut organizmaların yakın ilişkilerini belirlemek ve organizmaları evrimsel soylar kapsamında bir yere koymak için kullanılmaktadır (66).

Homolog diziler hizalandıktan sonra, genetik uzaklıklarının belirlenmesinde seçilebilecek birçok yöntem vardır. P-distance, nükleotid farklılıklarının sayıları, Jukes-

Cantor, Tajima-Nei, Kimura 2-parametre yöntemi, sinonim-nonsinonim değişim oranlarının belirlenmesi gibi yöntemler en çok kullanılanlarıdır (69).

Hizalama işlemleri bittikten sonra, filogenetik ağaç oluşturmanın ilk basamağı olarak kabul edilmektedir. Filogenetik dendogramın oluşturulması için direkt genetik uzaklık değerleri kullanılabilir gibi, Parsimony, maximum likelihood ve sık olarak tercih edilen neighbor joining gibi yöntemler de kullanılabilir (69).

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

#### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- PCR cihazı (Thermal Cyclers, Eppendorf Mastercycler)
- Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, CN-3000, France)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich- Universal 32 R)
- Mikrodalga Fırın (Beko- MD 1500)
- Derin Dondurucu (Uğur)
- Etüv (Memmert)
- Otoklav (Hirayama HV-L Series 50L)
- Hassas Terazî (Scaltec)
- Buzdolabı (İndesit)
- Vortex (NM- 110)
- Su Banyosu (Memmert)
- Distile su cihazı (GFL-2104, Germany)
- Mikropipet Seti (Gilson-PIPETMAN-P 10-P100-F1000)

### 3.1.2. Kullanılan Bilgisayar Yazılım Programları

- CLUSTAL X versiyon 1.83
- GENDOC versiyon 2.6.002 (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility)
- MEGA versiyon 3.1 (<http://www.megasoftware.net/>)
- Vector NTI versiyon 9.0.0

### 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tris-Hidroklorid (Sigma T-5941, Lot 31 K5466)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Lachema-302430300, cat nr 30354)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck-L51736210)
- Tris-baz (Sigma-Aldrich-T8937)
- Borik asit (Merck- K29935665 204)
- Brom fenol mavisi (SCP Science-B7722)
- Sükroz (Merck-1.07651)
- Etanol absolut (Riedel- deHaän/32221)
- Fenol (Merck- S3971900 349)
- Kloroform (Merck- K28735331 107)
- Agaroz (Sigma- A-9539 lot 013K0008)
- Taq DNA Polimeraz (Fermentas-#EP0402)
- 10X *Taq* Buffer (with KCl) (Fermentas-#EP0402)
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas-#EP0402)
- 100 mM dNTP (Fermentas, Deoxynucleotide set-dNTP set, 4x25 µmol, #R0181)
- Proteinaz K (Sigma, P 2308)
- 100 bp Moleküler Ağırlık Standardı (Fermentas, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, #SM0241)

- Distile Su
- Nuclease Free Su (Fermentas, #R0582)
- Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Primerler

#### **Bazal kor promoter/prekor gen bölgesi için:**

*External Sense* (TIB MOLBIOL, 1049073): PC/CP-ES (5'-CATAAGAGGACTCTTGGACT-3')

*External Antisense* (TIB MOLBIOL, 1049074): PC/CP-EAS (5'-GGCGAGGGAGTTCCTTCTTAGGG-3')

*Internal Sense* (TIB MOLBIOL, 1049075): PC/CP-IS (5'-AATGTCAACGACCGACCTTG-3')

*Internal Antisense* (TIB MOLBIOL, 1049076): PC/CP-IAS (5'-AGCTGAGGCGGTGTCGAGGAGATC-3')

#### **Pre-S gen bölgesi için:**

*Sense* (TIB MOLBIOL, 1049071): PRES-S (5'-TCACCATATTCTTGGGAACAAGA-3')

*Antisense* (TIB MOLBIOL, 1049072): PRES-AS (5'-TTCCTGAACTGGAGCCACCA-3')

### **3.1.4. Kullanılan Tampon Çözeltiler**

#### **3.1.4.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar**

##### **Parçalayıcı Tampon (Lysis Buffer), 100 mL için**

(10mM Tris/HCl pH 8; 5mM EDTA, % 0.5 SDS)

- Tris-HCl..... 0.209 gr.
- EDTA..... 0.249 gr.
- SDS..... 0.67 gr.
- Tartılan kimyasal maddeler 50 mL distile su ile eritildi.
- pH'sı 8.0'a ayarlandı.
- 100 mL'ye distile su ile tamamlandı.
- Oda ısısında muhafaza edildi.

### **1:1 Fenol-Kloroform**

- Kristalize fenol su banyosunda eritildi.
- Bir kısım kloroform, bir kısım sıvı hale getirilmiş fenol ile karıştırıldı.
- + 4°C’de koyu renkli şişelerde muhafaza edildi.

### **Proteinaz-K (100mg/mL)**

- Hazır olarak alınan liyofilize 100 mg Proteinaz-K (Sigma) 1 mL steril distile su ile çözülerek 100 mg/mL’lik konsantrasyona getirildi.
- 50 µL’lik porsiyonlara ayrıldı.
- -20°C’de saklandı.

### **3.1.4.2. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar**

#### **10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Tampon Stok Solüsyonu, pH 8.8**

- Tris Base.....108 g
- Borik Asit.....55 g
- EDTA.....8.3 g
- Distile su ile eritildi ve pH’sı 8.8’e ayarlandı.
- Distile su ile 1 litre’ye tamamlanarak çözüldü.
- Oda ısısında muhafaza edildi.

#### **Elektroforez Yürütme Tamponu (1XTBE)**

- 10X TBE tamponu stok solüsyonundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE tamponu, elektroforez yürütme tamponu olarak elektroforez tankında kullanıldı.



### **Yükleme Tamponu (Loading Buffer), 20 mL için**

- Sükroz.....4 g
- Brom fenol mavisi.....0.05 g
- Tartılan kimyasallar 20 ml 1XTBE tamponunda eritildi.
- Oda ısısında saklandı.

### **% 1 AgaroZ Jel Solüsyonu**

- 50 ml 1X TBE tamponu içerisinde 0.5 g agaroz mikrodalga fırında eritildikten sonra 10 mg/ml'lik stok Et-Br solüsyonundan 3 µL katıldı.

### **3.2. Serum Örneklerinin Toplanması**

Çalışmanın serum örnekleri, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı Polikliniği'ne başvuran hepatit B'li hastalardan elde edildi. 33'ü erkek ve 21'i kadın olmak üzere toplam 54 hastadan oluşan çalışma grubunun yaş ortalaması 40.05 olarak belirlenmiştir.

Çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'nın 21.11.2008 tarihli ve 9/13 sayılı kararı ile "Etik Kurul Onayı"ını almıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların hepsi, yapılacak çalışma ile ilgili olarak bilgilendirilmiştir.

Hastalardan yaklaşık 10 mL kadar kan örneği alındı. Serum kısmının ayrılması için kan örnekleri 5.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmından toplanan serumlar çalışılincaya kadar -80°C'de saklandı.

### **3.3. Yöntemler**

#### **3.3.1. Biyokimyasal Analiz**

Hastalarının hepsinin karaciğer profilleri, alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) enzim seviyelerinin ölçülmesi ile belirlendi.

#### **3.3.2. Serolojik Analiz**

##### **3.3.2.1. HBV Serolojik Belirteçlerinin Tespiti**

Hasta serumlarında HBV serolojik belirteçleri; HBsAg, anti-HBs, anti-HBc (IgM ve IgG), HBeAg ve anti-HBe varlığı ticari olarak temin edilen ELISA kitleri kullanılarak belirlendi. Yöntem mikropartikül ELISA prensibine dayanmakta olup, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda Architect *i* 2000 SR (ABBOTT, Diagnostics Division) sisteminde gerçekleştirilmiştir.

#### **3.3.3. Moleküler Analiz**

##### **3.3.3.1. Serum HBV DNA Seviyelerinin Kantitatif Olarak Tespit Edilmesi**

HBV DNA'nın eldesi için otomatize Manga Pure LC (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında serum örneklerinden DNA izolasyonu COBAS Ampliprep kiti kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası, viral yük tayini, Cobas Taq Man 48 (Roche) prosedürüne göre “real time” PCR tekniği uygulanarak araştırıldı.

### 3.3.3.2. Bazal Kor/Prekor Mutasyonlarının Tespit Edilmesi

#### 3.3.3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Serum örneklerinden DNA saflaştırılması; modifiye klasik fenol-kloroform ve kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (72).

Bu yöntemin anahtar basamağı, fenol-kloroform ve kloroform ile nükleik asitin sıvı fazda proteinlerden ayrılmasıdır. Proteinlerin parçalanarak ayrılmasında organik solventler ile ekstraksiyondan önce, genellikle pronaz veya proteinaz K gibi proteolitik enzimler kullanılmaktadır. Yaptığımız bu çalışmada; Proteinaz K'nın varlığında hücreler parçalandı. Organik ekstraksiyonla (fenol-kloroform), DNA biyolojik materyallerden uzaklaştırıldı. Daha sonra da DNA etanol ile çöktürüldü.

#### **DNA ekstraksiyonunun yapılışı:**

- 1.5 mL'lik steril eppendorf tüpüne, 100 µL serum örneği kondu.
- Serum örneği üzerine 300 µL lizis tamponu (10mM Tris/HCl pH 8; 5mM EDTA, % 0.5 SDS) + 1 µL Proteinaz-K (100mg/mL) ilave edip vortekslendi.
- Bu karışım, 56°C'lik su banyosunda bir gece boyunca inkübe edildi.
- Bu karışım üzerine 800 µL fenol-kloroform ilave edildi. İyice alt üst edilip +4°C'de 30 dakika bekletildi.
- Bu süre içinde tüpler zaman zaman alt üst edilerek karıştırıldı.
- Tüpler 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı (üstteki berrak kısım) alınarak yeni steril bir tüpe aktarıldı.
- Yeni tüpe alınan süpernatant üzerine, süpernatantın 2 katı hacimde olacak şekilde kloroform ilave edildi. Alt üst edilerek +4°C'de 30 dakika bekletildi.
- Bu süre içinde tüpler zaman zaman alt üst edilerek karıştırıldı.
- Tüpler 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı alınıp yeni steril bir tüpe aktarıldı.
- Süpernatant üzerine 1 ml soğuk absolüt etanol ilave edildi.
- Yavaşça alt üst edip -20°C'de gece boyunca bekletildi.
- Ertesi gün tüpler 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

- Tüpün dibindeki nükleik asit pellet kısmına zarar vermeden üst kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Tüpler temiz kağıt havlular üzerine ters olarak koyarak 10 dakika bekletilerek kurutuldu.
- Pellet 20 µL steril distile su ile yavaş hareketlerle pipetaj yaparak çözdürüldü.

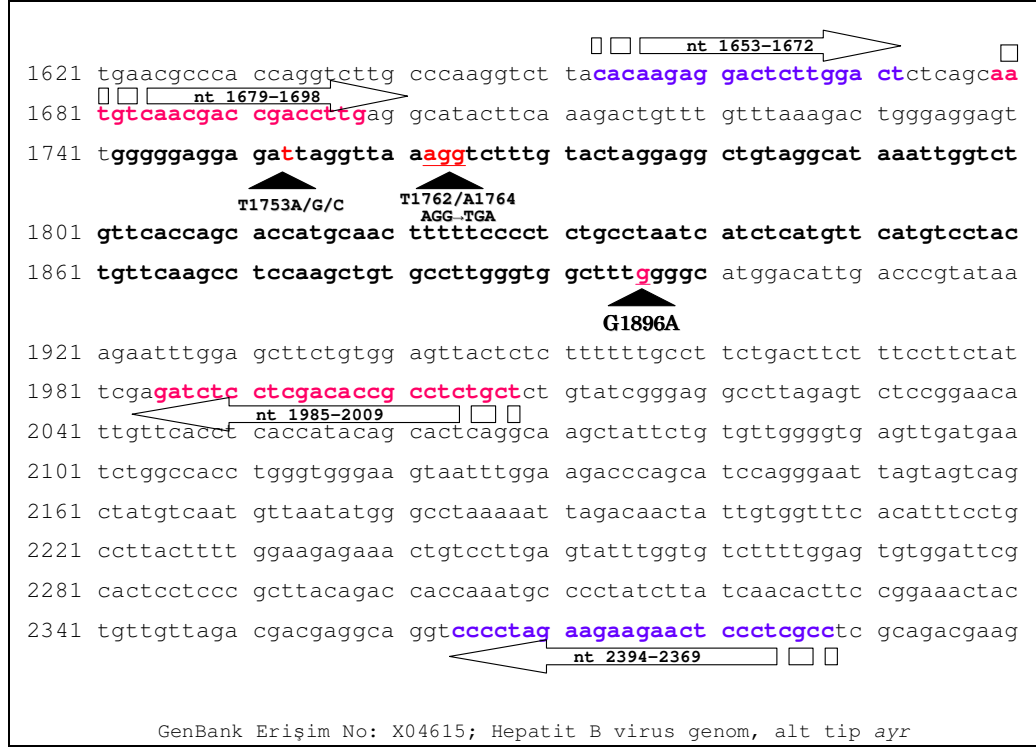
Hazırlanan DNA ekstraktları çalışılncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### **3.3.3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulaması**

PCR, tek bir molekül DNA'yı bile çoğaltabileceği için, reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olmasının engellenmesi gerekmektedir. Bu kontaminasyon, daha önceki PCR reaksiyonu, eksojen DNA veya diğer hücrel materyallerden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle kullanılan sarf malzemeleri ve solüsyonların steril olmasına dikkat edildi ve reaksiyon bileşenleri ekstraksiyon işleminin yapıldığı kabinden ayrı temiz bir kabinde hazırlandı. PCR reaksiyonunda ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNase ve RNase enzimlerinden arındırılmış steril 0.2 µL'lik PCR tüpleri (Axygen Thin-Walled PCR Tubes) kullanıldı. Reaksiyonun gerçekleştirilmesi için de ısı döngü cihazı ile 0.5-10 µL, 10-100 µL ve 50-200 µL'lik otomatik pipetler kullanıldı.

Mutasyonların tespiti için, bazal kor promoter ve prekor gen bölgeleri, Cho ve arkadaşlarının (73) araştırma makalelerinden seçilen spesifik primer dizileri kullanılarak amplifiye edilmiştir.

HBV genomunda C ORF'sinde, prekor gen bölgesi nt 1814-1900, bazal kor promoter bölgesi ise nt 1742-1849 arasında kalmaktadır. Çalışmada kullandığımız primerlerin amplifiye ettiği aralık ise bu bölgeyi içine alacak şekilde nt 1679 ile nt 2009 arasındadır. Kullanılan primer dizaynına göre nested PCR yöntemi ile bazal kor promoter ve prekor gen bölgelerini içine alan 330 bp'lık bu gen bölgesi amplifiye edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. HBV bazal kor promoter ve prekor gen bölgeleri.

HBV prekor/kor promoter gen bölgelerindeki mutasyonların belirlenmesinde kullanılan, birinci tur PC/CP-ES (nt. 1653-1672) ve PC/CP-EAS (nt. 2394-2369) ile ikinci tur PC/CP-IS (nt. 1679-1698) ve PC/CP-IAS (nt. 1985-2009) primer dizileri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Bazal kor/prekor gen bölgelerini hedefleyen spesifik primer dizileri.

Primerler	Prekor/ Kor Promoter bölgesi	nt. yerleşimi	PCR ürünü
<b>Birinci Tur</b>			
<b>External Sense Primer Dizisi</b>	PC/CP-ES (5'-CATAAGAGGACTCTGGACT-3')	nt. 1653-1672	716 bp
<b>External Antisense Primer Dizisi</b>	PC/CP-EAS (5'-GGCGAGGGAGTTCTTCTCTAGGGG-3')	nt. 2394-2369	
<b>İkinci Tur</b>			
<b>İnternal Sense Primer Dizisi</b>	PC/CP-IS (5'-AATGTCAACGACCGACCTTG-3')	nt. 1679-1698	330 bp
<b>İnternal Antisense Primer Dizisi</b>	PC/CP-IAS (5'-AGCTGAGGCGGTGTCGAGGAGATC-3')	nt. 1985-2009	

Nested PCR tekniği ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. İki tur halinde gerçekleştirilen bu teknikte, ikinci turda birinci turda hedeflenen gen b3lgesi içinde daha korunmuş b3lge spesifik primer dizileri ile amplifiye edilmektedir. Her bir 3rnek için PCR karışımları izelge 3.2'deki gibidir.

**Çizelge 3.2.** Bazal kor/prekor gen b3lgesinin amplifikasyonunda her bir 3rnek için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Birinci Tur		İkinci Tur	
Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılacak Miktar (µL)	Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılacak Miktar (µL)
Distile Su	36.75	Distile Su	41.5
10X <i>Taq</i> Tampon	5	10X <i>Taq</i> Tampon	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5
dNTP Mix (10 mM)	1	dNTP Mix (10 mM)	1
Primer 1 (PC/CP-ES) (Forward) (100pmol/µL)	0.5	Primer 3 (PC/CP-IS) (Forward) (100pmol/µL)	0.125
Primer 2 (PC/CP-EAS) (Reverse) (100pmol/µL)	0.5	Primer 4 (PC/CP-IAS) (Reverse) (100pmol/µL)	0.125
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0.25	<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0.25
DNA 3rneği	2	1/100 oranında dilüe edilmiş 1. tur PCR 3rünü	0.5
Primer 1: PC/CP-ES: (5'-CATAAGAGGACTCTTGGACT-3')		Primer 3: PC/CP-IS (5'-AATGTCAACGACCGACCTTG-3')	
Primer 2: PC/CP-EAS (5'-GGCGAGGGAGTTCTTCTTAGGGG-3')		Primer 4: PC/CP-IAS (5'-AGCTGAGGCGGTGTCGAGGAGATC-3')	

Oluşturulan bu PCR karışımı vortekste karıştırdıktan sonra, her bir 3rneğe ait ve 3zerlerinde numaraları yazılı steril 0.2 µL'lik PCR t3plerine paylaştırılıp, 3zerlerine DNA 3rneği konulup cihaza yerleştirildi.

Bazal kor/prekor gen b3lgesinin amplifikasyonunda ısı d3ng3 cihazında PCR koşulları izelge 3.3'deki gibi uygulanmıştır. Çapraz kontaminasyonu 3nlemek için gerekli b3t3n 3nlemler alınmıştır ve negatif kontroller her bir reaksiyona eklenmiştir.

**Çizelge 3.3.** Birinci ve ikinci tur bazal kor/prekor PCR koşulları.

<b>Birinci Tur</b>			
<b>Reaksiyon Aşaması</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	10 dk	1
Denatürasyon	95	45 sn	25
Primer bağlanması (Annealing)	55	45 sn	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	1 dk	
Son uzama (Post elongasyon)	72	5 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞
<b>İkinci Tur</b>			
<b>Reaksiyon Aşaması</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	10 dk	1
Denatürasyon	95	45 sn	30
Primer bağlanması (Annealing)	60	45 sn	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	1 dk	
Son uzama (Post elongasyon)	72	5 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

### 3.3.3.2.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

PCR’da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak için agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA’ların uzunlukları, büyüklükleri belli DNA fragmentleri ihtiva eden belirteç ile kıyaslanarak saptandı.

Tank tamponu olarak TBE (Tris-Borik asit-EDTA), 10X konsantre stok solüsyonu şeklinde hazırlandı. Daha sonra 1X olacak şekilde sulandırıldı ve hem tankta hem de agaroz jelin hazırlanması sırasında kullanıldı.

#### *Agaroz jelin hazırlanması:*

%1’lik agaroz jelin hazırlanmasında, bir balon jodede 0,5 gr agaroz 50 mL 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Buhar çıkması durduktan sonra Ethidium Bromide (Et-Br)’den 3 µL eklendi. Et-Br son derece kanserojen/mutajen özelliğe sahip olduğu için buharlaşma ile Et-Br’in solunmasının engellenmesi için ısıtma işleminden sonra soğuması için beklendi. Erimiş haldeki Et-Br ile karıştırılmış jel tarakların yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Dökme işlemi esnasında jel içinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 30 dakika boyunca soğumaya bırakıldı. Katılaşıma kadar (25-30 dk) oda

sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PCR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi.

Daha önceden PCR işlemi yapılmış olan buzdolabındaki örneklerden 5'er µL alınarak parafilm üzerinde 2 µL 1XTBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 sükröz veya gliserol, % 0.25 brom fenol mavisini) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30mA akım verilerek elektrik akımı geçmesi sağlanarak örnekler 30-40 dakika boyunca yürütüldü. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu. Jeli tanktan çıkararak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-transilüminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde (Wilber Lourmat Marne La Vallée, France) kayıtları yapıldı.

### 3.3.3.3. DNA Dizi Analizi

Bazal kor/prekor gen bölgesi "nested PCR" tekniği ile çoğaltıldıktan sonra, elde edilen spesifik diziler, işaretli dideksinükleotidleri içeren "Bigdye Terminator v3.1Cycle Sequencing kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanarak, sense ve antisense zinciri PCCP primerleri ile, "Cycle Sequence" PCR'ı yapılmıştır. Çizelge 3.4'de reaksiyon bileşenleri gösterilmiştir.

**Çizelge 3.4.** "Bigdye Terminator v3.1Cycle Sequencing kit" bileşenleri

<b>Reaktifler</b>	<b>Konsantrasyon</b>	<b>Hacim</b>
"Ready Reaction Premix"	2.5X	4 µL
"BigDye Sequencing Buffer"	5X	2 µL
Primer	-	3.2 pmol
Kalıp PCR ürünü	-	10 µL
Su	-	4 µL
Son hacim	1X	20 µL



“Cycle Sequencing” reaksiyon koşulları aşağıdaki Çizelge 3.5’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.5.** “Cycle Sequencing” reaksiyonunda uygulanan sıcaklık ve süreleri.

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	96	1 dk	1
Denatürasyon	96	10 sn	25
Primer bağlanması (Annealing)	50	5 sn	
Zincir uzaması (Elongasyon)	60	4 dk	
Muhafaza	4	∞	∞

“Cycle Sequencing” sonrası reaksiyon ürünlerine Etanol/EDTA/Sodyum Asetat (NaOAc-EtOH) presipitasyon yöntemi ile saflaştırma uygulanmıştır.

*Etanol/EDTA/Sodyum Asetat (NaOAc-EtOH) presipitasyon yöntemi:*

- 20 µL’lik reaksiyon ürünlerinin üzerine 2 µL 125 mM EDTA eklendi.
- Daha sonra üstüne 2 µL 3 M sodyum asetat eklendi.
- Bunun üzerine 50 µL %100’lik etanol eklendi.
- Ters-düz ederek karıştırıldı.
- Oda ısısında 15 dk inkube edildi.
- +4 °C’de 13.000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi.
- Pelletlerin üstündeki süpernatant ters çevrilerek döküldü.
- Üzerine %70’lik etanol eklendi.
- +4 °C’de 13.000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi.
- Pellet kurutuldu.

