ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KRONİK HEPATİT DELTALI HASTALARIN İNTERFERON TEDAVİSİ SÜRESİNCE, YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİYLE VİRAL GENOM ÇEŞİTLİLİĞİ ve TEDAVİ YANITININ ARAŞTIRILMASI

Ayşe Nur Midilli

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı

Eylül

2020

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Ayşe Nur Midilli

İmzası

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Kronik Hepatit Deltalı Hastaların İnterferon Tedavisi Süresince, Yeni Nesil Dizileme Teknolojisiyle Viral Genom Çeşitliliği ve Tedavi Yanıtının Araştırılması

Ayşe Nur Midilli

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı

Hepatit Delta virüsü (HDV), sağlıklı karaciğer hücrelerinde (hepatosit) enfeksiyona neden olur. Kronik HDV enfeksiyonunun tedavi olanağı sınırlıdır ve çoğunlukla ilerleyen siroz ve artan mortalite oranlarıyla karakterizedir. Bu enfeksiyonun birincil tedavi seçeneği olarak en az 1 sene süreyle uygulanan "*peg-interferon*" kullanılmaktadır. Tedaviye devam edilip edilmeyeceğine ise tedavinin 6.ayında HDV RNA değerlendirilmesi ile karar verilmektedir. Çalışmamızda HDV ile enfekte hastaların interferon tedavilerinin 0., 24., 48., 96, ve 200. haftalarında alınan farklı serum örneklerinden elde edilen Hepatit Delta virüs havuzundaki viral varyantların yüksek duyarlılıkla tespit edilmesi ve tedavi yanıtının tedaviye yanıt veren, nüks eden ve tedaviye yanıt vermeyen hastalar arası incelenmesi amaçlanmıştır. Ortaya çıkan varyasyon profilleri ile hastalardaki klinik seyirin karşılaştırılması ile varyasyonlarla hastalık arasında ilişkiyi araştırmak çalışmanın amacıdır. Tedavi öncesi, sırası ve/veya sonrasındaki viral varyasyon profillerinin belirlenmesi, ve viral tedavi altındaki evrimsel sürecin araştırılması amaçlanmıştır. Yeni nesil dizileme platformları, klonal amplifikasyon ile derin dizileme yaparak minör allelleri bile kaçırmadığı için virüs bazlı çalışmalarda önemlidir. Bu sebeple çalışmamızda "*Illumina, Miseq*" yeni nesil dizileme platformu kullanılmıştır. Çalışma süresince toplam 13 hastanın farklı tarihlerdeki 40 adet serum örneğinde dizileme yapılmıştır. HDV viral genomu her serum numunesinde 5 farklı amplifikasyonla tüm genom olarak çoğaltılmış, toplamda 200 farklı amplifikasyon yapılmıştır. Tedaviye yanıt verenler ile yanıt vermeyen veya nüks eden hastalardaki varyasyonlar karşılaştırıldığında; 266, 268, 319, 927 ve 928 nolu nükleotitlerde belirgin farklılıklar gözlenmiştir. 927. ve 928. nükleotitlerin S-HDAg ve L-HDAg üzerinde bulunmasından ötürü kodlanan amino asitlerde de tedaviye yanıt veren hastalar, nüks eden ve yanıt vermeyen ile karşılaştırıldığında belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Tedaviye yanıt verenler ile nüks edenler tek başına karşılaştırıldığında ise bu nükleotidlere ek olarak 269, 749. nükleotidde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Dolayısıyla bu nükleotitler tedavi seyrini anlamak için önemli olabilir. Ayrıca her 3 grup karşılaştırıldığında viral genomun 426-429 numaralı bazlarını içeren hiper değişken bölge üzerinde bulunup, otokatalitik kırılma bölgesinin hemen başlangıcında bulunan bölgede 3 farklı hasta grubunda farklı paternler gözlenmiştir.