Saflaştırma işlemi sonrasında, “ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında, reaksiyon ürünlerinin elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.3.3.1. Dizi Analizi Verilerinin Analizi

Dizi analizi verileri, kromatografi şeklinde elde edilmiştir. Kromatografi, herbir reaksiyon için renk/baz ilişkisinin dalgalı analizini sağlayan bir düzendir. Dizi verileri bu şekilde kayıt edilebilmekte ve güvenli ortamlarda saklanabilmektedir.

Doğrulanması açısından, herbir PCR ürününün reverse ve forward primer dizileri kullanılarak her iki zincirine DNA dizi analizi uygulanmıştır. Dizi analizi sonrası her zincir komplementeri ile birlikte kromatogram dalgalarının pik uzunluklarının karşılaştırılması ile kontrol edilmiş ve gerekli düzeltmeler yapılmıştır.

Antiviral tedavi alan hasta örneklerinin analizinde, genelde önemli kodonlarda karışık viral popülasyonlar tespit edilmektedir. Her iki zincirde, aynı pozisyonda belirsiz (üst üste binen) nükleotidler karışık viral popülasyonun varlığını göstermektedir. Bu nükleotidlere daha sonra “International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)” sistemine göre bir kod verilmiştir (Çizelge 3.6). IUPAC nomenklatürü kimyasal bileşikler isimlendiren bir sistemdir. Örneğin A ve T’in karışık olarak tespit edildiği yerlerde IUPAC kodu W olarak belirlenmektedir.

**Çizelge 3.6.** IUPAC tek harf kodları. Nükleotid veya aminoasit dizileri IUPAC tek harf kodları ile yazılmalıdırlar (74).

Semboller	İsim	Açıklama
<b>DNA/RNA</b>		
A	Adenin	Pürin
G	Guanin	Pürin
T	Timin	Pirimidin
U	Urasil	Pirimidin
R	Pürin	A veya G
Y	Pirimidin	C veya T/U
M		C veya G
K		G veya T
S	Güçlü	C veya G
W	Zayıf	A veya T
H		A veya C veya T
B		C veya G veya T
V		A veya C veya G
D		A veya G veya T
N	Belirsiz (Ambiguous)	A veya C veya G veya T

CLUSTAL X (versiyon 1.83) programında her iki zincir karşı karşıya getirilerek hizalanmıştır (aligning). Daha sonra GENDOC (versiyon 2.6.002) gibi bir DNA dizi analizi programında, uç kısımlardaki fazla hizalanmamış diziler kırıldıktan sonra, son konsensus dizi şeklinde kayıt edilmiştir.

Her bir hastaya ait dizisi çıkarılmış olan bu gen bölgeleri, PubMed Gen-Bankası veri tabanında yayınlanmış referans dizi verileri ile karşılaştırılarak bazal kor promoter ve prekor gen bölgesindeki spesifik nükleotid değişiklikleri ve olası diğer polimorfik bölgeler belirlenmiştir.

### **3.3.3.4. HBV Genotiplerinin Belirlenmesi**

HBV genotiplerinin belirlenmesinde, pre-S gen bölgesi hedeflenmiştir. PCR ve daha sonrasında gerçekleştirilen RFLP analizine dayanan yöntem kullanılmıştır.

#### **3.3.3.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulaması**

Çalışmada kullanılan primerler, Lindh ve arkadaşlarının yaptığı araştırma makalelerinden seçilmiştir. Primerlerin, bütün genotiplerin yüksek sensitivite amplifikasyonunu sağlayacak şekilde korunmuş genomik segmentte lokalize olduğu belirtilmektedir (42). Bu metod pre-S gen bölgesinin 2823. nt ve 80. nt arasında kalan 479 bp'lik segmentinin spesifik primerlerin kullanıldığı PCR ile çoğaltılmasından sonra, *AvaII* ve *MboI* restriksiyon enzimleri ile inkübe edilerek RFLP analizine dayanmaktadır.

HBV genotiplemesinde kullanılan pre-S gen bölgesini hedefleyen PRES-S ve PRES-AS primer dizileri Çizelge 3.7'de gösterilmiştir. PRES-S; pre-S1 start kodununun üst kısmının (upstream) birkaç baz üstünde sonlanmaktadır, PRES-AS ise; Pre-S2 bölgesinin ortasına karşılık gelmektedir (42). RFLP analizinde kullanılan enzimler ve tanıma bölgeleri Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.7.** HBV genotiplerinin tespitinde kullanılan pre-S gen bölgesini hedefleyen primer dizileri.

Primerler	Pre-S gen Bölgesi	nt. yerleşimi	PCR ürünü
Sense primer dizisi	PRES-S (5'-TCACCATATTCTTGGGAACAAGA-3')	nt. 2823-2845	446 bp.
Antisense primer dizisi	PRES-AS (5'-TTCCTGAACTGGAGCCACCA-3')	nt. 80-61	

**Çizelge 3.8.** HBV genotiplerinin belirlenmesinde, RFLP analizinde kullanılan enzimler.

Restriksiyon enzimleri	Tanma alanları	Çalışma sıcaklıkları
<i>AvaII</i>	5'....G <sup>↓</sup> GWCC....3' 3'.....CCWG <sup>↓</sup> G....5' W= A veya T	37°C
<i>MboI</i>	5'.... <sup>↓</sup> GATC ....3' 3'....CT AG <sup>↓</sup> .....5'	37°C

Spesifik primer dizileri ile amplifikasyonun gerçekleştirilmesinde “hot start” PCR tekniği kullanılmıştır. “Hot start” amplifikasyonu, reaksiyonda kullanılan temel bileşenlerden biri olan *Taq* DNA polimeraz enziminin tüp sıcaklığı 65°C’ye yükseldikten sonra karışıma ilave edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Böylece non-spesifik bağlanma ihtimali azaltılmıştır. Her bir örnek için PCR karışımları Çizelge 3.9’deki gibidir.

**Çizelge 3.9.** Pre-S gen bölgesinin amplifikasyonunda her bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılacak Miktar (µL)
Distile Su	29,5
10X <i>Taq</i> Tampon	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4
dNTP Mix (10 mM)	1
Primer 1 (PRES-S) (Forward) (100pmol/µL)	0,25
Primer 2 (PRES-AS) (Reverse) (100pmol/µL)	0,25
DNA örneği	5
<b>Enzim Karışımı</b>	
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,25
Distile Su	4,75
Primer 1: PRES-S : (5'-TCACCATATTCTTGGGAACAAGA-3')	
Primer 2: PRES-AS: (5'-TTCCTGAACTGGAGCCACCA-3')	

Oluşturulan bu PCR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait ve üzerlerinde numaraları yazılı steril 0.2 µL'lik PCR tüplerine 40'er µL konuldu. Daha sonra üzerine 5 µL DNA örneği konulup cihaza yerleştirildi. Isı 65°C'nin üzerine çıktıktan sonra ısı döngü cihazının kapağı açılıp tüpler cihazda iken tüplerin üzerine hazırlanan enzim karışımı hızlıca ilave edildi. Tüplerin kapakları yeniden kapatılıp, cihazın kapağı geri kapatıldı.

Pre-S gen bölgesinin amplifikasyonunda ısı döngü cihazında PCR koşulları Çizelge 3.10'daki gibi uygulanmıştır.

**Çizelge 3.10.** Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri.

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	10 dk	1
Denatürasyon	94	45 sn	40
Primer bağlanması (Annealing)	60	1 dk	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	1.5 dk	
Son uzama (Post elongasyon)	72	7 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

İşlem bittikten sonra, örnekler elektroforez uygulanmak üzere +4°C'deki buzdolabına kaldırıldı.

#### 3.3.3.4.2. RFLP Analizi

Pre-S gen bölgesinin PCR sonucu elde edilen 446 bp'lik reaksiyon ürünü 2'şer ünite *AvaII* (Fermentas, #ER0311) ve *MboI* (Fermentas, #ER0812) restriksiyon enzimleri ile ayrı reaksiyon tüplerinde muamele edilerek RFLP analizi yapılmıştır. Enzimler ile inkübasyon koşulları Çizelge 3.11'de özetlenmiştir.

Bu amaçla PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesinden sonra %1.5'lük agaroz jelde elektroforezi yapılmıştır. Genotiplerin ayrımı, sınırlandırılan fragmentlerin paterlerinin (kesim sonrası bant sayısı ve büyüklüğü) incelenmesi ile tespit edilmiştir. Ayrıca kontrol olarak her bir örnek için PCR ürünleri, enzimle muamele edilmeden reaksiyona dahil edilmiştir.

**Çizelge 3.11.** Restriksiyon enzimleri ile inkübasyon koşulları.

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b><i>AvaII</i></b>	<b><i>DpnII (MboI)</i></b>
Distile Su	0.8 µL	0.8 µL
10X Restriksiyon Tampon (Buffer R)	1 µL	1 µL
Enzim (10 U/µL)	0.2 µL	0.2 µL
PCR ürünü	8 µL	8 µL
Toplam Hacim	10 µL	10 µL
İnkübasyon	37°C’de 4-16 saat	37°C’de 4-16 saat

### 3.3.3.5. Pre-S Gen Bölgesinin Dizi Analizi

Pre-S gen bölgesi “hot-start” PCR tekniği ile çoğaltılan 18 örneğe DNA dizi analizi uygulanmıştır. PCR ile elde edilen spesifik diziler, işaretli dideoksinükleotidleri içeren “Bigdye Terminator v3.1Cycle Sequencing kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kullanarak, sense ve antisense zinciri PRES-S ve PRES-AS primerleri ile, “Cycle Sequence” PCR’ı yapılmıştır.

“Cycle Sequencing” sonrası reaksiyon ürünlerine Etanol/EDTA/Sodyum Asetat (NaOAc-EtOH) presipitasyon yöntemi ile saflaştırma uygulanmıştır.

Saflaştırma işlemi sonrasında, “ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) otomatize DNA dizi analizi cihazında, reaksiyon ürünlerinin elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### 3.3.3.5.1. Dizi Analizi Verilerinin Analizi

Dizi analizi verileri, aynı şekilde kromatografi şeklinde elde edilmiştir. Her bir PCR ürününün reverse ve forward primer diziler kullanılarak her iki zincirine dizi analizi uygulanmıştır. Dizi analizi sonrası her zincir komplementeri ile birlikte kromatogram dalgalarının pik uzunluklarının karşılaştırılması ile kontrol edilmiştir ve gerekli düzeltmeler yapılmıştır.

CLUSTAL X programında her iki zincir karşı karşıya getirilerek hizalanmıştır. Daha sonra GENDOC DNA dizi analizi programında, uç kısımlardaki fazla hizalanmamış diziler kırıldıktan sonra, son konsensus dizi şeklinde kayıt edilmiştir.

### 3.3.3.5.2. Filogenetik Analiz

Pre-S gen bölgesi dizisi çıkarılmış 18 hastaya ait veriler ve PubMed GenBank veri tabanında yayınlanmış genotipleri belli 43 referans HBV dizi verileri (29 tanesi genotip D, 14 tanesi diğer genotipler) ile CLUSTAL X programı kullanılarak hizalanma işlemi gerçekleştirilmiştir. GENEDOC programında da gerekli kırpma işlemleri yapılarak bütün diziler aynı uzunlukta olacak şekilde FASTA formatında kayıt edilmiştir.

Filogenetik karşılaştırma için, GenBank'dan sağlanan geneotipleri belli HBV DNA dizileri ile bu çalışmada elde edilen hizalanmış toplam 61 diziden MEGA versiyon 3.1 (paket program <http://www.megasoftware.net/> adresinden temin edilebilmektedir) (75) yazılım programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

### 3.3.4. İstatistiksel Analiz

Bütün istatistik analizleri için SPSS (The Statistical Program for the Social Sciences, 13.0, Inc., Chicago, IL) kullanıldı. Sürekli verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığını kontrol etmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. İki bağımsız grubun ortalamalar açısından karşılaştırılmasında Student's *t*-test kullanıldı. Kategorik verilerin birbiri ile olan ilişkilerinin kontrol edilmesinde ise,  $\chi^2$  analizi ve Fisher's exact testi kullanıldı. *P* değeri 0.05'den daha az bulunduğunda, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Kronik hepatit B'li 120 hastaya ait toplanan serum örneklerinden 54 tanesinde tespit edilebilir düzeyde HBV DNA'sı PCR ile pozitif bulunmuştur. Bu sebeple çalışmaya bu 54 hasta serumu dahil edilmiştir.

54 tane hastanın 33 (%61.1)'ü erkek, 21 (%38.9)'i kadından oluşmaktadır. Bütün hastaların yaş ortalaması  $40.05 \pm 12.91$  olup, erkeklerin yaş ortalaması  $39.21 \pm 13.39$ , kadınların yaş ortalaması ise  $41.38 \pm 12.33$ 'dür.

### 4.1. Serum Biyokimyasal Analiz Sonuçları

ALT düzeyi 31 IU/L'den yüksek ve AST düzeyi 32 IU/L'den yüksek bulunduğu normal seviyenin üstünde olarak kabul edildi. ALT düzeyi, 54 hastanın 24'ünde, AST düzeyi ise 54 hastanın 24'ünde yüksek olarak tespit edildi. ALT seviyesinin ortanca değeri 26.78 (16.83-49.92, %25-%75) ve AST seviyesinin ortanca değeri 31.04 (25.88-51.73, %25-%75) olarak hesap edilmiştir.

### 4.2. Serum HBV Belirteçleri

Çalışmaya dahil edilen 54 hasta serumunun hepsi HBsAg pozitif olup, 2 hasta serumu haricinde diğer 52 hasta serumunun anti-HBs'si negatif olarak tespit edilmiştir. 54 hasta serumunun hepsinin anti-HBc IgG'leri pozitif olup, sadece 4 hasta serumunun anti-HBc IgM'si pozitif olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 54 hasta serumunun 35 (%64.8)'i HBeAg negatif, 19 (%35.2)'u HBeAg pozitifdir.

Yaş bakımından HBeAg negatif olanlarda yaş ortalaması  $44.94 \pm 11.35$ , HBeAg pozitiflerde yaş ortalaması  $31.05 \pm 10.76$ 'dir ( $P= 0.001$ ). ALT ( $P= 0.356$ ) ve AST ( $P= 0.800$ ) değerleri HBeAg negatiflerde yüksek ancak anlamlı olarak bulunmamıştır. ALT seviyesinin ortanca değeri HBeAg negatiflerde 27.6 (16-43, %25-%75), HBeAg pozitiflerde 25.7 (22.93-75.42, %25-%75) olarak hesap edilmiştir ( $P= 0.356$ ). AST



seviyesinin ortanca değeri HBeAg negatiflerde 31.5 (26-43.83, %25-%75), HBeAg pozitiflerde ise 30.03 (25.54-57.5, %25-%75) olarak hesap edilmiştir ( $P= 0.800$ ) (Çizelge 4.1). HBeAg negatif ve pozitif hastalardaki, ALT ( $P= 0.356$ ) ile AST ( $P= 0.800$ ) seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

**Çizelge 4.1.** HBeAg negatif ve HBeAg pozitif hasta serumlarında ALT, AST ve DNA düzeylerinin ortanca değeri.

	ALT	AST	DNA
	Ortanca (%25-%75)	Ortanca (%25-%75)	Ortanca (%25-%75)
HBeAg (-)	27.6 (16-43)	31.5 (26-43.83)	2350 (84.74-23950)
HBeAg (+)	25.7 (22.93-75.42)	30.03 (25.54-57.5)	52500 (15300-789000)
<b>P-değeri</b>	0.356	0.800	0.001

### 4.3. Serum HBV DNA Seviyeleri

Çalışmaya dahil edilen bütün hastaların serum HBV DNA düzeyleri tespit edilebilir seviyede olup, sadece bir örnekte kantite edilememiştir. HBeAg negatif hastaların HBV DNA seviyelerinin ortanca değeri 2350 (84.74-23950), HBeAg pozitiflerin HBV DNA ortanca seviyesi 52500 (15300-789000)'dir. HBV DNA ortancası HBeAg pozitiflerde anlamlı derecede yüksek ( $P= 0.001$ ) bulunmuştur (Mann-Whitney U test) (Çizelge 4.1).

Hastaların bütün demografik özellikleri Çizelge 4.2'de özetlenmiştir ve Ek-1'de ise hastaların bütün bulguları verilmiştir.

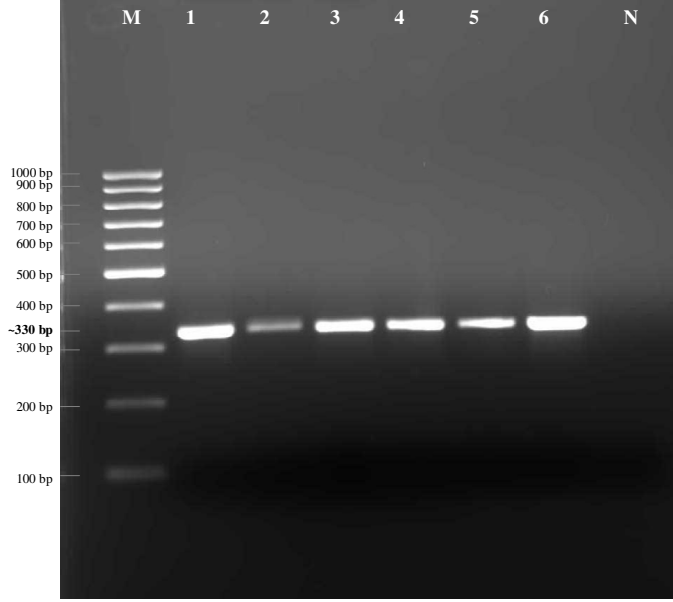
**Çizelge 4.2.** Hastaların demografik ve klinik özellikleri. (HBeAg: Hepatit B e antijeni, ALT: alanin aminotransferaz, AST: aspartat aminotransferaz). Student *t*-test,  $\chi^2$  analizi ve Mann-Whitney U test.

	HBeAg (-) (n=35)	HBeAg (+) (n=19)	P-değeri
<b>Cinsiyet (Erkek/kadın) (%)</b>	Erkek 19 (%57.6) Kadın 16 (%76.2)	Erkek 14 (%42.4) Kadın 5 (%23.8)	0.243
<b>Yaş (yıl, ortalama±SS)</b>	44.94±11.35	31.05±10.76	0.001
<b>ALT(IU/L, ortanca±SS) n (%)</b>	27.6 (16-43)	25.7 (22.93-75.42)	0.356
<b>&lt;31</b>	20 (%66.7)	10 (%33.3)	0.781
<b>≥31</b>	15 (%62.5)	9 (%37.5)	
<b>AST (IU/L, ortanca±SS) n (%)</b>	31.5 (26-43.83)	30.03 (25.54-57.5)	0.800
<b>&lt;32</b>	19 (%63.3)	11 (%36.7)	1.000
<b>≥32</b>	16 (%66.7)	8 (%33.3)	
<b>Serum HBV DNA (IU/mL, ortanca±SS) n (%)</b>	2350 (84.74-23950)	52500 (15300-789000)	0.001
<b>&lt;6</b>	4 (%100)	0 (%0)	0.284
<b>≥6</b>	30 (%61.2)	19 (%38.8)	

#### 4.4. Bazal Kor/Prekor Gen Bölgesinde Tespit Edilen Mutasyonlar

Yaptığımız bu çalışmada 6 aydan daha uzun süredir HBsAg pozitifliğine sahip HBV ile kronik olarak enfekte 121 hastadan toplanan serum örneklerinde bazal kor ve prekor gen bölgesini içine alan yaklaşık 330 bp'lik bölge nested-PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Ancak 54 hastada PCR pozitifliğine rastlanmıştır. Bu sebeple 54 hasta üzerinden çalışmaya devam edilmiştir.

“Nested-PCR” tekniği ile çoğaltılan yaklaşık 330 bp hizasındaki bazal kor/prekor gen bölgesinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü Şekil 4.1’de gösterilmektedir.



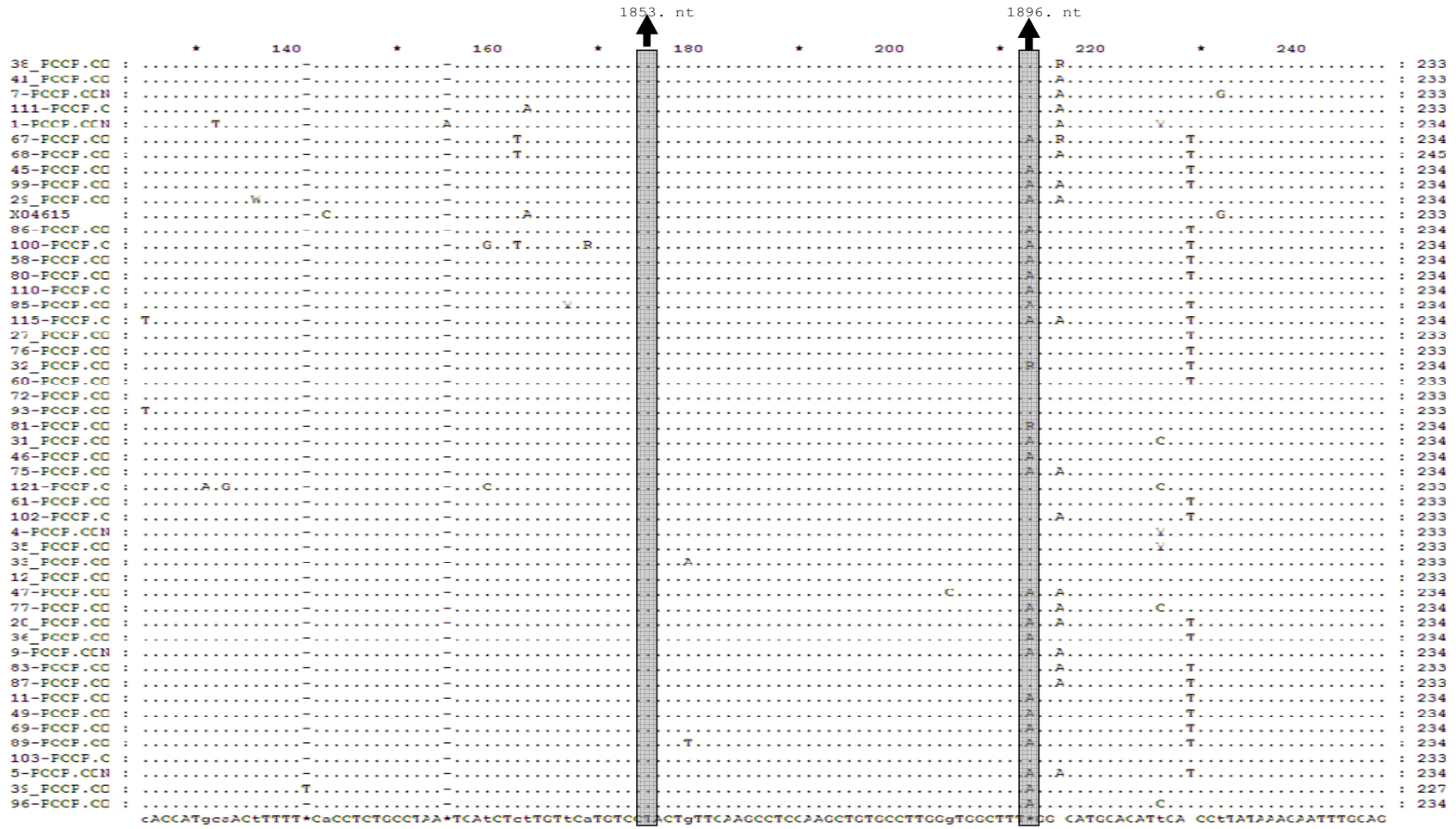
**Şekil 4.1.** Bazal kor/prekor gen bölgesinin yaklaşık 330 bp hizasındaki amplifikasyon ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü. . Kolon M; moleküler ağırlık standartı (GeneRuler 100 bp DNA ladder, #SM0241, Fermentas), kolon 1-2-3-4-5-6-7; ~330 bp uzunluğunda bazal kor/prekor amplifikasyon ürünleri, kolon 7; negatif kontrol PCR ürünü.

Bazal kor/ prekor PCR'ı pozitif bu 54 örneğe mutasyonların tespit edilmesi için elde edilen spesifik dizilerin herbirinin sense ve antisense dizilerine DNA dizi analizi uygulanmıştır. "ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında elektroforezi gerçekleştirilen örneklerin kromatografi şeklinde dizi analizi verileri elde edilmiştir. Her bir örneğin forward ve reverse dizilerinin kromatogram pik dalgaları üzerinde manuel biçimde kontrol edilmiş ve doğrulamaları yapılmıştır. CLUSTAL X programında hizalandıktan sonra, GENDOC programında konsensus dizi şeklinde kayıt edilmiştir.

Her bir hastaya ait konsensus dizi ve PubMed Gen-Bankası veri tabanından elde edilen X04615 nolu referans dizi ile CLUSTAL X programında tekrar hizalanıp, GENEDOC'da gerekli kırpma işlemleri yapıldıktan sonra, bazal kor promotör ve prekor gen bölgesindeki spesifik nükleotid değişiklikleri ve olası diğer polimorfik bölgeler belirlenmiştir.

Mutasyonlar değerlendirilirken, en yaygın görülen bazal kor gen bölgesindeki 1753. nt ve 1762/1764. nt'lerdeki ikili mutasyon ile prekor gen bölgesindeki 1896. nt'deki stop kodon oluşumuna neden olan mutasyon paternlerinin dağılımı incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de gösterilmiştir.





Şekil 4.2. devam: Bütün hastaların bazal kor ve prekor gen bölgelerinin DNA dizileri.

```

          *           260           *           280           *           300
38_PCCP.CC : ..A.C..... : 289
41_PCCP.CC : ..A.C.....T..... : 289
7_PCCP.CCN : ..A.C.....CA.....C..... : 289
111_PCCP.C : ..A.....C..... : 289
1_PCCP.CCN : ..A.C.....C..... : 290
67_PCCP.CC : ..T.....T..... : 290
68_PCCP.CC : ..A.....CC.....T..... : 301
45_PCCP.CC : ..T...T.....C2A.....M..... : 290
99_PCCP.CC : ..T...T.....C.....CAA..... : 290
25_PCCP.CC : ..T.....C..... : 290
X04615 : ..T.....T.....TA.T..... : 290
86_PCCP.CC : ..T..... : 290
100_PCCP.C : ..T.....G.....G.....C..... : 290
58_PCCP.CC : ..T..... : 290
80_PCCP.CC : ..A..... : 290
110_PCCP.C : ..A..... : 290
85_PCCP.CC : ..AG..... : 290
115_PCCP.C : ..A.....C..... : 290
27_PCCP.CC : ..A..... : 289
76_PCCP.CC : ..A.....G..... : 289
32_PCCP.CC : ..A..... : 290
60_PCCP.CC : ..A..... : 289
72_PCCP.CC : ..A..... : 289
93_PCCP.CC : ..A..... : 289
81_PCCP.CC : ..A.....A..... : 290
31_PCCP.CC : ..A.....C..... : 290
46_PCCP.CC : ..A.....G..... : 290
75_PCCP.CC : ..T..... : 290
121_PCCP.C : ..T...C.....T..... : 290
61_PCCP.CC : ..A..... : 289
102_PCCP.C : ..A...C.....C..... : 289
4_PCCP.CCN : ..A..... : 289
35_PCCP.CC : ..A..... : 289
33_PCCP.CC : ..CT..... : 290
12_PCCP.CC : ..W.....T.....CG..... : 290
47_PCCP.CC : ..T.....A.....CG..... : 290
77_PCCP.CC : ..T.....GT.....A..... : 290
20_PCCP.CC : ..T.....A...A.....GG.....C..... : 290
36_PCCP.CC : ..T.....A...A.....GG.....C..... : 290
9_PCCP.CCN : ..T..... : 290
83_PCCP.CC : ..T..... : 290
87_PCCP.CC : ..A...T.....G..... : 289
11_PCCP.CC : ..A...C.....C..... : 290
49_PCCP.CC : ..T.....DS..... : 290
69_PCCP.CC : ..T.....A..... : 290
89_PCCP.CC : ..A.....G..... : 290
103_PCCP.C : ..A.....G..... : 289
5_PCCP.CCN : ..A..... : 290
35_PCCP.CC : ..A..... : 283
96_PCCP.CC : ..A..... : 290
Ct*ctGtgGAGTTactCTCgTTtTTGCCttctCACTTCTtTCCTtCagTaCGaCAT

```

Şekil 4.2. devam: Bütün hastaların bazal kor ve prekor gen bölgelerinin DNA dizileri.

5 örneğin DNA dizi analizi okunamamıştır. Geriye kalan 49 örneğin 43 tanesinde (%87.75) bazal kor ve/veya prekor gen bölgesinde mutasyon tespit edilmiştir.

HBeAg negatif olanlarda mutasyon oranı %97.1 (33/34), HBeAg pozitif olanlarda mutasyon oranı %66.7 (10/15) olarak belirlenmiştir. Yani mutasyon oranı HBeAg'lerde, HBeAg pozitiflerden anlamlı derecede yüksek ( $P= 0.008$ ) olarak bulunmuştur (Fisher's exact test).

HBeAg negatiflerde, 7 farklı mutasyon paterni, HBeAg pozitiflerde ise, 5 farklı mutasyon paterni görülmüştür. HBeAg negatif ve pozitiflerde ortak 3 paterne rastlanmıştır.

HBeAg negatiflerde görülen mutasyon paternleri: 1 hastada, bazal kor ve prekor'da mutasyon belirlenemedi ( $\emptyset-\emptyset-\emptyset$ ), 11 hastada bazal kor 1753. nt ve 1762/1764. nt'ler ile prekor 1896. nt'de stop kodon mutasyonu (1'i T1753A-AGG1762/176TGA4-TGG1896TAG, 9'u T1753C-AGG1762/1764TGA-TGG1896TAG, 1'i T1753W-AGG1762/1764TGA-TGG1896TAG), 7 hastada bazal kor 1753. nt ve 1762/1764. nt'lerde mutasyon görülürken, prekor 1896. nt'de stop kodon mutasyonu gözlenmemiştir (4'ü T1753C-AGG1762/1764TGA- $\emptyset$ , 1'i T1753R-AGG1762/1764TGA- $\emptyset$ , 1'i T1753G-AGG1762/1764AGT- $\emptyset$ , 1'i T1753W-AGG1762/1764TGA- $\emptyset$ ), 9 hastada bazal kor gen bölgesinde mutasyon gözlenmezken 1896. nt'de prekor stop kodon mutasyonu gözlenmiştir ( $\emptyset-\emptyset$ -TGG1896TAG), 4 hastada bazal kor 1762/1764. nt'lerde mutasyon ve prekor 1896. nt'de stop kodon mutasyonu gözlenmiştir (2'si  $\emptyset$ -AGG1762/1764AGT-TGG1896TAG, 1'i  $\emptyset$ -AGG1762/1764AGA-TGG1896TAG, 1'i  $\emptyset$ -AGG1762/1764AGR-TGG1896TAG), 1 hastada bazal kor 1753. nt'de mutasyon ve prekor 1896. nt'de stop kodon mutasyonu (T1753A- $\emptyset$ -TGG1896TAG) ve 1 hasta da sadece bazal kor 1762/1764. nt'lerde mutasyon ( $\emptyset$ -AGG1762/1764AGT- $\emptyset$ ) şeklindedir (Çizelge 4.3).

HBeAg pozitiflerde görülen mutasyon paternleri ise: 1 hastada sadece bazal kor 1762/1764. nt'lerde mutasyon ( $\emptyset$ -AGG1762/1764WGR- $\emptyset$ ), 2 hastada sadece prekor gen bölgesi 1896. nt'deki stop kodon mutasyonu ( $\emptyset-\emptyset$ -TGG1896TRG), 1 hastada bazal kor 1763-1770. nt'ler arasında delesyon ve prekor TGG1896TAG, 6 hastada bazal kor 1753. nt ve 1762/1764. nt'lerde mutasyon (4'ü T1753C-AGG1762/1764TGA- $\emptyset$ , 1'i T1753G-AGG1762/1764AGT- $\emptyset$ , 1'i T1753C-AGG1762/1764TGG- $\emptyset$ ), 4 hastada bazal

kor ve prekor gen bölgelerinde mutasyona rastlanmamıştır (Ø-Ø-Ø) ve 1 hastada ise bazal kor ve prekor gen bölgelerinde mutasyona rastlanmamıştır (Ø-Ø-Ø) ancak değişik yerlerde insersiyonlara rastlanmıştır (Çizelge 4.3).

HBeAg negatif ve pozitiflerde ortak olan paternler ise, bazalkor ve prekorda mutasyonun gözlenmediği patern (Ø-Ø-Ø), T1753C-AGG1762/1764TGA-Ø mutasyon paterni ve T1753G-AGG1762/1764AGT-Ø mutasyon paternidir (Çizelge 4.3).



**Çizelge 4.3.** HBeAg negatif ve HBeAg pozitif hastalarda bazal kor ve prekor gen bölgelerinde en sık görülen mutasyonların dağılımı (R: A veya G, W: A veya T, DEL: delesyon).

Toplam n=49 34 HBeAg (-) 15 HBeAg (+)	% Patern	Hasta No	Anti-HBe	HBeAg	Bazal Kor Mutasyonları		Prekor mutasyonları
					1753. nt	1762/1764. nt	1896. nt
1	%2.9	1-NK	+	-	—	—	—
1		5-NG	+	-	T→A	AGG→TGA	TGG→TAG
9	%32.4	9-İU, 11-GS, 31-MY, 20-AA, 36-HA, 47-ARK, 67-FG, 77-MG, 115-SM	+	-	T→C	AGG→TGA	TGG→TAG
1		49-MA	+	-	T→W	AGG→TGR	TGG→TAG
4		7-ES, 33-FD, 83-SK, 87-IA	+	-	T→C	AGG→TGA	—
1	%20.6	12-NÖ	+	-	T→R	AGG→TGA	—
1		102-SM	+	-	T→G	AGG→AGT	—
1		111-İY	+	-	T→W	AGG→TGA	—
9	%26.5	29-RB, 45-BÖ, 58-Nİ, 80-CÇ, 86-OG, 96-SK, 99-NÖ, 100-DID, 110-ŞÇ	+	-	—	—	TGG→TAG
2		46-HY, 75-MA	+	-	—	AGG→AGT	TGG→TAG
1	%11.8	69-KE	+	-	—	AGG→AGA	TGG→TAG
1		85-ÖG	+	-	—	AGG→AGR	TGG→TAG
1	%2.9	89-SS	+	-	T→A	—	TGG→TAG
1	%2.9	121-MG	+	-	—	AGG→AGT	—
1	%6.7	27-KY	-	+	—	AGG→WGR	—
2	%13.3	32-SK, 81-ÜÇ	-	+	—	—	TGG→TRG
1	%6.7	39-MT	-	+	—	1763-1770.DEL	TGG→TAG
4		35-NÜ, 4-NE, 38-HA, 41-ZÖ	-	+	T→C	AGG→TGA	—
1	%40	61-AÖ	+	+	T→G	AGG→AGT	—
1		103-AŞ	-	+	T→C	AGG→TGG	—
4		60-EK, 72-ŞD, 76-MK, 93-HÖ	-	+	—	—	—
1	%33.3	68-AY	-	+	—	—	—
(değişik yerlerde insersiyon var)							

HBeAg negatif ve HBeAg pozitifler arasında patern dağılımlarının oranları açısından gözlenen farklılık anlamlı bulunmuştur ( $P= 0.006$ ) ( $\chi^2$  testi).

Bazal kor 1753. nt ve 1762/1764. nt'lerde ve prekor 1896. nt'de mutasyon negatifliği HBeAg negatif bir hastada (1/34, %2.9) ve HBeAg pozitiflerin %33.3 (5/15)'üne rastlanmıştır. HBeAg negatiflerdeki bazal kor 1753. nt ve 1762/1764. nt'lerde ve prekor 1896. nt'de birlikte mutasyon pozitifliğinin oranı %32,4 (11/34) olup, HBeAg pozitiflerde birlikte mutasyon gözlenmemiştir (0/15, %0). Bazal kor 1753. nt ve 1762/1764. nt'lerde mutasyon pozitif ve prekor 1896. nt'de mutasyon negatifliği HBeAg negatif ve pozitiflerde görülmüştür ve HBeAg negatiflerde %20.6 (7/34), pozitiflerde ise %40 (6/15) oranında görülmüştür. Bazal kor gen bölgesinde (1753. nt ve 1762/1764. nt'ler) mutasyon negatif ve prekor gen bölgesinde 1896. nt'de mutasyon pozitifliği HBeAg negatiflerde %26.5 (9/34), HBeAg pozitiflerde %13.3 (2/15) oranında görülmüştür. Bazal kor 1753. nt'de mutasyon negatif, 1762/1764. nt'lerde mutasyon pozitif ve prekor 1896. nt'de mutasyon pozitifliğine HBeAg negatiflerde %11.8 (4/34) oranında rastlanmış olup, HBeAg pozitiflerde rastlanmamıştır (0/15). Bazal kor 1753. nt'de mutasyon pozitif, 1762/1764. nt'lerde mutasyon negatif ve prekor 1896. nt'de mutasyon pozitifliği az olmakla birlikte yalnızca bir HBeAg negatif hastada (1/34, %2.9) rastlanmıştır. Yine bazal kor 1753. nt'de mutasyon negatif, 1762/1764. nt'lerde mutasyon pozitif ve prekor 1896. nt'de mutasyon negatifliğine az rastlanmakla birlikte, HBeAg negatif hastaların yalnızca birinde (1/34, %2.9), HBeAg pozitiflerin de yalnızca birinde (1/15, %6.7) rastlanmıştır. Bazal kor 1753.nt'de mutasyon negatif, 1763-1770. nt'ler arasında 8 bp'lik (GGTCTTTG) delesyon ve prekor 1896. nt'de mutasyon pozitifliğine sadece HBeAg pozitif bir hastada rastlanmıştır (Çizelge 4.4).

HBeAg negatiflerdeki bazal kor 1753. nt ve 1762/1764. nt'lerde ve prekor 1896. nt'de birlikte mutasyon pozitifliğininin HBeAg negatif ve pozitifler içindeki dağılımı birbirinden anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $P< 0.001$ ) (Minitab).

**Çizelge 4.4.** Bazal kor ve prekor gen bölgelerinde görülen mutasyon paternlerinin dağılımı.

Mutasyon Tipleri	HBeAg		Toplam n=49, (% 100)
	Negatif (%) n=34, (% 100)	Pozitif (%) n=15, (% 100)	
Mutasyon Yok	1 (%2.9)	5 (%33.3)	6 (%12.2)
1753+1762/1764+1896	11 (%32.4)	0 (%0)	11 (%22.4)
1753+1762/1764	7 (%20.6)	6 (%40)	13 (%26.5)
1896	9 (%26.5)	2 (%13.3)	11 (%22.4)
1762/1764+1896	4 (%11.8)	0 (%0)	4 (%8.2)
1753+1896	1 (%2.9)	0 (%0)	4 (%8.2)
1762/1764	1 (%2.9)	1 (%6.7)	2 (%4.1)
1763/1770 DEL+1896	0 (%0)	1 (%6.7)	1 (%2)

Bazal kor/prekor gen bölgelerindeki mutasyonların dağılımına bakıldığında; HBeAg negatifler içinde bazal kor bölgesinde mutasyon görülenlerin oranı %70.6, HBeAg pozitifler içinde ise %53.3 olarak bulunmuştur. Ancak bu her iki grup içinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $P= 0.331$ ) (Fisher's exact test). HBeAg negatifler içinde, prekor bölgesinde mutasyon görülenlerin oranı %73.5, HBeAg pozitifler içinde ise %20 olarak bulunmuştur. Her iki grup içinde anlamlı bir fark bulunmuştur ( $P= 0.001$ ) (Fisher's exact test). HBeAg negatifler içinde bazal kor ve prekor mutasyonu görülenlerin oranı %47.1, HBeAg pozitifler içinde ise %6.7 olarak bulunmuştur. Anlamlı farklılık bulunmuştur ( $P= 0.008 < 0.01$ ). HBeAg negatifler içinde bazal kor ve prekor mutasyonu görülmeyenlerin oranı %52.9, HBeAg pozitifler içinde ise %93.3 olarak tespit edilmiştir. Anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $P= 0.008$ ) (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** Bazal kor/prekor gen bölgelerindeki mutasyonların HBeAg negatif ve pozitiflerdeki dağılımı.

Mutasyonlar	HBeAg		Toplam n=49 (%)	P değeri
	Negatif n=34 (%)	Pozitif n=15(%)		
Bazal kor	Negatif	10 (%29.4)	7 (%46.7)	0.331
	Pozitif	24 (%70.6)	8 (%53.3)	
Prekor	Negatif	9 (% 26.5)	12 (%80)	0.001
	Pozitif	25 (%73.5)	3 (%20)	
Bazal kor/Prekor	Negatif	18 (%52.9)	14 (%93.3)	0.008
	Pozitif	16 (%47.1)	1 (%6.7)	

Çizelge 4.6.'da HBeAg negatif ve HBeAg pozitif hastalar arasında bazal kor ve prekor gen bölgesinde görülen mutasyonların karşılaştırılması gösterilmiştir.

Bazal kor gen bölgesinde görülen 1762/1764. nt'lerde görülen mutasyonlar, HBeAg negatif hastaların 23/34 (%67.6)'nda ve HBeAg pozitif hastaların 8/15 (%53.3)'nda bulunmuştur. 1762/1764. nt'lerde görülen mutasyonlar HBeAg negatiflerde, HBeAg pozitifler ile karşılaştırıldığında gözlenen yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P= 0.357$ ). 1762/1764. nt'lerde görülen mutasyon, HBeAg negatif hastaların, 17/23'sinde AGG→TGA şeklindedir ve son zamanlarda bildirilmeye başlayan yeni bir mutasyon olan AGG→AGT mutasyonu ise hastaların 4/23 tanesinde tespit edilmiştir. Hastalardan 2/23 tanesinde mutasyonlar ilk defa olarak AGG→AGA şeklinde tespit edilmiştir. HBeAg pozitif hastaların ise, 5/15 tanesinde AGG→TGA, 1/15 tanesinde AGG→AGT, 1/15 tanesinde ilk defa olarak AGG→TGG ve 1/15 tanesinde ise 1763-1770. nt'ler arasında 8 bp'lik delesyona rastlanmıştır.

Bazal kor gen bölgesinde görülen diğer mutasyon olan 1753. nt'de görülen mutasyon HBeAg negatif hastaların 19/34 (%55.9)'unda ve HBeAg pozitif hastaların 6/15 (%40)'nda bulunmuştur. 1753. nt'de görülen mutasyon HBeAg negatiflerde, HBeAg pozitifler ile karşılaştırıldığında gözlenen yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P= 0.364$ ). Bazal kor gen bölgesinde 1753. nt'de görülen mutasyonlar HBeAg negatif hastaların 4/19 tanesinde T→A, 13/19 tanesinde T→C ve 2/19 tanesinde ise T→G şeklindedir. HBeAg pozitif hastaların ise, 5/6 tanesinde T→C, 1/6 tanesinde T→G şeklinde mutasyon tespit edilmiş olup, T→A mutasyonuna rastlanmamıştır.

Prekor gen bölgesinde 1896. nt'de görülen mutasyon HBeAg negatif hastaların 25/34 (%73.5)'nda ve HBeAg pozitif hastaların 3/15 (%20)'nda bulunmuştur. 1896. nt'de görülen mutasyon HBeAg negatiflerde, HBeAg pozitifler ile karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde yüksek bulunmuştur ( $P= 0.001$ ). Tüm HBeAg negatif ve HBeAg pozitif hastalarda tespit edilen mutasyon tipi TGG→TAG şeklindedir.

**Çizelge 4.6.** HBV bazal kor ve prekor mutasyonlarının tespit edilemeyen düzeydeki HBeAg ile ilişkisi (Fisher's exact test).

Gen Bölgesi	Nükleotid Pozisyonu	Mutasyon	Tüm hastalar n (%)	HBeAg (-) n (%)	HBeAg (+) n (%)	P-değeri
Bazal kor	1753	Negatif	24 (%48.9)	15 (%44.1)	9 (%60)	0.364
		Pozitif	25 (%51.1)	19 (%55.9)	6 (%40)	
	1762/1764	Negatif	18 (%36.8)	11 (%32.4)	7 (%46.7)	0.357
		Pozitif	31 (%63.2)	23 (%67.6)	8 (%53.3)	
Prekor	1896	Negatif	21 (%42.9)	9 (%26.5)	12 (%80)	0.001
		Pozitif	28 (%57.1)	25 (%73.5)	3 (%20)	

HBV bazal kor 1753. nt, 1762/1764. nt mutasyonları ve prekor 1896. nt mutasyonları ile serum ALT, AST ve HBV DNA seviyeleri arasındaki ilişkiye bakıldığında ise anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** Bazal kor 1753. nt, 1762/1764. nt mutasyonları ve prekor 1896. nt mutasyonları ile serum ALT, AST ve HBV DNA seviyeleri arasındaki ilişki.