2020, 113 sayfa

Anahtar kelimeler: Hepatit Delta Virüs, İnterferon, Yeni Nesil Dizileme, Illumina-Miseq

ABSTRACT

MSc Thesis

Viral Genome Diversity and Treatment Response During Interferon Treatment of Patients with Chronic Hepatitis Delta: Deep sequencing by Next Generation Sequencing Technology

Ayşe Nur Midilli

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. A. Mithat Bozdayı

Chronic Delta Hepatitis (CDH) is defined as the most aggressive and progressive viral hepatitis, which is caused by the Hepatitis Delta Virus (HDV) which leads to infection in healthy liver cells. The success of treatment for CDH infection is usually limited. CDH is characterized by the growing cirrhosis and enhanced rate of mortality. The main established management of CDH consists of peg-interferon which has to be administered for a duration of at least 1 year. On treatment, 6 month HDV RNA assessment may give clues as to whether to stop treatment at 1 year or continue beyond 1 year. We investigated the viral genome diversity and treatment response during interferon treatment among responders, relapsers, and non-responder patients. By this means, it is aimed to detect viral variation profile prior to, during, and after the treatment and to investigate the evolutionary process under viral treatment. Another purpose of the present study is to investigate the relationship between variation patterns and the disease by comparing the variation profiles and clinical course of the disease in patients. The next-generation sequencing technologies is crucial on the viral-based studies due to the performing clonal amplification and deep sequencing. Departing from that reasoning, we made use of "Illumina, Miseq" next-generation sequencing. In this research, a total of 40 distinct serum samples of interferon treated 13 CDH patients at weeks -0, 24, 48, 96, 200, were obtained and the viral variants in hepatitis delta virus pool were analyzed with high precision. At each serum sample, the HDV viral genome was multiplied as a whole with 5 distinct amplifications, amounting to 200 distinctive amplifications. Differences were observed in positions 266, 268, 269, 568, 927 and 928, when variations in responders, non-responders and relapsers patients. Also, variations occurring on nucleotide sites of 927 and 928 which stand in S-HDAg and L- HDAg were observed different amino acids compared with responders and non-responder or relapser CDH patients. An additional significant difference in position 749 was observed when responder vs. relapser patients were compared. Furthermore, in the region covering 426-429 positions on the HDV genome, located at the beginning of the autocatalytic break zone, and stand above the hypervariable region, distinct patterns are detected in the 3 patient groups. Thus, these nucleotides might be decisive so as to understand the course of the infection.

2020, 113 pages

Keywords: Hepatitis Delta Virus, Interferon, Next Generation Sequencing, Illumina-Miseq

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde üç yıl boyunca değerli bilgilerini paylaşan başta saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Mithat Bozdayı'ya, her fırsatta desteklerini ve yardımlarını hissettiğim bugüne kadar en büyük destekçilerim kıymetli aileme, bilimin ve bilim insanının destekçisi olan TÜBİTAK'a ve TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Programına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN i

ONAY ii

ÖZET iii

ABSTRACT iv

TEŞEKKÜR v

ŞEKİLLER DİZİNİ ix

ÇİZELGELER DİZİNİ xii

SİMGELER DİZİNİ xiii

1. GİRİŞ 1

2. KURAMSAL TEMELLER 3

2.1. HEPATİT DELTA VİRÜSÜ **3**

2.2. HDV EPİDEMİYOLOJİSİ **5**

2.3. HDV GENOTİPİ **5**

2.4. VİRAL HETEROJENİTE **6**

2.5. HDV VİRYONU ve YAPISI **7**

2.5.1. HDV GENOMU **8**

2.5.2. HDV RİBOZİM BÖLGESİ **8**

2.5.3. HDV ANTİJENİ **9**

2.5.4. HBV ZARF PROTEİNLERİ **11**

2.6. HDV REPLİKASYONU **12**

2.7. HDV PATOGENEZİ **12**

2.8. HDV YAŞAM DÖNGÜSÜ **13**

2.9. HDV'DE KLİNİK ÖZELLİKLER ve TEŞHİS **15**

2.10. KRONİK HEPATİT DELTA'DA TEDAVİ SEÇENEKLERİ **16**

2.10.1. İNTERFERON TEDAVİSİ 17

2.10.2. KHD TEDAVİSİNDE YENİ YAKLAŞIMLAR....18

3. GEREKÇE VE AMAÇ....23

4. MATERYAL VE YÖNTEM....24

4.1. MATERYAL....24

4.1.1. HASTA SERUMLARI....24

4.1.2. KİMYASALLAR....24

4.1.3. KİTLER VE ENZİMLER....24

4.1.4. CİHAZLAR....26

4.1.5. STANDART TAMPON VE ÇÖZELTİLER....26

4.1.6. PRİMERLER....26

4.2. YÖNTEM....29

4.2.1. GÖNÜLLÜ NİTELİĞİ....29

4.2.2. HASTA SERUMUNDAN VİRAL RNA EKSTRAKSİYONU....31

4.2.3. cDNA SENTEZİ....32

4.2.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)....33

4.2.5. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ....35

4.2.6. PCR TEMİZLEME İŞLEMİ....37

4.2.7. DNA MİKTARINI ÖLÇME....37

4.2.8. YENİ NESİL DİZİLEME....38

5. ARAŞTIRMA BULGULARI....41

5.1. NÜKS ETMİŞ VE YANIT VERMEMİŞ HASTALARIN, YANIT VERMİŞ HASTALARLA KARŞILAŞTIRILMASI....41

5.2. NÜKS ETMİŞ HASTALARIN, YANIT VERMİŞ HASTALARLA KARŞILAŞTIRILMASI....45

5.3. DİĞER PATTERNLER....46

5.4. TÜM GENOMDA OLASI ÖNEMLİ TEK NOKTA POLİMORFİZMLERİ (TNP)48

5.5. TÜM GENOMDA OLASI ÖNEMLİ AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ 54

5.6. DİĞER AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ 62

5.7. TÜM GENOMDA OLASI ÖNEMLİ KODON DEĞİŞİMLERİ 65

5.8. RİBOZİM BÖLGESİNDE MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLER 69

5.8.1. RİBOZİM BÖLGESİNDE MEYDANA GELEN AMİNO ASİT VE KODON DEĞİŞİMLERİ 74

6. TARTIŞMA VE SONUÇ 84

6.1. TARTIŞMA 84

6.1.1. HİPER DEĞİŞKEN BÖLGEDE MEYDANA GELEN TNP'LERİN DEĞERLENDİRİLMESİ 84

6.1.2. S-HDAG VE L-HDAG ÜZERİNDE GERÇEKLEŞEN TNP'LERİN DEĞERLENDİRİLMESİ 85

6.1.3. RİBOZİM BÖLGESİNDE MEYDANA GELEN TNP'LERİN DEĞERLENDİRİLMESİ 86

6.2. SONUÇ 86

EKLER 96

EK1: Tüm genom dizilerinin işaretleme rehberi 96

ÖZGEÇMİŞ 97

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR 98

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Perez Vargaz ve ark. tarafından yapılan çalışmada bulunan sonuçlar (4) 4

Şekil 2.2. HDV'nin dünyadaki prevelansı (12).....6

Şekil 2.3. HDV viryonu ve Hepatit B virüsü 7

Şekil 2.4. Delta ribozim yapısı; A: karmaşık, iç içe, çifte yalancı ilmikli (double pseudoknot) ve B: HDV ribozim şematik kristal yapısı (22) 9

Şekil 2.5. Hepatit delta virüsünün RNA genomu; A: delta ribozim motifleri (δRz) ve ilgili kırılma bölgeleri gösterilmiştir (25) B: Tahmin edilen HDV ikincil yapısı (26).....9

Şekil 2.6. S-HDAg ve L-HDAg üretimi (19).....10

Şekil 2.7. HBV zarf proteinleri yapısı 11

Şekil 2.8. HBV'nin yüzey proteinlerinin yapısı (34) 12

Şekil 2.9. HDV yaşam döngüsü (41).....14

Şekil 2.10. IFN ve peg-IFN yapısı (59) 17

Şekil 4.1. Primerlerle çoğaltılmış amplikonların ve önemli genlerin HDV genomu üzerindeki yerini gösteren şematik resim (Snapgene Software, GSL Biotech; www.snapgene.com).....29