		Bazal kor		Prekor
		1753	1762/1764	1896
ALT	Negatif	30.8 (25.1-63.24)	41.39 (25.80-76.24)	24.9 (15.97-57.77)
	Pozitif	20.78 (16.04-40.97)	20.78 (15.8-39.3)	28.79 (17.25-47.97)
<b>P değeri</b>		<b>0.056</b>	<b>0.006</b>	<b>0.492</b>
AST	Negatif	30.94 (26.13-45.45)	30.88 (26.72-44.91)	31.5 (23.61-48.82)
	Pozitif	31.5 (23.61-51.82)	31.73 (23.65-54.91)	31.04 (26.25-49.95)
<b>P değeri</b>		<b>0.509</b>	<b>0.644</b>	<b>0.671</b>
HBV DNA	Negatif	9535 (559.75-62475)	20900 (812-150550)	26400 (353-560000)
	Pozitif	6320 (70.95-104750)	4560 (102.5-51350)	3140 (180.75-26650)
<b>P değeri</b>		<b>0.575</b>	<b>0.298</b>	<b>0.104</b>

## 4.5. HBV Genotiplerinin Belirlenmesi

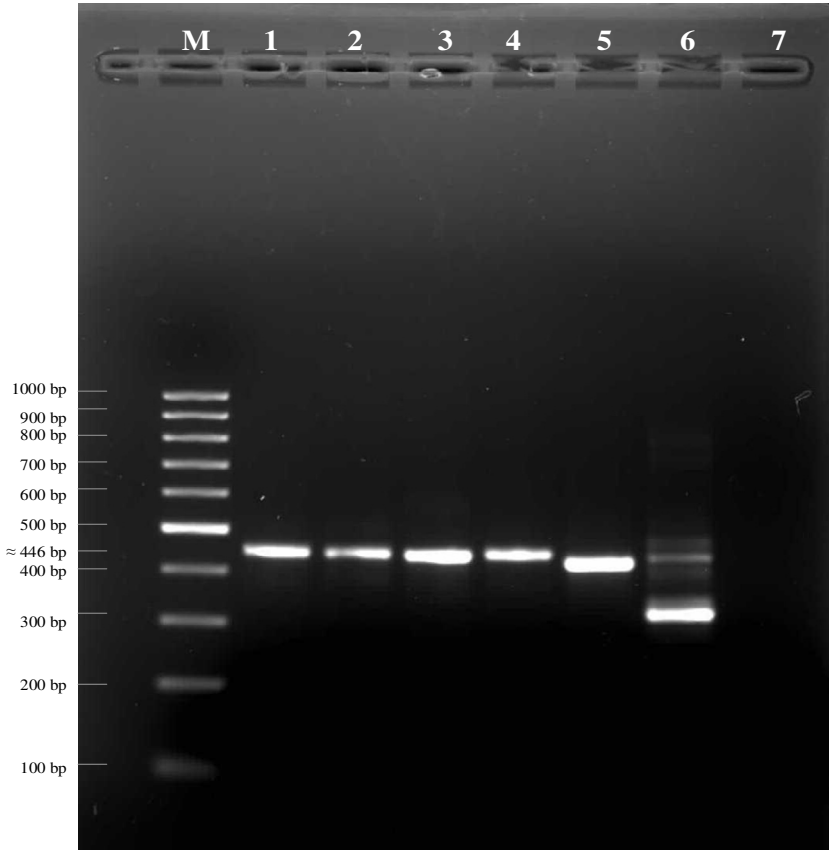
### 4.5.1. Hasta Örneklerinin PCR-RFLP Genotipleme

Genotiplerin belirlenmesinde, pre-S gen bölgesinin yaklaşık 479 bp'lik segmentini hedefleyen spesifik primerlerin kullanıldığı PCR ile çoğaltıldıktan sonra,

*AvaII* ve *MboI* restriksiyon enzimleri ile ayrı reaksiyon tüplerinde inkübe edilerek RFLP analizi uygulanmıştır.

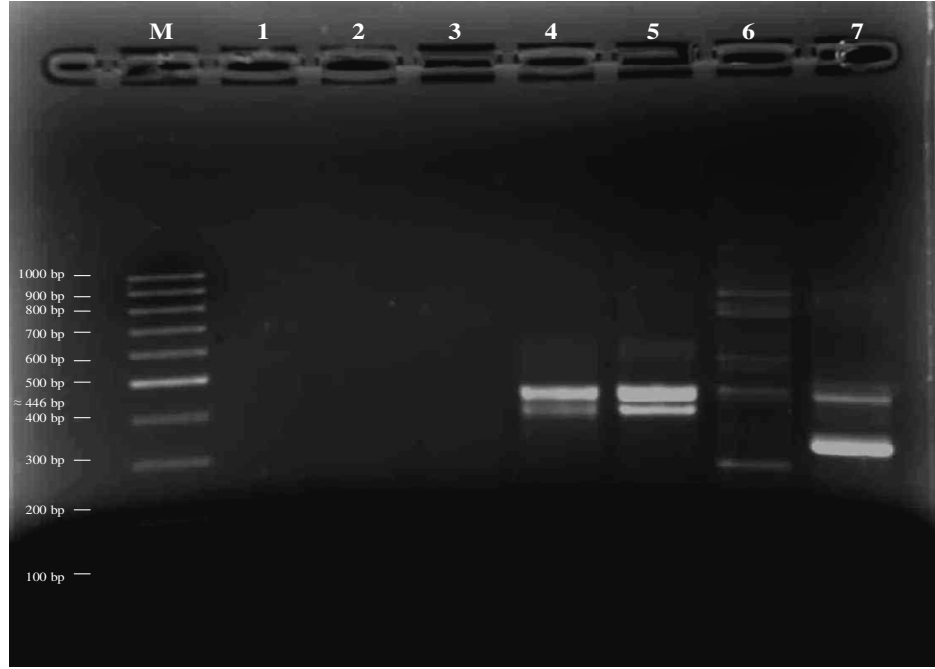
Lindh ve arkadaşları (42), bütün genotip D GenBank dizilerinin, 3221 bp uzunluğundaki suşlarda pre-S1 gen bölgesinde 2859-2891 pozisyonunda 33 bp'lik delesyona sahip olduğunu belirtmektedirler. Bu genotip PCR sonrası 479 bp yerine 446 bp uzunluğunda amplikon vermektedir, bu da genotip D'nin tespitini kolaylaştırmaktadır. Bizim çalışmamızda da genotiplenmesi yapılan örneklerden elde edilen ürünlerin hemen hemen hepsi yaklaşık 446 bp hizasındadır. Ancak örneklerden bir tanesi yaklaşık 300 bp hizasında bir ürün vermiştir.

“Hot start” PCR tekniği ile çoğaltılan yaklaşık 446 bp hizasındaki pre-S gen bölgesinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü Şekil 4.3’de gösterilmektedir.



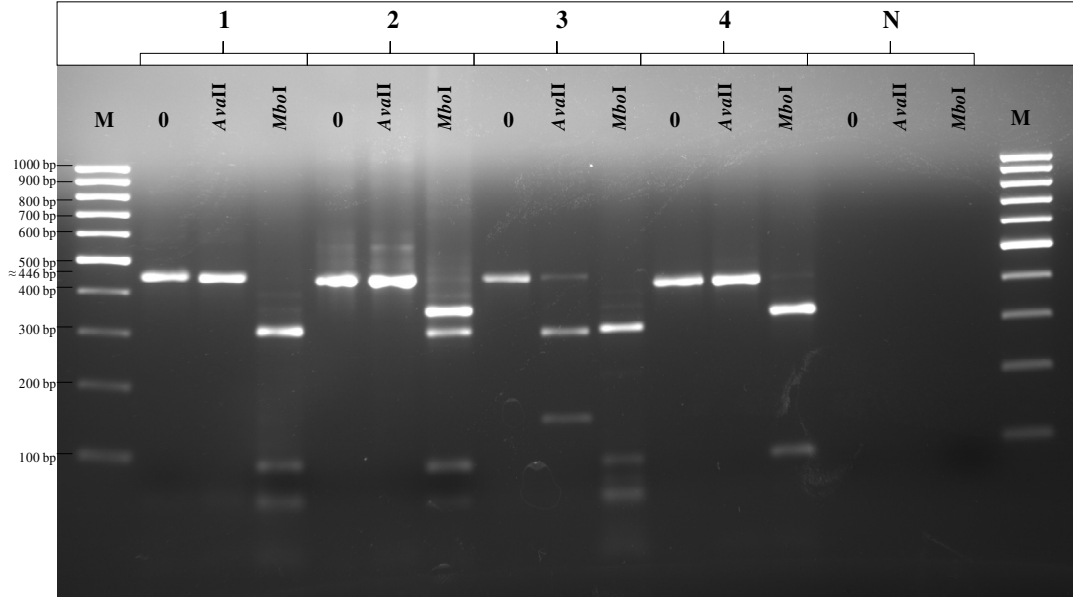
**Şekil 4.3.** “Hot start” PCR tekniği ile çoğaltılan ~446 bp ve 300 bp hizasındaki pre-S gen bölgesinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. Kolon M; moleküler ağırlık standartı (GeneRuler 100 bp DNA ladder, #SM0241, Fermentas), kolon 1-2-3-4-5; ~446 bp uzunluğunda pre-S amplifikasyon ürünleri, kolon 6; ~300 bp uzunluğunda pre-S amplifikasyon ürünü, kolon 7; negatif kontrol PCR ürünü.

Örneklerden 3 tanesinin PCR'si negatif, 2 tanesi yaklaşık 446 bp'in altında güçlü bir nonspesifik bir bant daha vermiştir, 1 örnekte çok sayıda non spesifik bantlara rastlanmıştır ve bir örnek ise yaklaşık 300 bp hizasında bir bant vermiştir (Şekil 4.4). Bu sorunlu 7 örneğe RFLP analizi uygulanamamıştır. Geriye kalan 47 örnek *AvaII* ve *MboI* restriksiyon enzimleri ile 37°C'de 4-16 saat inkübe edilmiştir.



**Şekil 4.4.** Anormal sonuç veren örneklerin PCR görüntüleri. Kolon M; moleküler ağırlık standartı (GeneRuler 100 bp DNA ladder, #SM0241, Fermentas), kolon 1-2-3; PCR negatif örnekler, kolon 4-5; 446 bp'in altında güçlü bir nonspesifik bir bant veren örnekler, kolon 6; çok sayıda nonspesifik ürün veren örnek, ~300 bp hizasında ürün veren delesyona uğramış olan örnek.

Enzimler ile inkübasyon sonunda %1.5'lük agaroz jelde elektroforezi yapılmıştır. Genotiplerin ayrımı, kesim sonrası bant sayısı ve büyüklüğünün incelenmesi ile tespit edilmiştir ve 4 farklı restriksiyon paterni elde edilmiştir. Restriksiyon paternleri Şekil 4.5'de agaroz jel elektroforezinde gösterilmiştir.



**Şekil 4.5.** Serum örneklerinden HBV pre-S gen bölgesi PCR-RFLP analizi sonucu elde edilen kesim paternleri. Her bir örneğin 3 kolonda elektroforezi yapıldı: ilk kolon enzimle muamele edilmemiş PCR ürünü, ikinci kolon *AvaII* ile inkübe edilen PCR ürünü ve üçüncü kolon da *MboI* enzimi ile inkübe edilen PCR ürününden oluşmaktadır. Kolon M; moleküler ağırlık standartı (GeneRuler 100 bp DNA ladder, #SM0241, Fermentas), örnek 1; *AvaII* enzimi ile kesim yok ve *MboI* enzimi ile 306/89/51 bp'lik kesim ürünleri, örnek 2; *AvaII* enzimi ile kesim yok ve *MboI* enzimi ile 357/306/89/51 bp'lik kesim ürünleri, örnek 3; *AvaII* enzimi ile 300/146 bp'lik ve *MboI* enzimi ile 306/89/51 bp'lik kesim ürünleri, örnek 4; *AvaII* enzimi ile kesim yok ve *MboI* enzimi ile 306/89/--- bp'lik kesim ürünleri, örnek N; negatif kontrol.

Lindh ve arkadaşları (42), 51 GenBank sekansının filogenetik analizini ve *AvaII* ve *MboI* enzimleri ile restriksiyon analizini yapmışlardır. RFLP analizi ile tahmin edilen toplam 13 *AvaII* ve 10 *MboI* paterni belirlenmiş ve bunlardan da 19 kombine patern elde etmişlerdir. Bu analizle her bir genotipin, diğer genotiplerle çakışmadan, *AvaII* ve *MboI* paternlerinin kombinasyonu ile belirlenebileceğini göstermişler ve genotipleme şablonu oluşturmuşlardır (Çizelge 4.8).



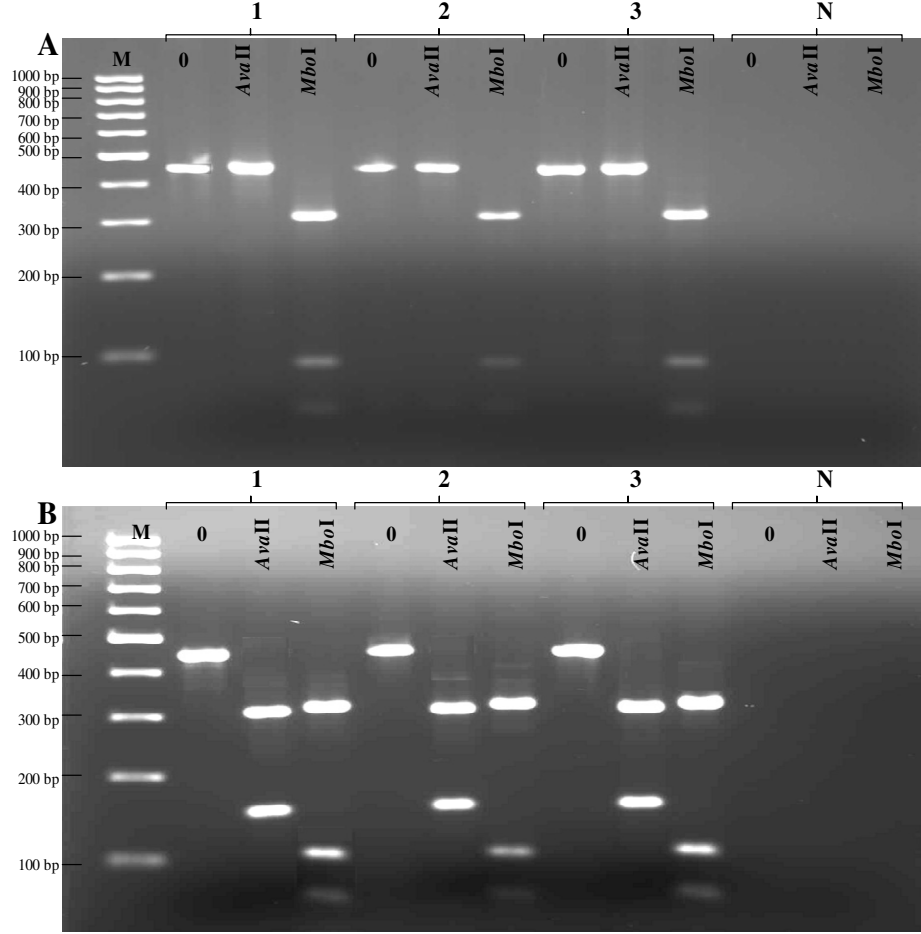
**Çizelge 4.8.** Amplifiye edilen PCR fragment büyüklükleri ve *AvaII* ve *MboI* ile kesim sonrası tahmin edilen RFLP paternleri (Bu veriler Lindh ve arkadaşları (42) tarafından bildirilen GenBank veri tabanından elde ettikleri HBV dizilerindeki genotipleme tablosundan alınmıştır).

HBV genotipleri	GenBank Erişim Numarası	PCR ürünü (bp)	Fragment Büyüklükleri (bp)		RFLP paternleri
			<i>AvaII</i>	<i>MboI</i>	
A	L13994	479	301/121/57	318/109/52	A1
	X51970	479	301/121/57	370/109	A2
	X69458	458	301/100/57	318/88/52	A3
	X02763	479	358/121	318/109/52	A4
B	D23678	479	319/121/39	318/88/52/21	B1
	M54923	479	319/79/42/39	318/88/52/21	B2
	D00331	479	319/79/42/39	318/109/52	B3
C	M12906	479	358/121	249/109/69/52	C1
	D23684	479	358/121	301/109/69	C2
	D23682	479	479	249/109/69/52	C3
	X75665	479	321/121/37	249/109/69/52	C4
	D50489	464	358/106	249/109/69/52	C5
	D04615	479	258/121/100	249/109/69/52	C6
D	J02203	446	446	306/67/52/21	D1
	Z35716	446	446	306/88/52	D2
E	X75664	476	319/108/49	306/118/52	E1
	X75657	476	319/108/49	180/126/118/52	E2
F	X75658	479	258/221	180/126/121/52	F1
	X69798	479	221/149/109	180/126/121/52	F2

Bizim örneklerimizin hemen hemen hepsi yaklaşık 446 bp'lik ürün verdiği için muhtemelen genotip D olacağı belirlenmiştir. Lindh ve arkadaşlarına göre de RFLP analizinde de genotip D *AvaII* enzimi restriksiyon alanına sahip değildir ve kesim sonrası karakteristik biçimde kesilmemiş bant vermektedir. Ancak *MboI* enzimi ile 306/88/52 veya 306/67/52/21 bp'lik kesim ürünleri verdiğini bildirmişlerdir.

Çalışılan örneklerden 34 tanesi *AvaII* enzimi ile kesilmemiştir ve *MboI* enzimi ile 306/89/51 bp'lik kesim ürünleri vermiştir. Bu kesim paternine sahip örnekler genotip D olarak belirlenmiştir. Örneklerden 7 tanesi *AvaII* enzimi ile kesilmemiştir ve beklenmeyen bir şekilde *MboI* enzimi ile 357/306/89/51 bp'lik kesim ürünleri vermiştir. Örneklerden 5 tanesi beklenmeyen bir şekilde *AvaII* enzimi ile 300/146 bp'lik ve *MboI* enzimi ile 306/89/51 bp'lik kesim ürünleri vermiştir. Örneklerin 1 tanesi de *AvaII* enzimi ile kesilmemiştir ve beklenmeyen bir şekilde *MboI* enzimi ile 306/89/--- bp'lik

kesim ürünleri vermiştir (Şekil 4.5). En yaygın görülen *Ava*II kesim negatif/*Mbo*I 306/89/51 bp kesim patterni ile *Ava*II 300/146/*Mbo*I 306/89/51 bp kesim paternleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.6.** HBV pre-S gen bölgesinin PCR-RFLP analizi sonucu elde edilen en yaygın kesim paternleri. **A:** *Ava*II enzimi ile kesim negatif ve *Mbo*I enzimi ile 306/89/51 bp'lik kesim ürünleri veren örneklerin %1.5'luk agaroz jel elektroferez görüntüsü; **B:** *Ava*II enzimi ile 300/146 bp'lik ve *Mbo*I enzimi ile 306/89/51 bp'lik kesim ürünleri veren örneklerin %1.5'luk agaroz jel elektroferez görüntüsü; N: negatif kontrol.

#### 4.5.2. Hasta Örneklerinin Filogenetik Analiz İle Genotiplerinin Belirlenmesi

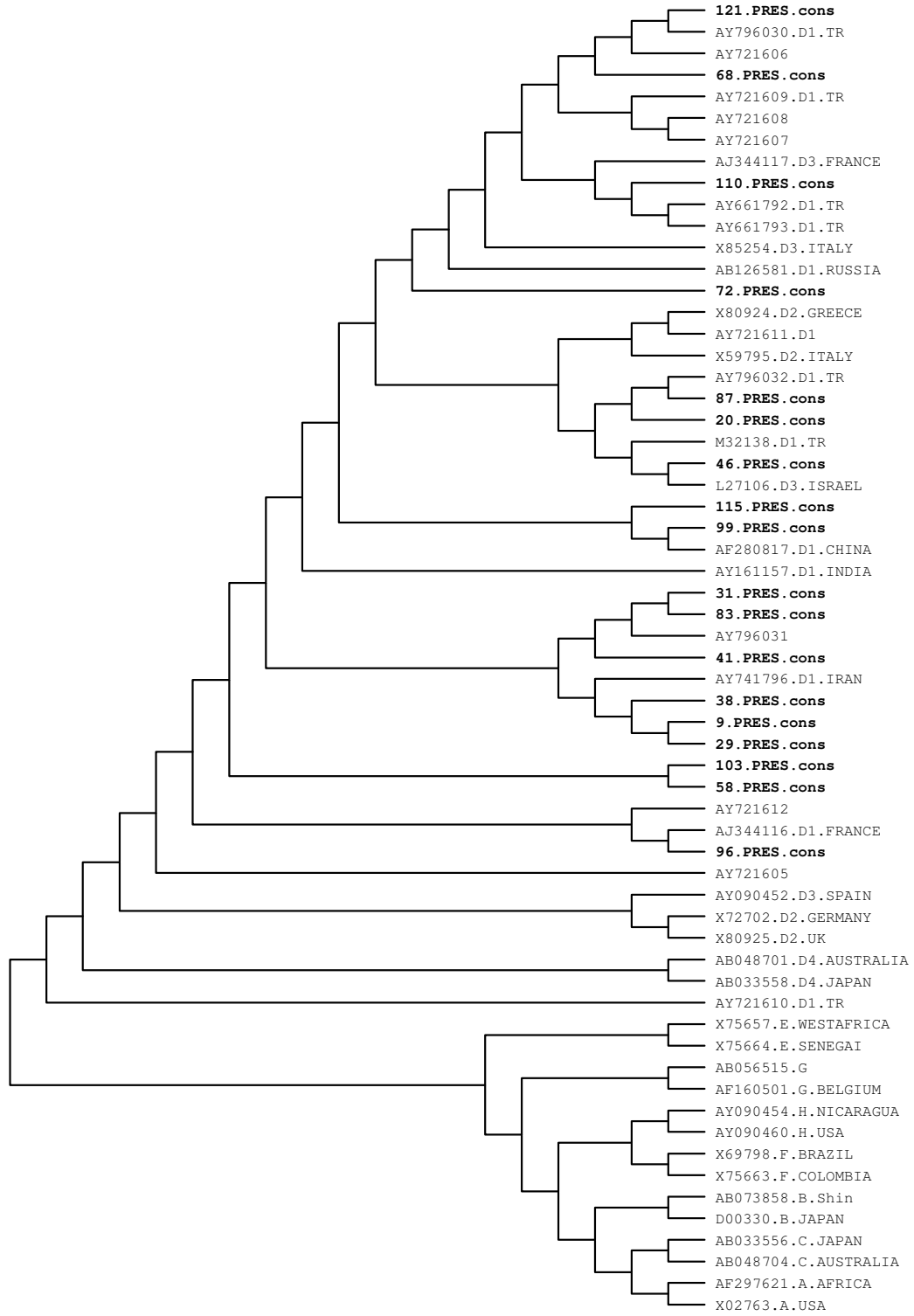
Beklenmeyen (tahmin edilemeyen) paternlerin genotip değerlendirmesinin yapılabilmesi için restriksiyon haritasının çıkarılması gerekmektedir. Bu sebeple de bu beklenmeyen patern veren örneklere (13 tane), delesyona uğramış yaklaşık 300 bp'lik örneğe ve RFLP ile genotip D olarak belirlenebilenlerin doğrulanması için temsilen

seçilen 4 örneğe DNA dizi analizi uygulanmıştır. Yani, seçilen toplam 18 örneğe DNA dizi analizi uygulanmıştır.