Şekil 4.2. Golden Helix-Genome Browser TNP analizi.....40

Şekil 5.1. Çoğaltılmış amplikonların doğrulanması için PZR ürünlerinin 2X agaroz jel elektroforezi görüntüsü ve QX174 DNA Marker 41

Şekil 5.2. Nüks etmiş ve yanıt vermeyen hastaların, yanıt veren hastalar ile karşılaştırılması 42

Şekil 5.3. 927. ve 928. nükleotitlerde meydana gelen değişimlerin sebep olduğu amino asit değişimleri.....43

Şekil 5.5. Nüks etmiş hastalar ile yanıt veren hastaların karşılaştırılması.....46

Şekil 5.6. Hiper değişken bölgede meydana gelen değişimler 47

Şekil 5.7. 202 bölgesi nükleotid nokta polimorfizmi 48

Şekil 5.8. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-1 49

Şekil 5.9. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-2 50

Şekil 5.10. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-3 51

Şekil 5.11. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-4 52

Şekil 5.12. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-5 53

Şekil 5.13. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-6 54

Şekil 5.14. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-1 55

Şekil 5.15. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-2 56

Şekil 5.16. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-3 57

Şekil 5.17. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-4 58

Şekil 5.18. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-5 59

Şekil 5.19. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-6 60

Şekil 5.20. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-7 61

Şekil 5.21. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-8 62

Şekil 5.22. Diğer amino asit değişimleri-1 63

Şekil 5.23. Diğer amino asit değişimleri-2 64

Şekil 5.24. Diğer amino asit değişimleri-3 65

Şekil 5.25. Tüm genomda olası önemli kodon değişimleri-1 67

Şekil 5.26. Tüm genomda olası önemli kodon değişimleri-2 68

Şekil 5.27. Tüm genomda olası önemli kodon değişimleri-3 69

Şekil 5.28. Ribozim bölgesinde meydana gelen TNP'ler-1.....71

Şekil 5.29. Ribozim bölgesinde meydana gelen TNP'ler-2.....73

Şekil 5.30. Ribozim bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-1.....74

Şekil 5.31. Ribozim bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-2.....75

Şekil 5.32. Ribozim Bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-3.....76

Şekil 5.33. Ribozim bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-4.....77

Şekil 5.34. Ribozim bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-5.....78

Şekil 5.35. Ribozim bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-6.....79

Şekil 5.36. FOC hastasının serum örneklerinin sürece bağlı değişimlerin incelemesi 81

Şekil 5.37. YS hastasının serum örneklerinde sürece bağlı değişimlerin incelenmesi 82

ÇiZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. HDV enfeksiyonunun ko-enfeksiyon ve süper-enfeksiyon durumunda klinik özellikleri arasındaki karşılaştırma.....15

Çizelge 4.1. HDV RNA'sı pozitif hastaların dağılımı 24

Çizelge 4.2. Kullanılan kimyasallar ve menşei.....24

Çizelge 4.3. Kullanılan kitler, enzimler ve menşei 25

Çizelge 4.4. Kullanılan cihazlar, marka ve modelleri 26

Çizelge 4.5. Kullanılan tampon ve çözeltiler.....26

Çizelge 4.6. Kullanılan 1. tur primerleri.....27

Çizelge 4.7. Kullanılan 2. tur primerleri.....28

Çizelge 4.8. Araştırmaya dahil olma ve olmama kriterleri.....30

Çizelge 4.9. HDV RNA'sı pozitif 13 hastanın farklı tarihlerdeki viral yükleri (kopya/ml).....30

Çizelge 4.10. 1. tur PZR reaksiyon karışımı ve koşulları.....33

Çizelge 4.11. 2. tur PZR reaksiyon karışımı ve koşulları.....34

Çizelge 4.12. 3. Tur PZR reaksiyon karışımı ve koşulları.....35

Çizelge 4.13. Yükleme boyası için gerekli kimyasallar 36

Çizelge 4.14. TAE tamponu için gerekli kimyasallar 37

SİMGELER DİZİNİ

µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
bp	Baz çifti
ddH_2O	Çift distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EtBr	Etidium bromide
HDAg	Hepatit Delta Antijen
HBV	Hepatit B Virüsü
HCV	Hepatit C Virüsü
HDV	Hepatit Delta Virüsü
IFN	İnterferon
KHD	Kronik Hepatit Delta
L-HDAg	Büyük Hepatit Delta Antijeni
MID	"Multiplex identifier"
NGS	Yeni Nesil Dizileme
PEG-IFN	Pegile İnterferon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferans

RNP	Ribonükleoprotein
RPM	Tur/Dakika
S-HDAg	Küçük Hepatit Delta Antijeni
sn	Saniye
TE	Tris EDTA

1. GİRİŞ

Hepatit D virüsü, ilk olarak 1977 yılında hepatit B ile enfekte, ciddi akut karaciğer hastalığı olan bir grup İtalyan hastada keşfedilmiştir (1). Başlangıçta enfeksiyon sebebi Hepatit B virüsünün bilinmeyen bir ajanı olduğu düşünülse de, 1980 yılında bu hastalarda karaciğer hasarının şiddetlenmesi sonucu yapılan araştırmalarda delta antijeninin sorumlu ajan olduğu gösterilmiştir (2). Daha sonra delta antijeninin, infektif ve defektif özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Defektif virüsler, hücreleri bulaştıran fakat gerekli komponentleri olmadığından o hücre içinde kendi başına çoğalamayan virüslerdir. Hepatit delta virüsü de defektif olmasından dolayı bulaşabilmek için Hepatit B yüzey antijenine (HBsAg) ihtiyaç duymaktadır (3). 2019 yılında yapılan çalışmada ise Hepatit Delta virüsünün HBV'den farklı zarflı virüslerle de enfeksiyona sebep olabileceği önerilmiştir (4).

Hepatit D ve B virüsleri kan ile bulaşan enfeksiyonlardır. Hepatit B ile enfekte 460 milyondan fazla insan olduğu düşünülürken, Hepatit D için bu rakam 20 milyon civarındadır (5). Orta Afrika, orta doğu ve orta-güney Amerika bölgelerinde HDV enfeksiyonuna sıklıkla rastlanılırken; Avustralya, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'nın çoğu ülkesinde az sıklıkta görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde hepatit D enfeksiyonu çoğunlukla uyuşturucu bağımlılarında görülmektedir. Dünyada hepatit B aşısının giderek yaygınlaşmasıyla Hepatit D enfeksiyon sıklığı azalmaktadır.

Hepatit Delta virüsü ko-enfeksiyon ve süper enfeksiyon olmak üzere 2 farklı şekilde enfeksiyona sebep olabilir. Bir bireyin iki virüsle eş zamanlı olarak birlikte enfekte olması durumuna "ko-infeksiyon" denilmektedir. Ko-infeksiyon, hafif ve şiddetli bir hepatite yol açsa da hastalarda tam iyileşme görülür ve kronik hepatit D'nin gelişimi nadirdir. Süper infeksiyon ise hali hazırda kronik hepatit B enfeksiyonu olan bir bireyin HDV ile enfekte olması durumudur ve HDV'nin kronik hepatit B'ye süper infeksiyonu, her yaşta daha ciddi bir hastalığa neden olur (6).

HBV ve HDV birlikteliğinde gözlenen enfeksiyon sadece HBV varlığında gözlenen enfeksiyona göre, %2-20 oranla daha sık olarak hızlı ilerleyen fulminan hepatite dönüşebilir. HDV-HBV süper infeksiyonlarında kronik HBV hepatiti gelişme sıklığı azalırken, çoğu hastada kronik HDV enfeksiyonları ortaya çıkmaktadır ve bu kronik HDV enfeksiyonlarında daha sık ve ciddi karaciğer hastalıklarına daha sonra da karaciğer sirozuna neden olmaktadır.