Pre-S gen bölgesi “hot-start” PCR tekniği ile çoğaltılan bu 18 örneğin, işaretli dideoksinükleotidleri içeren “Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanarak, sense ve antisense zinciri PRES-S ve PRES-AS primerleri ile, “Cycle Sequence” PCR’ı yapılmıştır. Saflaştırma işlemi sonrasında, “ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında, reaksiyon ürünlerinin elektroforez işlemi gerçekleştirilerek, kromatografi şeklinde DNA dizi analizi verileri elde edilmiştir. Her zincir komplementeri ile birlikte kromatogram dalgalarının pik uzunluklarının karşılaştırılması ile kontrol edilmiştir ve gerekli düzeltmeler yapılmıştır. CLUSTAL X programında her iki zincir karşı karşıya getirilerek hizalanmıştır. Daha sonra GENEDOC DNA dizi analizi programında, uç kısımlardaki fazla hizalanmamış diziler kırıldıktan sonra, her bir örnek son konsensus dizi şeklinde kayıt edilmiştir.

Pre-S gen bölgesi dizisi çıkarılmış 18 hastaya ait veriler, PubMed GenBank veri tabanında yayınlanmış genotipleri belli 43 adet referans HBV dizi verileri ile CLUSTAL X programı kullanılarak hizalanma işlemi gerçekleştirilmiştir. GENEDOC programında da gerekli kırma işlemleri yapılarak bütün diziler aynı uzunlukta olacak şekilde FASTA formatında kayıt edilmiştir. MEGA versiyon 3.1 yazılımı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.7). GenBank dizileri ile çalışılan dizilerin filogenetik karşılaştırması, gözlenen RFLP paternlerini doğrulamıştır. Bütün örnekler genotip D grubu içinde lokalize olmuştur ve bu sebeple de tahmin edildiği gibi bütün örnekler genotip D olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7).

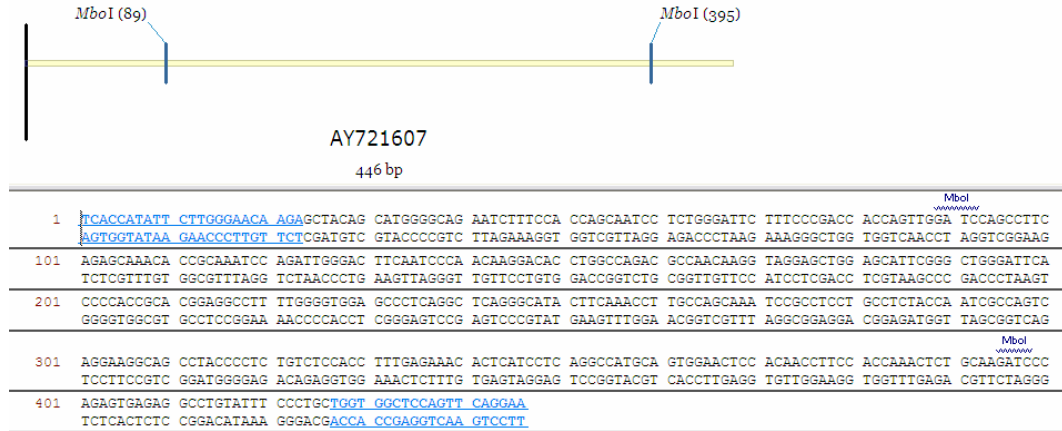
*GenBank veri tabanından elde edilen dizilerin erişim numaraları:* Genotip A: AF297621, X02763; genotip B: AB073858, D00330; genotip C: AB033556, AB048704; genotip D: AY796030, AY721606, AY721609, AY721608, AY721607, AJ344117, AY661792, AY661793, X85254, AB126581, X80924, AY721611, X59795, AY796032, M32138, L27106, AF280817, AY161157, AY796031, AY721612, AJ344116, AY741796, AY721605, AY090452, X72702, X80925, AB048701, AB033558, AY721610; genotip E: X75657, X75664; F: X69798, X75663; genotip G: AB056515, AF160501; genotip H: AY090454, AY090460.



**Şekil 4.7.** 18 çalışma ve 43 GenBank'dan elde edilen HBV dizisinin pre-S gen bölgesinin filojetik analizi ile oluşturulan filogenetik ağaç. Analiz için Mega versiyon 3.1 yazılımının neighbor joining programı kullanılmıştır.

Restriksiyon alanlarının doğrulanması için Vector NTI 9.0.0 yazılım programında dizi analizleri yapılan örneklerin ve GenBank dizilerinin tek tek *AvaII* ve *MboI* restriksiyon alanlarının haritası çıkarılmıştır ve görünen paternleri oluşturan fragment büyüklükleri hesaplanmıştır.

*AvaII* enzimi ile kesilmeyen ve *MboI* enzimi ile 306/89/51 bp'lik kesim ürünleri veren 34 örneği temsilen, bu örneklerden seçilen 4 HBV pre-S gen bölgesi, D genotipindeki GenBank dizilerindeki gibi *AvaII* için restriksiyon alanına sahip olmadığı ve *MboI* için genin 2943 ve 28 pozisyonlarında restriksiyon alanına sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.8).

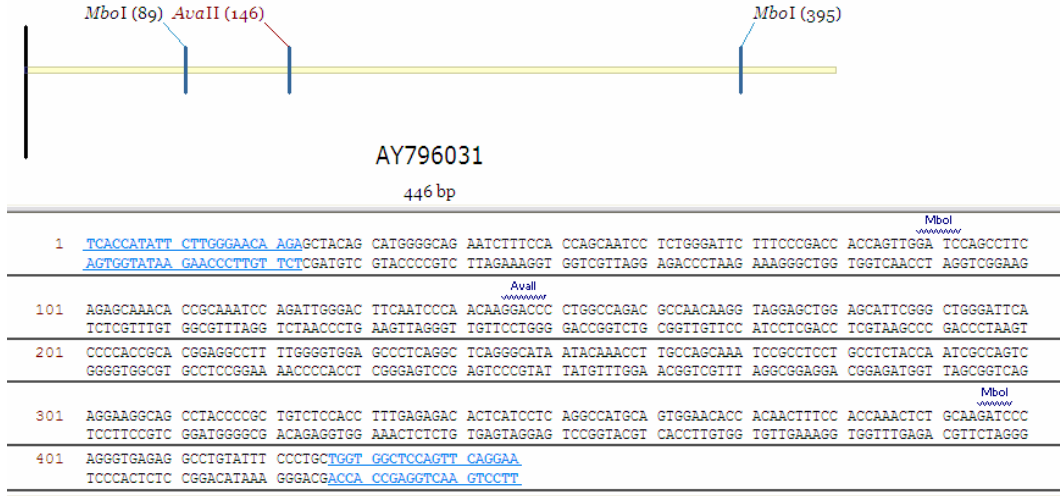


**Şekil 4.8.** AY721607 referans HBV genotip D pre-S gen dizisinin *AvaII* ve *MboI* restriksiyon haritası. *AvaII* ile kesilmediği ve *MboI* enzimi ile 306/89/51 bp fragment büyüklüğüne sahip ürünler oluşturduğu gösterilmiştir.

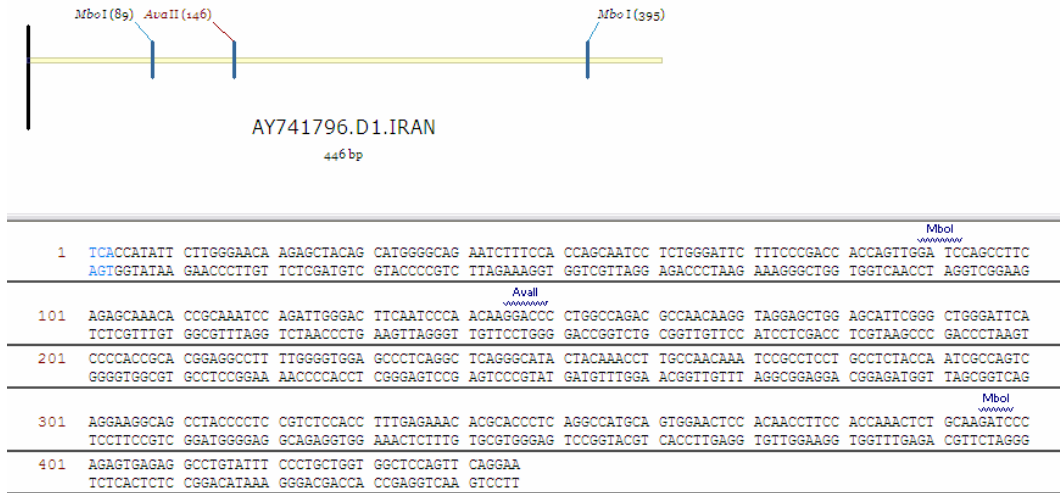
*AvaII* enzimi ile kesilmeyen ve *MboI* enzimi ile 357/306/89/51 bp'lik kesim ürünleri veren 7 örnekte de, genotip D olarak belirlenenlerde olduğu gibi pre-S genin 2943 ve 28 pozisyonlarında restriksiyon alanına sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.8). Bu örneklerde gözlenen 357 bp'lik fragmentin, 306 ve 51 bp'lik fragmentleri oluşturan kesilmemiş bir fragment olduğu anlaşılmıştır.

*AvaII* enzimi ile 300/146 bp ve *MboI* enzimi ile 306/89/51 bp'lik kesim ürünleri veren 5 örneğin restriksiyon haritasında bu kesim alanları doğrulanmıştır. Restriksiyon haritası çıkarılan GenBank dizilerinden HBV genotip D2 olarak belirlenen Türkiye'ye

ait AY796031 referans dizisinde ve genotip D1 olarak belirlenen İran'a ait AY741796 referans HBV dizisinde de bu patern gösterilmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Bu sebeple bu 5 HBV dizisi genotip D olarak belirlenmiştir.

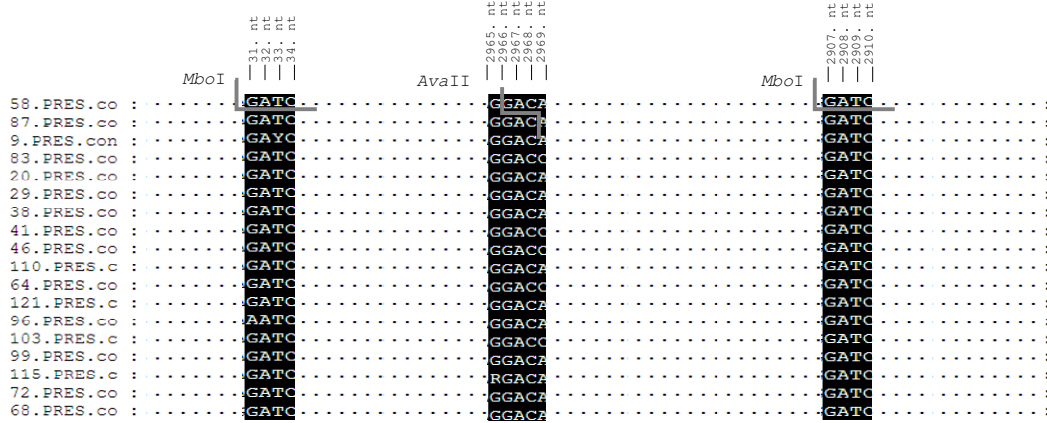


**Şekil 4.9.** AY796031 referans HBV genotip D2 pre-S gen dizisinin *AvaII* ve *MboI* restriksiyon haritası. *AvaII* ile 30/146 bp ve *MboI* enzimi ile 306/89/51 bp fragment büyüklüğüne sahip ürünler oluşturduğu gösterilmiştir.



**Şekil 4.10.** AY741796 referans HBV genotip D1 pre-S gen dizisinin *AvaII* ve *MboI* restriksiyon haritası. *AvaII* ile 30/146 bp ve *MboI* enzimi ile 306/89/51 bp fragment büyüklüğüne sahip ürünler oluşturduğu gösterilmiştir.

*AvaII* enzimi ile kesilmeyen ve *MboI* enzimi ile 306/89/-- bp'lik kesim ürünleri veren 1 örneğin (96-SK) dizi analizi sonrasında diğer gen dizileri ile hizalandığında *MboI* restriksiyon alanlarından birinin kaybolmasına neden olan 31. nt'deki G'den A'e nükleotid değişimi meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Dizi analiz yapılan 18 örneğe ait pre-S gen bölgesinin *AvaII* ve *MboI* restriksiyon alanları

Delesyona uğramış yaklaşık 300 bp hizasında ürün veren örneğin DNA dizi analizinde bütün genotip D olarak belirlenen HBV pre-S dizilerinde bulunan 33 bp'lik delesyon görülmüştür. Bu sebeple genotip D olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.12). Ayrıca filogenetik analizinde genotip D grubu içinde yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 4.7). Çizelge 4.9'da tüm örneklerin genotip değerlendirilmesi özetlenmiştir.

GENEDOC programında dizisi çıkarılan 18 örnek ile 43 referans HBV dizi hizalandığında genotip D olarak belirlenenlerin hepsinin, pre-S1 gen bölgesinde 33 bp'lik delesyona sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.12).

**Çizelge 4.9.** Tüm örneklerin PCR-RFLP sonucu ve genotip değerlendirilmesi.

n=47 (%)	PCR ürünü (bp)	RFLP fragment uzunlukları (bp)		Genotip değerlendirilmesi
		<i>AvaII</i>	<i>MboI</i>	
34 (% 72.3)	446	446 Kesim yok	306/89/51	Genotip D
7 (% 14.9)	446	446 Kesim yok	357/306/89/51	Genotip D
5 (% 10.7)	446	300/146	306/89/51	Genotip D
1 (% 2.1)	446	446 Kesim yok	306/89/---	Genotip D
<b>Genotip değerlendirilmesi yapılamayanlar, n=7</b>				
3	PCR negatif	-	-	-
3	Non spesifik PCR ürünü	-	-	-
1	~300 bp'lik PCR ürünü	-	-	Genotip D



```

AB033856.C : ACAGCAT GGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGACAAGGCAT GGGACGAAATCTTCTGTGCCAATCCCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 124
AB048704.C : ACAGCAT GGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGGAAAAGGCAT GGGACGAAATCTTCTGTGCCAATCCCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 124
AF297621.A : ACAGCAT GGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGGAAAAGGCAT GGGACGAAATCTTCTGTGCCAATCCCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 103
X02743.A.U : ACAGCAT GGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGGAAAAGGCAT GGGACGAAATCTTCTGTGCCAATCCCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 124
AB073858.B : ACAGCAT GGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGGAAAAGGCAT GGGACGAAATCTTCTGTGCCAATCCCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 124
D00930.B.J : ACAGCAT GGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGGAAAAGGCAT GGGACGAAATCTTCTGTGCCAATCCCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 124
AY090454.H : ACAGCAT GGGAGCACCTCTCTCAACGGGCGAGAAAGGGGCAT GGGACGAAATCTTCTGTGCCAATCCCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 124
AY090460.H : ACAGCAT GGGAGCACCTCTCTCAACGGGCGAGAAAGGGGCAT GGGACGAAATCTTCTGTGCCAATCCCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 124
X69798.F.B : ACAGCAT GGGAGCACCTCTCTCAACGGGCGAGAAAGGGGCAT GGGACGAAATCTTCTGTGCCAATCCCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 124
X75663.F.C : ACAGCAT GGGAGCACCTCTCTCAACGGGCGAGAAAGGGGCAT GGGACGAAATCTTCTGTGCCAATCCCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 124
AB056515.G : ACAGCAT GGGGCTTTCITGGACGGTCCCTCTCGAATG---GGGACGAAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 124
AF180501.G : ACAGCAT GGGGCTTTCITGGACGGTCCCTCTCGAATG---GGGACGAAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 121
X75657.F.W : ACAGCAT GGGGCTTTCITGGACGGTCCCTCTCGAATG---GGGACGAAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 121
X75664.F.S : ACAGCAT GGGGCTTTCITGGACGGTCCCTCTCGAATG---GGGACGAAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 121
AB124581.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY721609.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
99.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
116.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AF280817.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY796032.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY721606 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY721608 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY721607 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY161167.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
X85254.D3 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
41.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AJ344117.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
121.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
72.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
46.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
31.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
103.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY661792.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY661793.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY796030.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
110.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
9.FRES.con : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
29.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
L27106.D3 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
38.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY741796.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
58.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
87.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY721605 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY721612 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
83.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
68.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
20.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
NS2139.D1 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AJ344116.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY090452.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
96.FRES.co : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
X72702.D2 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
X80925.D2 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY796031 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
X80924.D2 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AB048701.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AB033558.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY721611.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
X59795.D2 : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
AY721610.D : ACAGCAT GGGSCAGAATCTTCCACCAGAACTCTGGGTTCTTCCGATCAGCAGTGGACCCAGGATTCCGAGCCAACTCAAAACA : 91
ACAGCAT GGGGcagAatcTtTccaccA cAAtCctTgGgAtTctTtCcGAcAcCAGtTgGAtCCagc TTCagAGCCAAcCc aAa

```

Şekil 4.12. GENEDOC programında dizisi çıkarılan 18 örnek ile 43 referans HBV dizisi.





```

380          400          420
AB033556.C : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 430
AB048704.C : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 430
AF297621.A : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 409
X02763.A.U : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 430
AB073858.B : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 430
D00330.B.J : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 430
AY090454.H : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 430
AY090460.H : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 430
X69798.F.B : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 430
X75663.F.C : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 430
AB056515.G : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 427
AF160501.G : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 427
X75657.E.W : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 427
X75664.E.S : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 427
AB126581.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY721603.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
99.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
115.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AF290817.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY796032.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY721606 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY721608 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY721607 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY161157.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
X85284.D3 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
41.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AJ344117.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
121.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
72.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
46.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
31.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
103.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY661792.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY661793.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY796030.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
110.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
9.PRES.con : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
29.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
L27106.D3 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
38.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY741796.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
58.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 398
87.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 382
AY721605 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY721612 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
83.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
68.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : -
20.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
M32138.D1 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AJ344116.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY090452.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
96.PRES.co : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 376
X72702.D2 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
X80925.D2 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY796031 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
X80924.D2 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AB048701.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AB033558.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY721611.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
X59798.D2 : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : 397
AY721610.D : GGAACTCCACCAATTCCACCACTCTGCGAGATCCCAGAGTACGGGCTGTATTTCC : -
ggaa tccacaa tccacaa cctctgcaagatcccagagt ag ggcctgt at t cc

```

Şekil 4.12. devam: GENEDOC programında dizisi çıkarılan 18 örnek ile 43 referans HBV dizisi.

## 5. TARTIŞMA

Yaptığımız bu çalışma Mersin ilinde HBV ile kronik olarak enfekte hastalarda HBeAg ekspresyonu ile ilişkili bazal kor ve prekor gen bölgesinde görülen mutasyonların epidemiyolojik olarak araştırılması ile ilgilidir. Mutasyonlar değerlendirilirken, en yaygın görülen bazal kor gen bölgesindeki 1753. nt ve 1762/1764. nt'lerdeki ikili mutasyon ile prekor gen bölgesindeki 1896. nt'deki stop kodon oluşumuna neden olan mutasyon paternlerinin dağılımı incelenmiştir.

Genotipleme, genomun genetik karakterizasyonu olup, genomları nükleotid değişimleri, delesyonlar veya insersiyonlara göre sınıflandırabilmekte ve bireysel bir suşu bir diğerinden ayırabilmektedir. Genotiplerin belirlenmesi, suşların moleküler virolojik özelliklerini oluştursa da, klinik olarak da faydalı olabilmektedir (7). Bazal kor ve prekor mutasyonları ile genotipler/alt genotipler arasında ilişkinin olduğu bildirilmiştir. Bazal kor ve prekor gen bölgeleri viral replikasyon ve gen ekspresyonu için önemli gen bölgeleri oldukları için, farklı genotip/alt genotipler ile enfeksiyonun bir sonucu olarak bu bölgeler içindeki varyasyon veya mutasyonların hastalığın seyirindeki farklılığa neden olabileceği belirtilmektedir (11). Kramvis ve arkadaşları (11), HBV mutasyonları/varyasyonları ile genotipleri/subgenotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

Yaptığımız bu çalışmada genotiplerin belirlenebilmesi için kronik HBV enfeksiyonlu hastaların serum örneğinde, HBV pre-S gen bölgesi hedeflenmiştir ve RFLP ve DNA dizi analizi sonrası filogenetik karşılaştırma ile analiz edilmiştir. Çalışılan 54 hastaya ait serum örneğinden 47 tanesinin genotipleme yapılabildiği ve hepsi genotip D olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Çalışmadan elde edilen sonuçlarda, Mersin ilindeki kronik HBV ile enfekte Türk hastaların genotipik olarak çeşitlilik göstermediği belirlenmiştir.

Çalışılan örneklerden 34 (% 72.3) tanesi PCR-RFLP ile genotiplendirilebilmiştir. Bu örnekler referans alınan makaledeki (42) gibi restriksiyon analizinde *AvaII* enzimi ile kesilmemiş ancak *MboI* enzimi ile 306/89/51 bp uzunluklarında ürünler vermiştir. PCR-RFLP analizinde 7 (% 14.9) örnek *AvaII* enzimi ile kesilmemiş ancak *MboI* enzimi ile 357/306/89/51 bp uzunluklarında ürünler

vermiştir. DNA dizi analizinde bu örneklerin genotip D olarak belirlenenler ile aynı *MboI* restriksiyon alanlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Kesim ürünlerinden 357 bp'lik fragmentin 306 ve 51 bp'lik fragmentleri oluşturan kesilmemiş ürün olduğu anlaşılmıştır. PCR-RFLP analizinde *AvaII* enzimi ile kesilmeyen ve *MboI* enzimi ile 306/89/--- bp'lik kesim ürünleri veren 1 örneğin (%2.1), dizi analizi sonrasında diğer gen dizileri ile hizalandığında *MboI* restriksiyon alanlarından birinin kaybolmasına neden olan 31. nt'deki G'den A'e nükleotid değişimi meydana geldiği görülmüştür. PCR-RFLP analizinde, *AvaII* enzimi ile 300/146 bp ve *MboI* enzimi ile 306/89/51 bp'lik kesim ürünleri veren 5 örneğin (%10.7) restriksiyon haritasında bu kesim alanları doğrulanmıştır. Restriksiyon haritası çıkarılan GenBank dizilerinden HBV genotip D2 olarak belirlenen Türkiye'ye ait AY796031 referans dizisinde ve genotip D1 olarak belirlenen İran'a ait AY741796 referans HBV dizisinde de bu patern gösterilmiştir. Bu sebeple bu 5 HBV dizisi genotip D olarak belirlenmiştir. Referans alınan Lindh ve arkadaşları (42)'nin araştırma makalelerinde HBV genotip D izolatlarının *AvaII* enzimi ile kesim alanına sahip olmadığı bildirilmiştir. Ancak DNA dizi analizi ile genotip D olduğu doğrulanan bizim 5 örneğin *AvaII* enzimi ile kesim alanına sahip olduğu ve 300/146 bp'lik kesim ürünleri verdiği bulunmuştur. Yaptığımız bu çalışma ile, genotip D izolatlarının henüz literatürde olmayan *AvaII* enzimi ile kesim paterni gösterilmiş bulunmaktadır. Yaklaşık 300 bp hizasında pre-S PCR ürünü veren delesyona uğramış örnek ise, DNA dizi analizi sonrası yapılan filogenetik karşılaştırmada genotip D olarak belirlenen örnekler arasında gruplandığı gösterilmiştir.