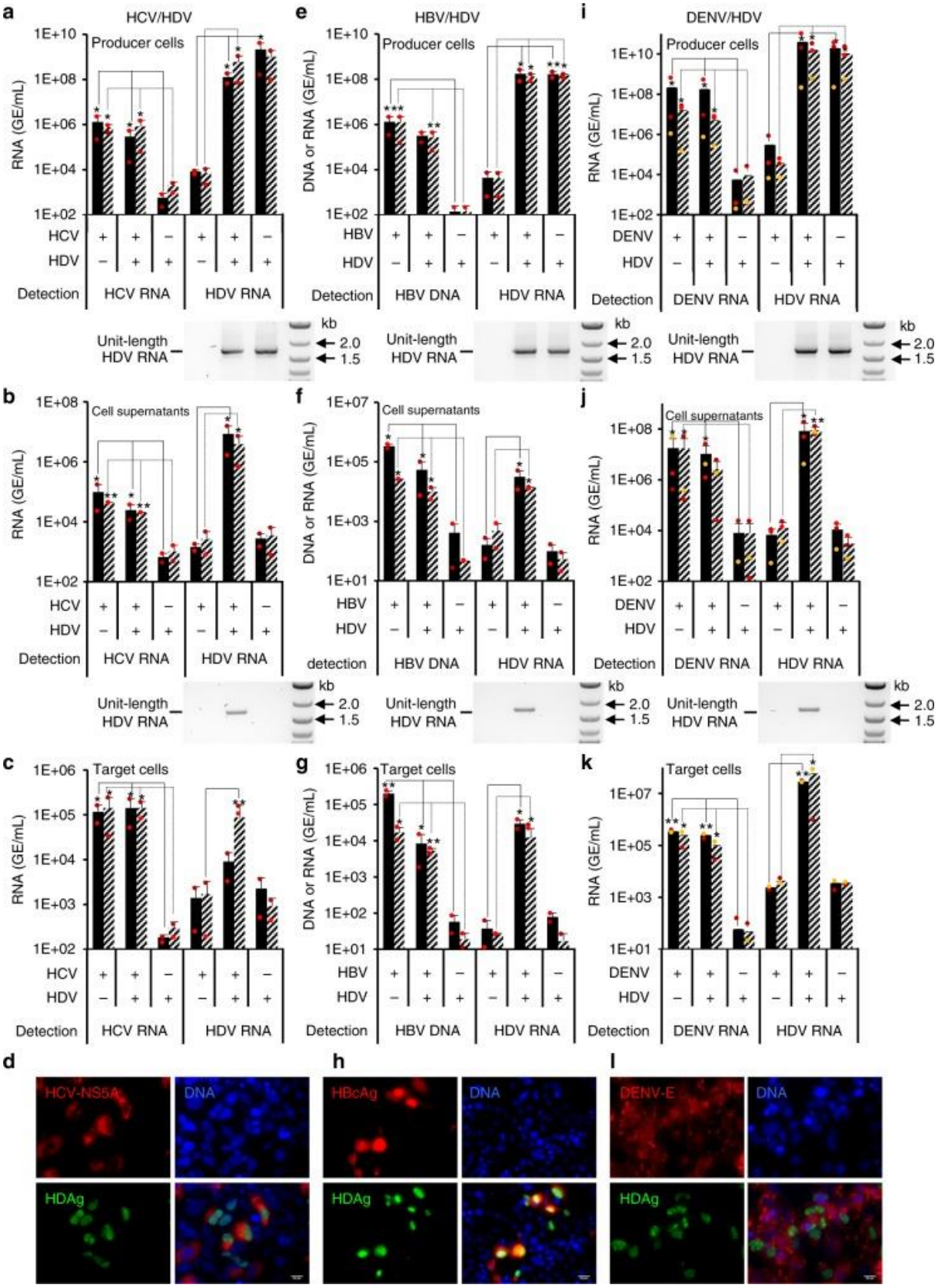
Nadir olarak bazı hasta gruplarında daha iyi seyredebilir veya HDV'ye bağlı koruyucu bağışıklık gelişebilmektedir.

HBV ve HDV ile mücadelede virüsün genom yapısının incelenmesi, viral genomda ortaya çıkan varyasyonların klinik açıdan ele alınması, hastalığın tedavisinde kullanılacak ilaçların araştırılması çok önemlidir. Bütün bunlar bilim insanlarını HDV enfeksiyonlarını çalışmaya itmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. HEPATİT DELTA VİRÜSÜ

Hepatit delta virüsü (HDV) bilinen en küçük insan RNA virüsüdür (7). HDV, kronik hepatit B hastalarında Rizzetto ve ark. (1977) tarafından keşfedildi. *Delta* olarak adlandırılan bu antijenin, daha sonra infektif ve defektif olduğu gösterildi. Hepatit D virüsü enfeksiyona yol açmak için hepatit B virüs enfeksiyonlarında ortaya çıkan hepatit B yüzey antijenine (HBsAg) ihtiyaç duymaktadır ve HBsAg-pozitif hastaların karaciğer hastalığının seyrini şiddetlendirmektedir (8). HDV bulaşabilmek için HBV'nin zarf proteinlerini kullandığından farklı zarflı virüslerle de aynı etkileşime girip girmediği araştırmacılarda merak uyandırmıştır. 2019'da *Perez-Vargas ve ark.* tarafından yapılan çalışmada Veziküler Stomatit Virüsü (VSV), Hepatit C Virüsü (HCV), İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV), İnsan metapneumovirüsü (HMPV), Kuş İnfluenza Virüsü (AIV), Dang virüsü (DENV) ve West Nil Virüsü (WNV) gibi zarflı virüslerin HDV ile ilişkisi incelenmiştir ve *In vitro* olarak, vezikülovirüs, flavivirüs ve hepakivirüs dahil olmak üzere çeşitli virüslerin zarf glikoproteinlerinin HDV ribonükleoproteinlerini paketleyebildiğini, ko-enfekte hücrelerin HDV partiküllerinin hücre dışı ortama etkili bir şekilde çıkmasına ve daha sonra ilgili reseptörleri eksprese eden hücrelere girmesine izin verdiğini ayrıca, HCV ko-enfekte farelerin karaciğerinde HDV enfeksiyonunu tetikleyebildiği gösterilmiştir (Şekil 2.1.)(4). HDV'nin HBV dışındaki zarflı virüslerle de enfeksiyona yol açabileceği düşünülse de, bu hipotezi desteklemek için daha fazla çalışma yapılması gereklidir (4).



Şekil 2.1. *Perez Vargaz ve ark.* tarafından yapılan çalışmada bulunan sonuçlar (4)

HBV ve HDV arasındaki ilişkiye rağmen, HDV genomu HBV genomu ile nükleotid dizisizi açısından hiçbir benzerlik göstermemekte ve HBV'den bağımsız olarak replike olabilmektedir. HDV'nin genom yapısı ve replikasyon mekanizması bitki viroid ve virüsoidlere benzemesine rağmen, *Deltaviridae* olarak adlandırılan farklı bir cins olarak sınıflandırılmıştır.