Filogenetik analizi yapılan 18 HBV pre-S dizilerinin (delesyona uğramış örnek de dahil), HBV genotip D'nin karakteristik bir özelliği olan 33 bp'lik delesyona sahip olduğu gösterilmiştir. Analizi yapılan bütün HBV izolatlarının, filogenetik ağaçta genotip D dallarında gruplandığı gösterilmiştir. Çalışmamızda gösterilen bu genotip homojenliği, ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da (7, 8, 35, 36, 37, 38, 39, 40) gösterilmiştir.

HBV genotip D dünya genelinde bir dağılıma sahip olsa da, sıklıkla Akdeniz ülkelerinde (10, 17), Orta Asya ülkeleri (10, 76, 77), Hindistan (9, 34), Çin (78), Kuzey Amerika (3) ve bazı Avrupa ülkelerinde (13) bildirilmektedir. Ancak uluslararası seyahat ve insan göçlerinin oldukça sık olduğu bu dönemde, yeni HBV genotiplerinin toplumlara girişi, genotipler arası rekombinasyona veya bir genotipin diğerine

değişmesine neden olabileceği göz önünde bulundurulması gerektiği belirtilmektedir (79).

HBV enfeksiyonunun HBeAg doğal öyküsünde, kronik hepatit B enfeksiyonunun erken fazında wild-tip virus prekor geninin 1896. nt pozisyonunda G nükleotidi bulunmaktadır. Bu durumda virus, çeşitli tespit metodları ile gösterilebilen, “e” antijenini üretebilmektedir. Ancak 1896. nt pozisyonunda mutasyonun meydana gelmesi ile prekor geninde TAG stop kodonu oluşmakta ve HBeAg negatif hepatit meydana gelebilmektedir. Bu durumda da virus, prematüre “e” antijeni oluşturabilmektedir, ancak fonksiyonel veya olgun bir protein sekrete edememektedir. Bu sebeple de serolojik testlerle bu oldukça önemli HBeAg serolojik belirteci belirlenememektedir. Diğer taraftan bazal kor gen bölgesindeki T1762/A1764 ikili mutasyonunun meydana gelmesi de, HBeAg üretimini azaltabilmektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmaların bazal kor/prekor gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar ile HBV enfeksiyonunun seyri arasında bir ilişki olduğunun doğrulandığı belirtilmektedir (10).

Toplam 121 kronik enfekte hasta serumu çalışmaya dahil edilmiştir. Ancak 54 serum örneğinde PCR ile tespit edilebilir düzeyde DNA’ya rastlanmıştır. Bu örneklerden 5 tanesinin bazal kor ve prekor gen bölgesinin DNA dizi analizi okunamamıştır. Geriye kalan 49 örneğin 43 tanesinde (%87.75) bazal kor ve/veya prekor gen bölgesinde mutasyon tespit edilmiştir.

HBeAg negatif kronik hepatit B’li hastaların insidansı bir çok ülkede artmaktadır (9, 76, 80). Bizim çalışmamızı oluşturan kronik hepatit B’li hastalarda da HBeAg negatif olanların sayısı ağırlıktadır. Çalışmaya dahil edilen 54 hasta serumunun 35 (%64.8)’i HBeAg negatif, 19 (%35.2)’u ise HBeAg pozitifdir. HBeAg negatif olanlarda bazal kor ve/veya prekor gen bölgelerindeki mutasyon oranı %97.1 (33/34), HBeAg pozitif olanlarda mutasyon oranı %66.7 (10/15) olarak belirlenmiştir. Yani mutasyon oranı HBeAg negatiflerde, HBeAg pozitifler ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede fazla ( $P= 0.008$ ) olarak bulunmuştur. Benzer bir şekilde D genotipinin hakim olduğu Pakistan’ın Karaçi bölgesinde yapılan bir çalışmada da bazal kor ve prekor mutasyon oranı HBeAg negatif hastaların %62’sinde, HBeAg pozitif hastaların ise %24’ünde bildirilmiştir ( $P= 0.000$ ) (76).

HBeAg negatif ve pozitif hastalar ile ALT ( $P= 0.356$ ) ve AST ( $P= 0.800$ ) seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. HBeAg negatif hastaların HBV DNA seviyelerinin ortanca değeri 2350 (84.74-23950), HBeAg pozitiflerin ise HBV seviyelerinin DNA ortanca değeri 52500 (15300-789000) olarak bulunmuştur. HBV DNA ortancası HBeAg pozitiflerde anlamlı derecede yüksek ( $P= 0.001$ ) olarak bulunmuştur.

Bazal kor/ prekor gen bölgelerindeki mutasyonların dağılımına bakıldığında; HBeAg negatifler içinde bazal kor bölgesinde mutasyon görülenlerin oranı %70.6, HBeAg pozitifler içinde ise %53.3 olarak bulunmuştur. Ancak bu her iki grup içinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $P= 0.331$ ). HBeAg negatifler içinde, prekor bölgesinde mutasyon görülenlerin oranı %73.5, HBeAg pozitifler içinde ise %20 olarak bulunmuştur. Her iki grup içinde anlamlı bir fark bulunmuştur ( $P= 0.001$ ). Prekor gen bölgesinde görülen bu mutasyonlar muhtemelen ilimizde HBV ile kronik olarak enfekte hastalarda HBeAg negatif fenotipin oluşması ile ilişkilidir. HBeAg negatifler içinde bazal kor ve prekor birlikte mutasyon görülenlerin oranı (%47.1) da, HBeAg pozitiflerden (%6.7) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $P= 0.008 < 0.01$ ) (Çizelge 4.5).

Bazal kor 1753. nt ve 1762/1764. nt'lerde ve prekor 1896. nt'de birlikte mutasyon pozitifliğininin HBeAg negatif ve pozitifler içindeki dağılımı birbirinden anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Bu mutasyon paterninin görülme oranı HBeAg negatiflerde %32.4 iken, HBeAg pozitiflerde %0'dır ( $P < 0.001$ ). Bu mutasyon birlikteliğinin, HBeAg negatif kronik enfekte hastalarda bir anlama sahip olabileceği düşüncesindeyiz.

Prekor gen bölgesinde bildirilen mutasyonların, Akdeniz bölgesinde HBeAg negatif kronik hepatitli B hastaların %85-95'inden fazlasında sorumlu olduğu bildirilmiştir (81, 82, 83). Prekor gen bölgesinde 1896. nt pozisyonunda G→A'ya nokta mutasyonu sonucu gelişen TAG stop kodonu, HBeAg sekresyonunun ortadan kaybolması ile ilişkilidir. HBeAg ekspresyonunun olmadığına ise, enfekte hepatositlerin öldürücü lenfositler tarafından tanınabilmesi yetersiz kalmaktadır (73). Genotip D ile enfekte hastalar arasında oldukça yaygın olan prekor gen bölgesindeki mutasyonlar, bu genotipte 1858. nt'de T ile baz eşleşmesi oluşturduğu için, pregenomik enkapsidasyon sinyalinin ( $\epsilon$  yapısı) sekonder yapı stabilitesini artırarak viral



replikasyonun devamını sağlamakta ve böylece viral persistansa katkıda bulunmaktadır (73, 76). Yaptığımız çalışmada, prekor gen bölgesinde 1896. nt'de görülen stop kodon (TGG→TAG) oluşumuna neden olan mutasyonun, daha önceden yapılmış çalışmalarda olduğu gibi (2, 24, 77, 80) HBeAg negatifliği ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada, 1896. nt'de görülen mutasyon HBeAg negatiflerde (25/34, %73.5), HBeAg pozitifler (3/15, %20) ile karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde yüksek bulunmuştur ( $P= 0.001$ ). Hindistan'da yapılan bir çalışmada prekor G1896A mutasyonunun genotip D spesifik olduğu ve HBeAg negatiflerde (%33) HBeAg pozitiflerden (%2) daha yaygın bulunduğu bildirilmiştir ( $P<0.01$ ) (24). İran'da yapılan D genotipinin hakim olduğu başka bir çalışmada da prekor G1896A mutasyonlu izolatların oranı HBeAg negatif hastalardaki oranı (%69.5), HBeAg pozitif hastalar (%25) ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (77). Bilindiği gibi prekor 1896. nt'de stop kodon oluşumu ile sonuçlanan mutasyon, HBeAg negatif fenotipin oluşumundan sorumludur. Ancak bizim çalışmamızda HBeAg pozitif hastaların %20'sinde prekor mutasyonu tespit edilmesine rağmen HBeAg kaybolmamıştır. Benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (17, 76, 81). Bu muhtemelen serokonversiyon sürecinde, mutant ve wild-tip virus popülasyonları ile miks enfeksiyonun bulunması sebebiyle olup, enfeksiyonun seyri sırasında HBeAg'nin temizlenmesi beklenmektedir. Bununla birlikte HBeAg negatifliğinin gelişmesinden sorumlu başka mutasyonlarında olabileceği göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Öte yandan, HBeAg pozitif asemptomatik taşıyıcılarda bu bölgede nükleotid değişimine artan bir eğilimin olduğu da bildirilmektedir (46).

Yaptığımız çalışmada, prekor G1896A mutasyonu ile serum ALT-AST seviyesi ve HBV DNA düzeyi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Choi ve arkadaşları (16) tarafından, G1896A mutasyonunun serum ALT seviyesinde yükselme ve yüksek HBV DNA seviyesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda ise, G1896A mutasyonunun aktif karaciğer hastalarında bulunduğu için ciddi karaciğer hastalığına veya fulminant hepatite neden olduğu düşünülmekteydi (84). Ancak inaktif HBeAg negatif taşıyıcılarda da sıklıkla tespit edildiği bildirilmiştir (23). Yoo ve arkadaşları (80)'nin Kore'de yaptıkları çalışmada, HBeAg negatif genotip C ile enfekte hastaların yaklaşık %93'ünde G1896A prekor mutasyonu tespit edildiğini prekor mutasyonları ile HBV DNA seviyesi veya hastalığın ciddiyeti arasında bir ilişki tespit

edilmediğini bildirilmişlerdir. Yine Chan ve arkadaşları (85) tarafından Hong Kong'da yapılan bir çalışmada da prekor G1896A mutasyonu ile karaciğer hastalığı ve HBV DNA seviyesi arasında bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar HBeAg negatifliğinin heterojen bir durum olabileceğini ve tamamen prekor HBV mutantları ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, prekor mutasyonlarının HBeAg serokonversiyonu sırasında her zaman oluştuğunu ve mutasyonlarının viral replikasyon seviyesi veya hastalığın ciddiyetine bakılmaksızın sıklıkla bulunduğu belirtilmiştir. Bu sebeple ciddi karaciğer hastalığı ve HSK'nın patogenezindeki rolünün açık olmadığı belirtilmektedir (86). Prekor mutantlarının oluşmasının, spontan veya interferon aracılı HBeAg'den anti-HBe'ye serokonversiyon sırasında arttığı belirtilmektedir ve immun baskı ile seçildiği düşünülmektedir (73).

HBeAg negatif kronik hepatit B'nin prekor mutant HBV ile ilişkili ve interferona zayıf yanıt veren progresif karaciğer hastalığı olduğu belirtilmektedir. Bu sebeple prekor gen bölgesinde mutasyona sahip HBV'nin interferona dirençli virus olarak davranabileceği belirtilmektedir. Wild-tip ve prekor mutantı HBV ile enfekte hastaların interferona karşı gösterdikleri yanıtın analiz edildiği bir çalışmada, interferon aracılı iyileşmenin wild tip ile enfekte hasta grubunda daha prevalan olduğu belirtilmiştir. Ayrıca rölaps oranının prekor mutantlı hasta grubunda daha yüksek olduğu bildirilmiştir (%85.7, %19.4) (82). Bu çalışmada prekor gen bölgesinde mutasyona sahip HBV'nin interferon yanıtına etki edebileceği gösterilmiştir. Bu sebeple de kronik HBV'nin doğal seyri sırasında, prekor mutantı HBV'nin prevalan suş olarak seçilmeden önce en kısa sürede tedavi edilmesi gerektiği belirtilmiştir.

Ülkemizde ise bazal kor promotör/prekor gen mutasyonları ile ilgili olarak sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Özgenç ve arkadaşları (6)'nın, 44 (20'si HBeAg pozitif, 24'ü HBeAg negatif) naiv kronik Hepatit B'li hastayı dahil ettikleri çalışmada, HBeAg negatif örneklerin prekor mutasyonları (G1896A ve G1899A) ile ilişkili bulduklarını bildirmişlerdir. Bozdayı ve arkadaşları (87)'nin yaptıkları bir çalışmada ise, 81 kronik HBV enfeksiyonlu (47'si HBeAg pozitif ve 34'ü HBeAg negatif) hastaların hepsinin 1858. nükleotidde T'e sahip olduğu bulunmuştur. HBeAg pozitif hastaların 7 (%15)'inde ve HBeAg negatif hastaların 29 (%85)'unda prekor gen stop kodon mutasyonu (G1896A) tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızın bulguları ile uygun olarak, Batı Akdeniz'deki Türk hastalarda, HBeAg negatif fenotipin prekor bölgesindeki

mutasyonla ilişkili olduğu bildirilmiş ve diğer bölgelerdeki hastaların sonucu ile desteklenmesi gerektiği belirtmişlerdir. Bu çalışmada HBeAg negatif ve pozitif hastalardaki, ALT seviyesi ile ifade edilen karaciğer hasarı ile prekor gen bölgesinde görülen mutasyonların oranı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı belirtilmiştir. Çalışmanın sonuçları bizim bulgularımız ile uyum göstermektedir.

Bazal kor gen bölgesinde görülen T1762/A1764 ikili mutasyonlarının, prekor stop kodon mutasyonları ile ilişkili olarak, fulminant veya kronik hepatit olgularında bildirildiği belirtilmektedir (73). Bazal kor gen bölgesindeki mutasyonlar, pregenomik RNA ve HBeAg'nin azalmasına neden olan prekor ve kor mRNA'nın transkripsiyonunu azalttığı belirtilmektedir (16, 25, 88). Son yapılan çalışmaların, bazal kor T1762/A1764 ikili mutasyonunun, prekor mRNA'sının ekspresyonunu azaltması ile ilişkili HBeAg sentez seviyelerinde azalmaya ve pregenomik mRNA etkinliğinde azalma ile ilişkili HBV replikasyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (73, 79). Diğer yandan ise, mutasyona uğramış bazal kor gen bölgesine transkripsiyon faktörleri artık bağlanamadığı ve ardından da prekor RNA'nın transkripsiyonu ve buna bağlı olarak da "e" antijeninin sentezinin azaldığı belirtilmektedir. Prekor gen ekspresyonundaki azalmaya ise projeni virus üretimindeki artış eşlik etmektedir. Bu artmanın pregenomik DNA enkapsidasyonu sırasında veya hemen öncesinde gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu sebeple de bazal kor T1762/A1764 ikili mutasyonunun "e" antijen fenotipini önlediği ancak tamamen ortadan kaldırmadığı belirtilmiştir (25). Enfekte hepatosit yüzeyinde kor peptidleri HLA sınıf 1 molekülleri ile sunulmaktadır. Sirkülasyondaki HBeAg ise T hücreleri üzerine baskılayıcı etkiye sahiptir. HBeAg'nin bazı dizileri ise kor proteini ile ortakır. Bu sebeple de sirküle olan HBeAg'nin, enfekte hepatosit yüzeyinde sitotoksik T lenfositlerine sunulan kor proteinlerinin tanınmasını engelleyebilmektedir. Ancak sirkülasyondaki HBeAg'nin süpresyonu ile kor spesifik sitotoksik T lenfositlerini süprese edemeyeceğinden çok sayıda enfekte hücre sitotoksik T lenfositlerinin hedefi haline geleceğinden, apoptozise uğramalarından behsedilmektedir (88).

Yaptığımız bu çalışmada, bazal kor gen bölgesinde 1762/1764. nt'lerde görülen mutasyonlar oldukça yüksek olup, %63.2'lere kadar ulaşmaktadır. Ancak T1762/A1764 mutasyonlarının HBeAg negatif (23/34, %67.6) ve HBeAg pozitifler (8/15, %53.3) arasında görülme sıklığı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $P= 0.357$ ). Bu da bazal kor gen bölgesindeki nükleotid değişikliklerinin, HBeAg sentezinin ortadan

kaldırılmasında önemli bir faktör olmadığını göstermektedir. Benzer bir şekilde İran'da yapılan bir çalışmada da HBeAg negatif ve pozitif hastalar arasında 1762/1764. nt'lerdeki mutasyon oranı arasında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (77). T1762/A1764 mutasyonlarının ağırlıklı olarak Japonya ve Hong Kong gibi Asya ülkelerinde bulunduğu bildirilmiştir (89). Kore'de ise T1762/A1764 mutasyonlarının bazal kor ve prekor gen bölgesinde görülen mutasyonların en yaygın tipi olduğu ve diğer Asya ülkelerinden daha prevalan olduğu belirtilmektedir (16). Hindistan'da yapılan farklı genotiplerin eşit olarak dağıldığı bir çalışmada ise, bazal kor T1762/A1764 mutasyonu HBeAg negatiflerde (%36) HBeAg pozitiflerden (%11) daha yaygın ( $P < 0.05$ ) bulunduğu bildirilmiştir (24). Genotip D'nin yaygınlıkla (%84.75) görüldüğü Tunus'ta yapılan bir çalışmada da, bazal kor gen mutasyon oranı HBeAg negatif hastalarda (%65.4), HBeAg pozitif olanlardan (%18.2) daha fazla bulunmuştur (17). Çin'de yapılan ve genotip B (%33) ve C (%63.6)'nin yaygınlıkla görüldüğünün belirtildiği bir çalışmada da, 1762/1764. nt'lerde görülen mutasyonun özellikle genotip C HBV ile kronik olarak enfekte HBeAg negatif hastalarda daha yaygın bulunduğu ve kronik HBV enfeksiyonunun ilerlemesi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada genotip C ile enfekte hastalarda serum DNA seviyesi genotip B ile enfekte olanlardan daha fazla bulunmuştur (78). Bu sonuçlar HBeAg negatif ve pozitif hastalar arasında, bazal kor gen mutasyonunun coğrafi olarak farklı dağılıma sahip olabileceğini, bu farklılığa viral faktörlerin (predominant olarak görülen HBV genotipi gibi) ve konak faktörlerinin (HLA tipi gibi) etki edebileceğini göstermektedir.

HBV genotiplerinin, bazal kor mutasyonlarının meydana gelmesi ile bağlantısı gösterilmiş (26, 78) olup, çalışmalar genotip yönünden heterojen hasta popülasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Bu da verilerin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu sebeple yaptığımız çalışmanın, tek bir genotip ile yansıtılan homojen hasta popülasyonunda değerlendirilmiş olması oldukça önemlidir.

Ülkemizde, Özgenç ve arkadaşları (6) tarafından yapılan çalışmada bazal kor promoter mutasyonlarının, HBeAg pozitif hastaların %55 (11/20)'inde ve HBeAg negatif hastaların %46 (11/24)'sında bulunduğu bildirilmiş olup, her iki grup arasında anlamlı bir farklılık görülmemektedir. Bizim çalışmamızda ise bu oranlar HBeAg negatiflerde %67.6, HBeAg pozitiflerde ise %55 olarak bulunmuştur. Bazal kor gen bölgesindeki mutasyon oranları ile ilgili olarak, bu çalışmanın sonuçlarının, bizim

çalışmamızın sonuçları ile olan uyumu oldukça açıktır. Görüldüğü gibi sonuçlar birbirine oldukça yakındır. Bozdayı ve arkadaşları (81)'nin yaptıkları bir çalışmada ise, bazal kor mutasyonları, "minimal essential region" olarak adlandırılan, TA yönünden zengin dördüncü bölgede arandığı bildirilmiştir ve bu bölge bizim incelediğimiz 1762/1764. nt'lerin dışında, 1789.nt-1795. nt'ler arasına denk gelmektedir. Çalışmanın sonucunda bu bölgede, hastaların hiçbirinde, herhangi bir nükleotid değişikliğine rastlanmadığı bildirilmiştir. Yine Bozdayı ve arkadaşları (90)'nin yaptığı başka bir çalışmada, bazal kor 1762/1764. nt'lerdeki mutasyon HBeAg negatiflerde %29, HBeAg pozitiflerde ise %17.24 oranında bulunduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi, her iki grup arasında bazal kor mutasyonlarının görülme sıklığı açısından anlamlı bir ilişki bulunmasa da, mutasyon oranı bizim çalışmamızı bulgularından oldukça düşüktür.

T1762/A1764 mutasyonlarının serum ALT ve HBV DNA seviyeleri ile ilişkili olmadığı belirtilmektedir (16, 80, 85). Bizim çalışmamızda da bu sonuçlar ile uyumlu olarak T1762/A1764 mutasyonları ile serum ALT, AST ve HBV DNA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkili bulunmamıştır. Yine Ülkemizde Bozdayı ve arkadaşları (90) tarafından yapılan çalışmada da T1762/A1764 mutasyonları ile HBV ALT düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte bazal kor gen bölgesindeki nükleotid değişkenliğinin hapatit B hastalığının aktivitesi ile ilişkili bir faktör olabileceğini belirtmişlerdir. Yoo ve arkadaşları (80)'nin Kore'de yaptıkları çalışmada ise, HBeAg negatif hastaların yaklaşık %89'unda bazal kor T1762/G1764 mutasyonu tespit edildiği ve HBV DNA seviyesi veya hastalığın ciddiyeti arasında bir ilişki tespit edilmediği için, bu mutasyonları viral replikasyon seviyesi veya hastalığın ciddiyetine bakılmaksızın sıklıkla bulunduğunu bildirmişlerdir. Ancak yapılan daha önceki çalışmalarda, T1762/A1764 mutasyonları ile ciddi karaciğer hasarı ve HSK arasında bir ilişki bulunduğu bildirilmiştir (3, 91).

Tsai ve arkadaşları (92), 51 kronik hepatit B'li naiv hastayı dahil ettikleri çalışmada, 32 hastada prekor gen mutasyonuna (G1896A), 24 hastanın ise bazal kor promoter mutasyonuna (T1762/A1764) sahip olduğunu göstermiştir. İlginç bir şekilde, prekor mutasyonunun hepatik yetmezliğe karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmışlardır ve bu sebeple de HBV prekor mutasyonunun HBV enfeksiyonu sırasında minimal virulansa sahip olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

T1762/A1764 mutasyonlarına ilaveten bazal kor gen bölgesinde görülen C1740, C1753 ve T1766 mutasyonlarının, T1762/A1764 mutasyonları varlığında tespit edilemeyen HBeAg ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (16).

HBV bazal kor gen bölgesinde bazı delesyonların tanımlandığı, ancak en yaygın olanının TA yönünden zengin, transkripsiyonu başlangıç bölgesi olan TATA bağlayan alanı etkileyen bu 8 bp'lik delesyon olduğu bildirilmiştir. Bunun da, HBeAg ekspresyonunda azalma ile sonuçlandığı belirtilmiştir (44). Yaptığımız bu çalışmada, örneklerden bir tanesinde, bazal kor gen bölgesinde 1763-1770. nt'ler arasında görülen 8 bp'lik "GGTCTTTG" delesyonu tespit edilmiştir. Ancak bu mutasyonun tespit edildiği örnek HBeAg pozitif olup, henüz serokonversiyonun gerçekleşmemiş olup prekor gen bölgesinde de stop kodon mutasyonuna sahiptir. Sayıca fazla örnekte tespit edilemediği için, viral yük ve HBeAg ekspresyonu ile arasındaki ilişki gösterilememiştir. Ülkemizde bu 8 bp'lik delesyon mutasyonu Bozdayı ve arkadaşları (90) tarafından 4 hastada bildirilmiş olup, HBeAg pozitif ve negatif hastalarda tespit edildiği belirtilmiştir. Ayrıca bu mutasyonun HBsAg, HBcAg ve HBeAg gibi viral antijenlerin ekspresyonundaki azalmadan sorumlu olabileceği ve mutant viruslarının immüntespitten kaçabileceği belirtilmiştir (90, 93). Bu delesyon, Hindistan'da Chauhan ve arkadaşları (24) tarafından yapılan çalışmada hastalardan bir tanesinde ve İran'da Veazjalali ve arkadaşları (94) tarafından yapılan bir çalışmada 4 hastada da gösterilmiştir. Pakistan'da Ahmed ve arkadaşları (95) tarafından D genotipli hastaların 4 tanesinde tespit edildiği bildirilmiştir. Çok sık rastlanmayan bu delesyon mutasyonların virusun davranışına, immun yanıtı olan etkisinin ve virusun moleküler patolojisinin ortaya çıkarılması için daha ileri *in vitro* çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

1858. nt pozisyonunda T'e sahip genotipler (genotip B, C, D, E), sıklıkla 1896. nt'de mutasyon sonucu stop kodon oluşumu ile ilişkilidirler, bu da HBeAg'nin anti-HBe serokonversiyon sırasında prekor/kor füzyon proteininde kısalma (truncation) ve HBeAg ekspresyonunun durmasından sorumludur (11). Yaptığımız çalışmada da çalışılan örneklerin hepsi 1853. nt pozisyonunda T bulundurmaktadır ve prekor gen bölgesinde 1896. nt'deki mutasyona %57.1 oranında rastlanmıştır. HBeAg negatifler (25/34, %73.5) ile HBeAg pozitifler (3/15, %20) arasında bu mutasyonların görülme

sıklığı açısından anlamlı bir fark bulunmuş olup ( $P= 0.001$ ), HBeAg negatifliğinin oluşması ile ilişkili bulunmuştur.

Dünyanın birçok bölgesinde prekor G1896A mutasyonunun, HBeAg negatif hastaların %20-95'inde tespit edilebildiği bildirilmiştir, ancak yüksek prevalansın en çok Akdeniz ülkelerinde (>%85) olduğu belirtilmektedir. Prekor varyantlarının prevalansındaki coğrafi çeşitlilik A1986 mutasyonlarının meydana gelişinin 1858. nt pozisyonunda T bulunduran HBV genotipleri ile sınırlı olması ile ilişkilidir (4). Bu sebeple G1896A prekor varyantı en fazla, Akdeniz ülkelerinde daha çok görülen HBV genotip D'de prevalan olup (4, 13), Japonya ve Güneydoğu Asyada en sık görülen genotipler olan HBV genotip B ve C'de orta seviyede ve Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da en yaygın genotip olan genotip A'da nadir olarak görülmektedir (4).

Buna karşın T1762/A1764 bazal kor mutasyonları 1853. nt'de C bulunduran HBV genotiplerinde bulunabileceği belirtilmektedir. Ayrıca, bazal kor mutasyonlarının 1858. nt'de T'den ziyade C bulunduran genotiplerde ortaya çıkmasının da muhtemel olduğu belirtilmektedir. Bu bulgular, bazal kor ve prekor gen varyantlarının coğrafik dağılımının değişik olabileceğini ortaya koymaktadır (4).

HBV D genotipinin görüldüğü Moğol halkında yapılan bir çalışmada, prekor G1896A stop kodon mutasyonunun hastaların %70.8'inde tespit edildiği bildirilmiştir (2). Hindistan'da, ağırlıklı olarak D genotipinin görüldüğü bir çalışmada, 1858. nt'de T bulunmasının sıklıkla prekor gen bölgesinde 1896. nt'de stop kodon mutasyon gelişmesi ile ilişkili olduğunu, buna karşın C bulunmasının 1762/1764. nt'lerde ikili mutasyon gelişimi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Prekor stop kodon mutasyon oranı HBeAg negatiflerde %18 oranında bildirilmiştir. HBeAg negatif hastaların yarısından fazlasının wild-tip prekor sekansına sahip olduğu belirtilmiştir. Bazal kor 1762/1764. nt'lerdeki ikili mutasyon oranı ise %32.5 olarak bildirilmiştir. Bu mutasyon sonuçları atipik olup, dünyanın başka yerlerinden bildirilen sonuçlar ile uyumlu olmadığı belirtilmiştir (9).

HBV genotip C; HBV genotip B ile karşılaştırıldığında, HBeAg serokonversiyonunda gecikme, ciddi aktif hepatit, antiviral tedaviye düşük yanıt, ilerlemiş karaciğer hastalığı ve HSK'ya karşı yüksek risk ile daha fazla ilişkilendirilmiştir (79). Ayrıca yapılan çalışmalarda bazal kor T1762/A1764 mutasyonuna sahip HBV genotip C, HSK için artan riske sahip olduğu bildirilmiştir (79, 96).

Banerjee ve arkadaşları (79) tarafından yapılan çalışmada HBV genotip C izolatlarının %69 (29/42)'unun bazal kor T1762/A1764 mutasyonuna sahip olduğu ve bunların çoğunun yüksek ALT seviyesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple HBV genotip C ile enfekte hastaların klinik gidişatının daha dikkatli izlenmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Bazal kor T1762/A1764 mutasyonunun, HBV X geninin özellikle 130 ve 131. kodonlarını (K130M ve V131I) etkileyebileceği ve hastalığın prognozunda rol oynadığı ve hatta değiştirdiği bildirilmiştir. Ayrıca 1762/1764. nt'lerin bazı immun epitoplarda ve fonksiyonel domainlerde lokalize olduğu ve sebeple 1762/1764. nt'lerdeki değişimlerin konak ile virus arasındaki etkileşimleri de değiştireceği ileri sürülmektedir (1). HBeAg ekspresyonu ile ilişkili bu ikili mutasyonun çeşitli HBV enfeksiyonlarında tespit edildiği, viral replikasyon, karaciğer hasarı ve özellikle HSK gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. HBV genotip D ile enfekte Moğol halkında yapılan bir çalışmada, T1762/A1764 mutasyonu yüksek viral yüke sahip HSK'lı hastaların %75'inde tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada C1752 ve/veya V1753 (V: A, C veya G) mutasyonlarının HSK ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (2). Yapılan başka çalışmalarda da bazal kor T1762/A1764 mutasyonunun HSK'lı hastalarda daha sıklıkta tespit edildiği ve HSK gelişme riskini belirgin biçimde artırdığı (1, 96, 97, 98, 99) ve bazal kor promoter mutasyonlarının HSK gelişmesinin tahmin edilmesinde bağımsız bir faktör olduğu tespit edilmiştir (97). Bazal kor V1753 mutasyonunun da son zamanlarda, HBeAg pozitif HBV genotip C1 taşıyıcılarında, HSK gelişiminde tahmin edici faktör olarak bildirilmiştir (100). Ayrıca invitro çalışmalarda C1753&T1762/A1764 mutasyonuna sahip HBV'nün T1762/A1764 mutasyonuna sahip olanlardan daha yüksek replikasyon kapasitesi gösterdiği bildirilmiştir (101). Bizim çalışmada ise bazal kor gen bölgesinde 1753. nt'de görülen mutasyon tüm hastaların 25/49 (%51.1)'inde görülmüş olup, HBeAg negatif hastaların 19/34 (%55.9)'unda ve HBeAg pozitif hastaların 6/15 (%40)'sında bulunmuştur. 1753. nt'de görülen mutasyon HBeAg negatiflerde, HBeAg pozitifler ile karşılaştırıldığında gözlenen yükseklik istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P= 0.364$ ).

Moleküler açıdan ise, C1753 mutasyonunun HBx antijenini kodlayan genin "hot spot" mutasyonlarından da biri olduğu düşünülmektedir. HBx proteininin fonksiyonlarından biri de hücrel genlerde olduğu gibi, HBV DNA transkripsiyonunun



transaktivasyonudur. Ayrıca C1753 mutasyonunun HBV genotip B’de HBx proteininin transaktivasyon ve antiproliferasyon aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir ve bu sebeple de geç G1 hücre siklusu blokasyonunu indükleyerek, insan konak genomuna yüksek sıklıkta HBV integrasyonuna neden olarak, böylece de HBV replikasyonunu artırarak karsinogenezise katkıda bulunabileceği belirtilmektedir (2).

Yaptığımız bu çalışmada, pre-S gen bölgesinde delesyona sahip örnekte, bazal kor/prekor gen bölgesinde de çeşitli delesyon ve insersiyonlara rastlanmıştır. Bu örneğin pre-S gen dizi analizinde bazı pozisyonlarda wild-tip ve mutasyona uğramış nükleotidlere birlikte rastlanmıştır. Bu da hasta serumunda wild-tip ve mutasyona uğramış viral bir havuzun olduğu göstermektedir. Pre-S gen bölgesindeki delesyon ve bazal kor/prekor gen bölgesindeki çeşitli delesyon ve insersiyonlar defektif bir virus oluşturmaktadır ve viral fonksiyonların muhtemelen viral havuzda bulunan wild-tip virus tarafından tamamlanabileceği belirtilmektedir (7). Bozdayı ve arkadaşları (7), pre-S1 gen bölgesinde 183 bp’lik delesyona sahip HBV izolatu bildirmişlerdir. 183 bp’lik pre-S1 delesyonunun sıklıkla presistan viral enfeksiyonlarda bulunduğu belirtilmiştir. Bu delesyon “small envelope” geninin promotörünü ortadan kaldırdığı ve viral DNA’yı içeren nükleokapsid birikimine sebep olan delesyona uğramış “large envelope” proteinin oluşumu ile sonuçlanacağı belirtilmektedir. Wild-tip virusun small proteini tamamlaması ise mutant virion oluşumuna sebep olduğu belirtilmektedir (7, 48).

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışmada, Mersin ilinde HBV ile kronik olarak enfekte hastalarda, HBV bazal kor ve prekor gen bölgesinde, ağırlıklı olarak bulunan spesifik mutasyonlar gösterilerek HBV'nin virolojik özellikleri ve hastalardaki HBV genotipi tanımlanmıştır.

Mersin ilinde kronik HBV ile enfekte hastalarda, ilk defa filogenetik analiz kullanılarak HBV genotipleri incelenmiştir. Genotipleme sonuçları, hastalardan elde edilen HBV izolatlarının, genotip dağılımının homojen olduğu ve bütün hastaların genotip D olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca genotiplerin belirlenmesinde, DNA dizi analizi ile genotip D olduğu doğrulanan bazı izolatların henüz literatürde yer almayan *AvaII* enzimi ile kesim paterni gösterilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastaların önemli bir kısmı bazal kor ve prekor varyantları ile enfektedir. HBeAg negatif hastalarda bazal kor ve/veya prekor gen bölgelerindeki mutasyon oranı, HBeAg pozitif olanlardan anlamlı derecede yüksek ( $P=0.008$ ) bulunmuştur. HBeAg negatifler içinde, prekor bölgesinde mutasyon görülenlerin oranı, HBeAg pozitiflerden anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $P=0.001$ ). Prekor gen bölgesinde görülen G1896A stop kodon mutasyonu ise Mersin ilindeki HBV ile kronik olarak enfekte hastalardaki HBeAg negatif fenotipinin oluşmasında önemli bir role sahip olarak görülmektedir.

Çalışmamızda HBeAg pozitif hastaların %20'sinde prekor mutasyonu tespit edilmesine rağmen HBeAg kaybolmamıştır. Bu muhtemelen mutant ve wild-tip virus popülasyonları ile miks enfeksiyonun bulunması sebebiyledir. Bununla birlikte HBeAg negatifliğinin gelişmesinden sorumlu başka mutasyonlarında olabileceği göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Ancak bazal kor mutasyon oranında bu her iki grup içinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $P=0.331$ ). Bununla birlikte HBeAg negatifler içinde bazal kor ve prekor birlikte mutasyon görülenlerin oranı, HBeAg pozitiflerden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $P=0.008$ ). Yani çalışılan HBeAg negatif kronik hepatit B'nin bazal kor ve prekor gen bölgelerinde nükleotid değişikliği barındıran HBV varyantları ile ilişkili olarak görünmektedir. Ayrıca, bazal kor 1753-1762/1764 ve prekor G1896A

mutasyonları ile serum ALT-AST seviyesi ve HBV DNA düzeyi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Bu sebeple bu mutasyonların HBeAg serokonversiyonu sırasında sıklıkla oluştuğunu ve bu mutasyonlarının viral replikasyon seviyesi veya hastalığın ciddiyetine bakılmaksızın yaygınlıkla bulunduğunu söyleyebiliriz.

HBeAg negatif ve pozitif hastalar arasında, bazal kor gen mutasyonunun coğrafi olarak farklı dağılıma sahip olabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte HBV genotiplerinin, bazal kor mutasyonlarının meydana gelmesi ile bağlantısı göz önünde bulundurulduğunda, yaptığımız çalışmanın, tek bir genotip ile yansıtılan homojen hasta popülasyonunda değerlendirilmiş olması oldukça önemlidir.

Birden fazla gen bölgesinde görülen mutasyonlar ise oldukça yaygındır. Bir örnekte, aynı anda birden fazla alanda (1753/1762/1764/1896) görülen mutasyon birlikteliğine, HBeAg negatif olanlarda (%32.4), HBeAg pozitiflerden (%0) anlamlı derecede fazla rastlanmıştır ( $P < 0.001$ ). İlgili gen bölgelerinde yüksek heterojenite immun yanıtın aracılık ettiği hastalığın yüksek aktivitesi ile bağlantılı olabileceğinden, muhtemelen bu mutasyon birlikteliğinin HBeAg negatif kronik enfekte hastalarda bir anlama sahip olabileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda oldukça yüksek oranda tespit ettiğimiz prekor mutanti HBV izolatları sebebiyle, daha önceki klinik çalışmalara istinaden, interferon tedavisine gösterebilecekleri direnç sebebi ile, kronik HBV'nin doğal seyri sırasında, prekor mutanti HBV'nin prevalan suş olarak seçilmeden önce en kısa sürede tedavi edilmesi gerektiği düşüncesindeyiz. HBeAg negatif hastalarda hiç nadir olarak görülmeyen bu mutasyonlar nedeniyle, varyant HBV'lerinin varlığından klinisyenlerin haberdar olması gerekmektedir.

Yaptığımız bu çalışmada, örneklerden bir tanesinde, bazal kor gen bölgesinde 1763-1770. nt'ler arasında görülen 8 bp'lik "GGTCTTTG" delesyonu tespit edilmiştir. Çok sık rastlanmayan bu delesyon mutasyonlarının virusun davranışına, immun yanıtı olan etkisinin ve virusun moleküler patolojisinin ortaya çıkarılması için daha ileri *in vitro* çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Ülkemizde bazal kor promoter, prekor ve kor gen mutasyonları ile ilgili olarak oldukça sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Yaptığımız bu çalışma ile ülkemizdeki HBV'nün bazal kor/ prekor gen bölgesindeki genetik heterojenitenin gösterilmesinde oldukça değerli bilgiler sağlanmıştır. Çalışmaların bulguları, ülkemizde, sınırlı bir

coğrafi bölge olan Mersin ilinde oldukça detaylı mutasyon paternlerinin dağılımını içermesinden dolayı, ileride bu doğrultuda gerçekleştirilecek olan çalışmalara ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Zhu R, Zhang HP, Yu H, Li H, Ling YQ, Hu XQ, Zhu HG.** Hepatitis B virus mutations associated with in situ expression of hepatitis B core antigen, viral load and prognosis in chronic hepatitis B patients. *Pathol Res Pract.* **2008**;204(10):731-742.
2. **Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, Oynsuren T, Mizokami M.** Virological and clinical implication of core promoter C1752/V1753 and T1764/G1766 mutations in hepatitis B virus genotype D infection in Mongolia. *J Gastroenterol Hepatol.* **2008**;23(3):474-481.
3. **Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, Carey W, Brown RS Jr, Luketic VA, Terrault N, Lok AS.** HBV Epidemiology Study Group. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepatology.* **2003**;38(3):619-628.
4. **Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS.** World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepat.* **2002**;9(1):52-61.
5. **Du H, Li T, Zhang HY, He ZP, Dong QM, Duan XZ, Zhuang H.** Correlation of hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations in basal core promoter/precore with clinical features of chronic HBV infection. *Liver Int.* **2007**;27(2):240-246.
6. **Ozgenç O, Ozacar T, Erensoy S, Inan N, Ari A, Kuruuzum Z, Bilgic A.** Clinical significance of basal core promoter and precore mutations in chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology.* **2007**;54(80):2319-2323.
7. **Bozdayi G, Türkyilmaz AR, Idilman R, Karatayli E, Rota S, Yurdaydin C, Bozdayi AM.** Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from Turkish patients with chronic HBV infection. *J Med Virol.* **2005**;76(4):476-481.
8. **Serin MS, Akkiz H, Abayli B, Oksuz M, Aslan G, Emekdas G.** Genotyping of hepatitis B virus isolated from chronic hepatitis B patients in the south of Turkey by DNA cycle-sequencing method. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2005**;53(1):57-60.
9. **Banerjee A, Banerjee S, Chowdhury A, Santra A, Chowdhury S, Roychowdhury S, Panda CK, Bhattacharya SK, Chakravarty R.** Nucleic acid sequence analysis of basal core promoter/precore/core region of hepatitis B virus isolated from chronic carriers of the virus from Kolkata, eastern India: low frequency of mutation in the precore region. *Intervirol.* **2005**;48(6):389-399.

10. **Amini-Bavil-Olyae S, Alavian SM, Adeli A, Sarrami-Forooshani R, Sabahi F, Sabouri E, Tavangar HR, Azizi M, Mahboudi F.** Hepatitis B virus genotyping, core promoter, and precore/core mutations among Afghan patients infected with hepatitis B: a preliminary report. *J Med Virol.* **2006**;78(3):358-364.
11. **Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC.** Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol.* **2008**;80(1):27-46.
12. **Strauss JH, Strauss EG.** *Viruses and Human Disease*, 2<sup>ed</sup>.Ed.,Oxford,UK: Elsevier Academic Press, **2008**:249.
13. **Laoi BN, Crowley B.** Molecular characterization of hepatitis B virus (HBV) isolates, including identification of a novel recombinant, in patients with acute HBV infection attending an Irish hospital. *J Med Virol.* **2008**;80(9):1554-1564.
14. **Liu CJ, Kao JH, Lai MY, Chen PJ, Chen DS.** Precore/core promoter mutations and genotypes of hepatitis B virus in chronic hepatitis B patients with fulminant or subfulminant hepatitis. *J Med Virol.* **2004**;72(4):545-550.
15. **Pawlotsky JM.** The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol.* **2005**;34:125-9.
16. **Choi JW, Ahn SH, Park JY, Chang HY, Kim JK, Baatarkhuu O, Kim do Y, Han KH, Chon CY.** Hepatitis B e antigen-negative mutations in the precore and core promoter regions in Korean patients. *J Med Virol.* **2009**;81(4):594-601.
17. **Ayed K, Gorgi Y, Ayed-Jendoubi S, Aouadi H, Sfar I, Najjar T, Ben Abdallah T.** Hepatitis B virus genotypes and precore/core-promoter mutations in Tunisian patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Infect.* **2007**;54(3):291-297.
18. **Mıstık R, Balık I.** Türkiyede Viral Hepatitlerin Epidemiyolojik Analizi. In: Tekeli E, Balık I (Eds.), *Viral Hepatit. Hepatitle Savaşım Derneği*, İstanbul, **2003**:9-55.
19. **Eroglu C, Leblebicioglu H, Gunaydin M, Turan D, Sunbul M, Esen S, Sanic A.** Distinguishing hepatitis B virus (HBV) genotype D from non-D by a simple PCR. *J Virol Methods.* **2004**;119(2):183-187.
20. **Kreutz C.** Molecular, immunological and clinical properties of mutated hepatitis B viruses. *J Cell Mol Med.* **2002**;6(1):113-143.
21. **Echevarría JM, Avellón A.** Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol.* **2006**;78:36-42.
22. **Chang M.** Hepatitis B virus mutation in children. *Indian J Pediatr.* **2006**;73:803-807.

23. **Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M.** Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol.* **1990**;64(3):1298-1303.
24. **Chauhan R, Kazim SN, Bhattacharjee J, Sakhuja P, Sarin SK.** Basal core promoter, precore region mutations of HBV and their association with e antigen, genotype, and severity of liver disease in patients with chronic hepatitis B in India. *J Med Virol.* **2006**;78(8):1047-1054.
25. **Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH.** Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol.* **1996**;70(9):5845-5851.
26. **Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P.** Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis.* **1999**;179(4):775-782.
27. **Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M.** Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* **1988**;69(10):2575-2583.
28. **Norder H, Hammas B, Löfdahl S, Couroucé AM, Magnius LO.** Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol.* **1992**;73(5):1201-1208.
29. **Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R.** A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol.* **2000**;81(1):67-74.
30. **Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO.** Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol.* **2002**;83(8):2059-2073.
31. **Victoria Fda S, Oliveira CM, Victoria MB, Victoria CB, Ferreira LC.** Characterization of HBeAg-negative chronic hepatitis B in western Brazilian Amazonia. *Braz J Infect Dis.* **2008**;12(1):27-37.
32. **Alvarado-Esquivel C, Sablon E, Conde-González CJ, Juárez-Figueroa L, Ruiz-Maya L, Aguilar-Benavides S.** Molecular analysis of hepatitis B virus isolates in Mexico: predominant circulation of hepatitis B virus genotype H. *World J Gastroenterol.* **2006**;12(40):6540-6545.
33. **Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H, Wright TL.** A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol.* **2004**;2(2):87-106.
34. **Thakur V, Gupta RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK.** Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol.* **2002**;17(2):165-170.

35. **Ozdemir FT, Duman D, Ertem D, Avşar E, Eren F, Ozdoğan O, Kalayci C, Aslan N, Bozdayi AM, Tözün N.** Determination of hepatitis B genotypes in patients with chronic hepatitis B virus infection in Turkey. *Turk J Gastroenterol.* **2005**;16(4):183-187.
36. **Yalcin K, Degertekin H, Bahcecioglu IH, Demir A, Aladag M, Yildirim B, Horasanli S, Ciftci S, Badur S.** Hepatitis B virus genotype D prevails in patients with persistently elevated or normal ALT levels in Turkey. *Infection.* **2004**;32(1):24-29.
37. **Sunbul M, Leblebicioglu H.** Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol.* **2005**;11(13):1976-1980.
38. **Sertozy RY, Erensoy S, Pas S, Ozacar T, Niesters H.** Restriction fragment length polymorphism analysis and direct sequencing for determination of HBV genotypes in a Turkish population. *New Microbiol.* **2008**;31(2):189-194.
39. **Aksoy A, Ozdarendeli A.** Genotyping of hepatitis B virus by restriction enzyme analysis. *Mikrobiyol Bul.* **2006**;40(3):215-223.
40. **Leblebicioglu H, Eroglu C.** Members of the Hepatitis Study Group. Acute hepatitis B virus infection in Turkey: epidemiology and genotype distribution. *Clin Microbiol Infect.* **2004**;10(6):537-541.
41. **Kaya S, Cetin ES, Aridogan BC, Onal S, Demirci M.** Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among HBV carriers in Isparta. *Iran Biomed J.* **2007**;11(1):59-63.
42. **Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P.** Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods.* **1998**;72(2):163-174.
43. **Zeng GB, Wen SJ, Wang ZH, Yan L, Sun J, Hou JL.** A novel hepatitis B virus genotyping system by using restriction fragment length polymorphism patterns of S gene amplicons. *World J Gastroenterol.* **2004**;10(21):3132-3136.
44. **Hamatake RK, Lau JYN.** *Hepatitis B and D Protocols: Volume 1: Detection, Genotypes, and Characterization.* 1<sup>st</sup> Ed., Totowa, NJ: Humana Press, **2004**.
45. **Lindh M, Andersson AS, Gusdal A.** Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis.* **1997**;175(6):1285-1293.
46. **Yokosuka O, Arai M.** Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. *Med Mol Morphol.* **2006**;39(3):113-120.
47. **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.* **1994**;68(12):8102-8110.



48. **Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR.** The small envelope protein is required for secretion of a naturally occurring hepatitis B virus mutant with pre-S1 deleted. *J Virol.* **1997**;71(7):5449-5454.
49. **Chan HL, Hussain M, Lok AS.** Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology.* **1999**;29(3):976-984.
50. **The incident investigation team and others:** Transmission of hepatitis B to patients from four infected surgeons without hepatitis B e antigen. *New Engl J Med.* **1997**;336:178-184.
51. **Von Weizsacker F, Pult I, Geiss K, Wirth S, Blum HE.** Selective transmission of variant genomes from mother to infant in neonatal fulminant hepatitis. *Hepatology.* **1995**;21:8-13.
52. **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.* **1995**;22(6):1641-1647.
53. **Li JS, Tong SP, Wen YM, Vitvitski L, Zhang Q, Trépo 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.* **1993**;67(9):5402-5410.
54. **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.* **1994**;91(9):4077-4081.
55. **Lok AS, Akarca US, Greene S.** Predictive value of precore hepatitis B virus mutations in spontaneous and interferon-induced hepatitis B e antigen clearance. *Hepatology.* **1995**;21(1):19-24.
56. **Tsai SL, Chen MH, Yeh CT, Chu CM, Lin AN, Chiou FH, Chang TH, Liaw YF.** Purification and characterization of a naturally processed hepatitis B virus peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest.* **1996**;97(2):577-584.
57. **Harper D.R.** *Molecular Virology: A Medical Perspectives Book*, 1<sup>st</sup>.Ed., UK: BIOS Scientific Publishers Limited, **1994**.
58. **Durmaz R.** *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul*, **2001**.
59. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Book 2, 2<sup>ed</sup>. Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
60. PCR-Symposium. Erişim: <http://derma.klinikum.unimuenchen.de/Alte%20Seiten/PCRsymposium.htm>. Erişim tarihi: 10.01.2009.

61. **Serin M.S.** Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR). Aslan G, Emekdaş G, Köksal F, Serin M.S. *IV. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu: Uygulamalı Moleküler Kurs Kitabı*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 51, Mersin, **2005**:37-52.
62. Advances in the diagnosis of sexually transmitted diseases caused by bacteria. Erişim: <http://www.roche.com/pages/facets/1/chlamyde.htm>. Erişim tarihi: 05.01.2009.
63. **Taylor G.R.** Polymerase chain reaction: basic principles and automation. İn: McPherson M.J, Quirke P, Taylor G.R. *PCR Volume 1: A Pratical Approach*, 1<sup>st</sup> Ed. New York: Oxford University Press, **1991**:1-14.
64. **McPherson M.J, Moller S.G.** PCR: The Basics from Bacgraund to Bench, 1<sup>st</sup>. Ed., UK: BIOS Scientific Publishers Limited, **2000**.
65. Erişim: [http://www.wisconsinlab.com/nested\\_pcr.htm](http://www.wisconsinlab.com/nested_pcr.htm). Erişim tarihi: 12.01.2009.
66. **Tekeli A.** Moleküler Tiplendirme Metodları. In: Tekeli A, Ustaçelebi Ş. *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar*. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, **2006**:245-258
67. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manuel, Book 1, 2<sup>ed</sup>.Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
68. **Ban M.** DNA Sequencing and PCR Methods. *Techniques in Neuroscience*. **2006**;5(6):18-19.
69. **Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S.** *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. Güneş Kitabevi, Ankara, **2004**.
70. **Shendure J, Mitra RD, Varma C, Church GM.** Advanced Sequencing Technologies: Methods and Goals. *Nature Reviews/Genetics*. **2004**;5:335-344.
71. Erişim: <http://www.users.rcn.com/.../D/DNAsequencing.html>. Erişim tarihi: 12.01.2009.
72. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manuel, Book 3, 2<sup>ed</sup>.Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
73. **Cho SW, Hahm KB, Kim JH.** Reversion from precore/core promoter mutants to wild-type hepatitis B virus during the course of lamivudine therapy. *Hepatology*. **2000**;32(5):1172-1174.
74. **Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis-Version 4. Erişim: [www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net). Erişim tarihi: 10.02.2009.
75. **Kumar S, Tamura K, Nei M.** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. **2004**;5(2):150-163.

76. **Abbas Z, Muzaffar R, Siddiqui A, Naqvi SA, Rizvi SA.** Genetic variability in the precore and core promoter regions of hepatitis B virus strains in Karachi. *Gastroenterol.* **2006**;6:20.
77. **Bahramali G, Sadeghizadeh M, Amini-Bavil-Olyae S, Alavian SM, Behzad-Behbahani A, Adeli A, Aghasadeghi MR, Amini S, Mahboudi F.** Clinical, virologic and phylogenetic features of hepatitis B infection in Iranian patients. *World J Gastroenterol.* **2008**;14(35):5448-5453.
78. **Du H, Li T, Zhang HY, He ZP, Dong QM, Duan XZ, Zhuang H.** Correlation of hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations in basal core promoter/precore with clinical features of chronic HBV infection. *Liver Int.* **2007**;27(2):240-246.
79. **Banerjee A, Datta S, Chandra PK, Roychowdhury S, Panda CK, Chakravarty R.** Distribution of hepatitis B virus genotypes: phylogenetic analysis and virological characteristics of genotype C circulating among HBV carriers in Kolkata, Eastern India. *World J Gastroenterol.* **2006**;12(37):5964-5971.
80. **Yoo BC, Park JW, Kim HJ, Lee DH, Cha YJ, Park SM.** Precore and core promoter mutations of hepatitis B virus and hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Korea. *J Hepatol.* **2003**;38(1):98-103.
81. **Bozdayi AM, Bozkaya H, Türkyilmaz A, Aslan N, Verdi H, Kence A, Uzunalimoglu O.** Polymorphism of precore region of hepatitis B virus DNA among patients with chronic HBV infection in Turkey. *Infection.* **1999**;27(6):357-360.
82. **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.* **1993**;105(3):845-850.
83. **Laras A, Koskinas J, Avgidis K, Hadziyannis SJ.** Incidence and clinical significance of hepatitis B virus precore gene translation initiation mutations in e antigen-negative patients. *J Viral Hepat.* **1998**;5(4):241-248.
84. **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.* **1991**;324(24):1699-1704.
85. **Chan HL, Leung NW, Hussain M, Wong ML, Lok AS.** Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Hong Kong. *Hepatology.* **2000**;31(3):763-768.
86. **Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS.** Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology.* **2003**;124(2):327-334.
87. **Bozdayi AM, Bozkaya H, Türkyilmaz A, Aslan N, Verdi H, Kence A, Uzunalimoglu O.** Polymorphism of precore region of hepatitis B virus DNA among patients with chronic HBV infection in Turkey. *Infection.* **1999** ;27(6):357-360.

88. **Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K, Yoshizawa H, Mishiro S.** The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection. *J Gen Virol.* **1995**;76(12):3159-3164.
89. **Laskus T, Rakela J, Nowicki MJ, Persing DH.** Hepatitis B virus core promoter sequence analysis in fulminant and chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* **1995**;109(5):1618-1623.
90. **Bozdayi AM, Bozkaya H, Türkyilmaz AR, Sariodlu M, Cetinkaya H, Karayalçin S, Yurdaydin C, Uzunaliimoğlu O.** Nucleotide divergences in the core promoter and precore region of genotype D hepatitis B virus in patients with persistently elevated or normal ALT levels. *J Clin Virol.* **2001**;21(1):91-101.
91. **Fang ZL, Ling R, Wang SS, Nong J, Huang CS, Harrison TJ.** HBV core promoter mutations prevail in patients with hepatocellular carcinoma from Guangxi, China. *J Med Virol.* **1998**;56(1):18-24.
92. **Tsai WL, Lo GH, Hsu PI, Lai KH, Lin CK, Chan HH, Chen WC, Cheng JS, Liu YC, Huang TS, Ger LP, Lin HH.** Role of genotype and precore/basal core promoter mutations of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B with acute exacerbation. *Scand J Gastroenterol.* **2008**;43(2):196-201.
93. **Moriyama K.** Reduced antigen production by hepatitis B virus harbouring nucleotide deletions in the overlapping X gene and precore-core promoter. *J Gen Virol.* **1997**;78(6):1479-1486.
94. **Veazjalali M, Norder H, Magnius L, Jazayeri SM, Alavian SM, Mokhtari-Azad T.** A new core promoter mutation and premature stop codon in the S gene in HBV strains from Iranian patients with cirrhosis. *J Viral Hepat.* **2009**;16(4):259-264.
95. **Ahmed CS, Wang ZH, Bin Z, Chen JJ, Kamal M, Hou JL.** Hepatitis B virus genotypes, subgenotypes, precore, and basal core promoter mutations in the two largest provinces of Pakistan. *J Gastroenterol Hepatol.* **2009**;24(4):569-573.
96. **Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, Lai MY, Huang WL, Kao JH, Chen DS.** Role of hepatitis B virus precore/core promoter mutations and serum viral load on noncirrhotic hepatocellular carcinoma: a case-control study. *J Infect Dis.* **2006**;194(5):594-599.
97. **Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WG.** Precore/basal core promoter mutants and hepatitis B viral DNA levels as predictors for liver deaths and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* **2006**;12(41):6620-6626.
98. **Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WG.** Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers. *Liver Int.* **2007**;27(10):1356-1363.
99. **Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, Wang LY, Lu SN, You SL, Chen DS, Liaw YF, Chen CJ.** REVEAL-HBV Study Group. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* **2008**;100(16):1134-1143.

- 100. Tanaka Y, Mukaide M, Orito E, Yuen MF, Ito K, Kurbanov F, Sugauchi F, Asahina Y, Izumi N, Kato M, Lai CL, Ueda R, Mizokami M.** Specific mutations in enhancer II/core promoter of hepatitis B virus subgenotypes C1/C2 increase the risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* **2006**;45(5):646-653.
- 101. Parekh S, Zoulim F, Ahn SH, Tsai A, Li J, Kawai S, Khan N, Trépo C, Wands J, Tong S.** Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Virol.* **2003**;77(12):6601-6612.

## EKLER

**EK-1.** Tüm örneklerin laboratuvar çalışmaları sonucu. Tabloda hastaların yaş, cinsiyet, ALT-AST düzeyleri, HBV DNA düzeyleri, serum HBV belirteçleri (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc, anti-HBe, HBeAg), bazal kor prekor gen bölgesi dizi analizi ve genotip değerlendirilmesi gösterilmektedir. Bazal kor/ prekor mutasyonlarının değerlendirmesinde her hasta için üst hücrede bazal kor 1753. nt ve 1762/1764 nt'ler, alt hücrede prekor 1896. nt mutasyon sonucu verilmiştir. Tablo'da öncelikle HBeAg negatif olan örneklerin sonuçları, daha sonrasında da HBeAg pozitif olan örneklerin sonuçları sıralanmıştır. Değerlendirmede kullanılan (+); mutasyon olduğu, (Ø); mutasyon olmadığını göstermektedir.

Sıra No	Hasta No	Yaş	Cinsiyet	ALT (E: <31 U/L) (Ç: <27 U/L)	AST (E: <32 U/L) (Ç: <29 U/L)	HBV DNA (6-110.0000.000 IU/mL)	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	Anti- HBe	HBeAg	Bazal kor / prekor gen bölgesinin DNA dizi analizi Sonuçları	Pre-S PCR/RFLP patern		Genotip
													AvaII	MboI	
<b>Bazal kor/prekor DNA dizi analizi okunamayanlar</b>															
1	2-AÇ	16	E	25	30	53.400	+	+	IgM (-) IgG (+)	-	+	Okunamadı	—	306/89/51	Genotip D
2	37-ZAA	49	E	51	60	46.500	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	Okunamadı	—	306/89/51	Genotip D
3	90-İT	27	E	52.97	26.49	9180	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	Okunamadı	PCR (—)		
4	116-AK	27	E	15.4	28	15.300	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	Okunamadı	—	306/89/51	Genotip D
5	117-MA	28	E	32.9	83	1.490	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	Okunamadı	—	306/89/51	Genotip D
<b>HBeA negatif / Ø-Ø-Ø</b>															
6	1-NK	42	K	15.6	21.19	33600	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	— —	—	306/89/51	Genotip D
<b>HBeA negatif / +-+-+</b>															
7	5-NG	52	K	16.29	16.37	<6	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753A ve AGG- 1762/1764-TGA TGG-1896.nt-TAG	—	306/89/51	Genotip D
8	9-İÜ	55	E	15.8	26	2050	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGA TGG-1896.nt-TAG	—	357/306/89/51	Genotip D

**EK-1 devam.** Tüm örneklerin laboratuvar çalışmaları sonucu.

9	11-GS	46	K	35.46	31.97	15	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGA	—	306/88/52	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
10	31-MY	66	E	58.88	54.37	22.600	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753G ve AGG- 1762/1764-AGT	PCR'ı çift band		
												TGG-1896.nt-TAG			
11	20-AA	49	K	77.73	65.85	47.100	+	-	IgM (+) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGA	—	357/306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
12	36-HA	26	E	17	34.3	166.000	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGA	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
13	49-MA	29	E	14	18	4.250	+	+	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753W ve AGG- 1762/1764-TGR	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
14	47-ARK	52	E	12	27	<6	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGA	PCR (—)		
												TGG-1896.nt-TAG			
15	67-FG	39	K	32	52	1.440.000	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGA	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
16	77-MG	59	E	20.78	31.08	<6	+	-	IgM (+) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGA	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
17	115-SM	41	K	18	29.9	2650	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG- 1762/1764-AGR	—	357/306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			

**EK-1 devam.** Tüm örneklerin laboratuvar çalışmaları sonucu.

<b>HBeA negatif / +-+Ø</b>															
18	7-ES	45	K	10.79	14.48	98	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG-1762/1764-TGA —	—	306/89/51	Genotip D
19	12-NÖ	38	E	19	22	43.9	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753R ve AGG-1762/1764-TGA —	—	306/89/51	Genotip D
20	33-FD	41	K	17	60	116	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG-1762/1764-TGA —	—	306/89/51	Genotip D
21	83-SK	40	E	14.1	33.7	47.900	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG-1762/1764-TGA —	300/146	306/89/51	Genotip D
22	87-IA	58	K	14.64	17.2	6780	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753C ve AGG-1762/1764-TGA —	—	306/89/51	Genotip D
23	102-SM	50	E	16	35.1	Negatif	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753G ve AGG-1762/1764-AGT —	PCR (—)		
24	111-IY	46	E	39.3	31.5	590	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753W ve AGG-1762/1764-TGA —	—	306/89/51	Genotip D
<b>HBeA negatif / Ø-Ø-+</b>															
25	29-RB	55	E	28.58	25.1	375	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	— TGG-1896.nt-TAG	—	357/306/89/51	Genotip D
25	45-BÖ	56	K	43.22	27.9	8.870	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	— TGG-1896.nt-TAG	—	306/89/51	Genotip D
27	58-Nİ	34	E	25.84	29.33	40	+	+	IgM (-) IgG (+)	+	-	— TGG-1896.nt-TAG	—	357/306/89/51	Genotip D



**EK-1 devam.** Tüm örneklerin laboratuvar çalışmaları sonucu.

28	80-CÇ	56	E	475.2	253.8	3.560	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	—	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
29	86-OG	29	E	27.6	28.2	1160	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	—	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
30	96-SK	30	E	322.91	144.04	72.100	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	—	—	306/88/---	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
31	99-NÖ	24	K	75.26	42.03	<6	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	—	—	306/88/52	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
32	100-DID	45	K	67.81	43.83	464	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	—	NS PCR ürünü		
												TGG-1896.nt-TAG			
33	110-ŞÇ	31	K	25.96	30.88	28.000	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	—	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
<b>HBeA negatif / Ø-++</b>															
34	46-HY	43	E	29	64	4870	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	AGG-1762/1764-AGT	300/146	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
35	69-KE	66	K	43	78.3	847	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	AGG-1762/1764-AGA	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
36	75-MA	55	K	16	23.2	116	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	AGG-1762/1764-AGT	—	357/306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			

**EK-1 devam.** Tüm örneklerin laboratuvar çalışmaları sonucu.

37	85-ÖG	55	E	41.06	39.75	2720	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	AGG-1762/1764-AGR	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
<b>HBeA negatif / +-Ø-+</b>															
38	89-SS	44	K	42.65	34	10.000.0000	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	T1753A	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			
<b>HBeA negatif / Ø-+-Ø</b>															
39	121-MG	49	E	32.6	34.5	19	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	-	AGG-1762/1764-AGT	—	357/306/89/51	Genotip D
												—			
<b>HBeA pozitif / Ø-+-Ø</b>															
40	27-KY	31	E	13	28	38.400.000	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	AGG-1762/1764-WGR	—	306/89/51	Genotip D
												—			
<b>HBeA pozitif / Ø-Ø-+</b>															
41	32-SK	24	K	19	31	229.000	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	—	PCR'ı çift band		
												TGG-1896.nt-TRG			
42	81-ÜÇ	17	E	49.56	25.54	20.900	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	—	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TRG			
<b>HBeAg pozitif/ Ø- 1763-1770.DEL-+</b>															
43	39-MT	34	E	15	21	10.200	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	1763-1770.DEL	—	306/89/51	Genotip D
												TGG-1896.nt-TAG			

**EK-1 devam.** Tüm örneklerin laboratuvar çalışmaları sonucu.

<b>HBeA pozitif / +-+Ø</b>															
44	35-NÜ	39	E	24	25	5.170.000	+	-	IgM (+) IgG (+)	-	+	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGA	PCR'ı çift band		
												—			
45	4-NE	39	E	98.6	57.5	6320	+	-	IgM (+) IgG (+)	-	+	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGA	—	306/89/51	Genotip D
												—			
46	38-HA	29	K	191.94	140.45	331.000	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGA	—	306/89/51	Genotip D
												—			
47	41-ZÖ	53	E	75.42	51.64	157.000	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGA	300/146	306/89/51	Genotip D
												—			
48	61-AÖ	19	E	25.59	22.22	6.770	+	-	IgM (-) IgG (+)	+	+	T1753G ve AGG- 1762/1764-AGT	—	306/89/51	Genotip D
												—			
49	103-AŞ	46	E	22.93	27.34	52.500	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	T1753C ve AGG- 1762/1764-TGG	300/146	306/89/51	Genotip D
												—			
<b>HBeA pozitif / Ø-Ø-Ø</b>															
50	60-EK	22	K	40.13	30.03	26400	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	—	—	306/89/51	Genotip D
												—			
51	68-AY	37	E	660.71	319	27.300.000	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	değişik yerlerde insersiyon var	~300 bp uzunluğunda PCR ürünü		

**EK-1 devam.** Tüm örneklerin laboratuvar çalışmaları sonucu.

52	72-ŞD	34	K	25.7	25.4	16.600	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	-	-	306/89/51	Genotip D
												-			
53	76-MK	20	E	24.9	33.1	789.000	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	-	-	306/89/51	Genotip D
												-			
54	93-HÖ	26	K	79.21	46	1.300.000	+	-	IgM (-) IgG (+)	-	+	-	-	306/89/51	Genotip D
												-			

## ÖZGEÇMİŞ

01.11.1979 tarihinde Mersin ilinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Mersin’de tamamladı. 1996 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde lisans eğitimine başladı ve 2001 yılında mezun oldu. 2003 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2004 yılında araştırma görevlisi kadrosuna atandı. 2006 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.