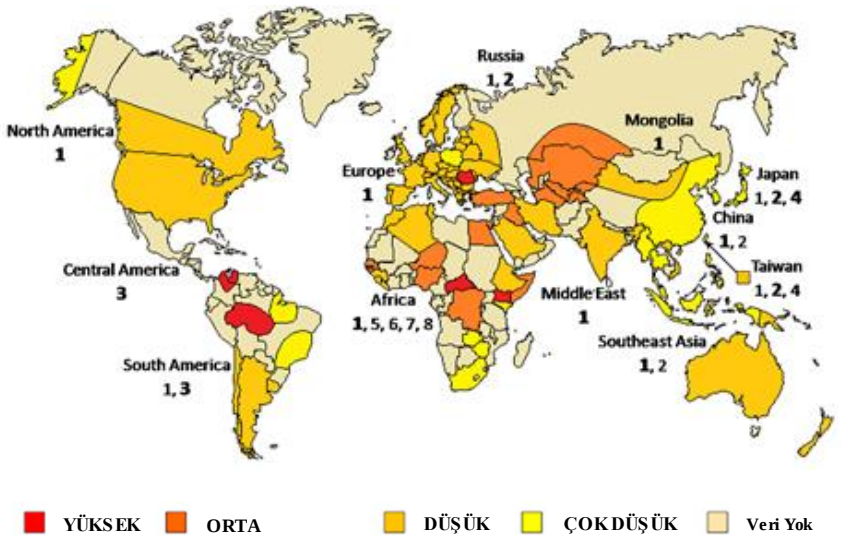
2.2. HDV EPİDEMİYOLOJİSİ

Hepatit D virüsü tüm yaş gruplarında görülebilir. HDV'nin yaşam döngüsü için HBV'ye ihtiyacı olmasına rağmen, her bir virüsün dağılım şekli farklıdır. Mevcut tahminler, yaklaşık 20 milyon kişiye HDV bulaşmış olduğunu gösterse de, HBV ile enfekte olmuş bireylerde, özellikle karaciğer enzimleri normal seyrettiğinde sistematik tarama yapılmaması nedeniyle bu tahminlerin yanlış olduğu ve gerçekleştirilmesinin zor olduğu düşünülmektedir (9). Ayrıca, hastalık iyileştikten sonra seroreversiyon oluşabilir ve bu da geçmiş enfeksiyonların teşhisini imkânsız hale getirebilir. Epidemiyolojik çalışmalarda HDV prevalansının ülkelere göre farklılık gösterdiği görülmüştür.

HDV'nin başlıca yaygınlık alanları, Akdeniz havzası, Orta Doğu, Orta ve Kuzey Asya, Batı ve Orta Afrika, Amazon havzası, Venezuela, Kolombiya ve Pasifik'in belirli adalarıdır. Uzak Doğu'da daha az bulunmakla birlikte Tayvan, Çin ve Hindistan'da önemli oranlarda görülmektedir. HDV prevalansı Vietnam ve Endonezya hariç HBV'nin yüksek endemik olduğu bölgelerde daha yüksektir. Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da HDV prevalansı düşükken, Amazon bölgesinde hiper-endemik seyir mevcuttur.

2.3. HDV GENOTİPİ

Hepatit Delta'nın şimdiye kadar 8 farklı genotipi tanımlanmıştır (10). Ülkemizde yapılmış çalışmalarda ise neredeyse %100 oranında genotip-1 saptanmıştır (Şekil 2.2.)(11).



Şekil 2.2. HDV'nin dünyadaki prevelansı (12)

HDV enfeksiyonu prevalansı, Türkiye (13) gibi dünyanın bazı bölgelerinde, özellikle de HBV'ye karşı aşılama kampanyaları, kan ürünleri ve hamile kadınların, sağlık çalışanları arasında kan kaynaklı enfeksiyonlara karşı güvenlik prosedürlerinin uygulanması, tek kullanımlık şırıngalara geçilmesi, sosyoekonomik koşulların iyileştirilmesi ve edinilen bağışıklık yetmezliği sendromu korkusunu izleyen cinsel yolla bulaşan ajanlar hakkında genel halkın farkındalığının artması ile nedeniyle önemli ölçüde azalmıştır (14). Bununla birlikte, enfekte hasta sayısı, Avrupa'da 1990'ların sonuna doğru azalmayı bırakıp, örneğin Londra'da (9), Hannover'de (15) ve İtalya'da (14) sabit kaldı ve Fransa'da (16) ise artıyor gibi görünüyordu. Sanayileşmiş ülkelerde bu nüks, çoğunlukla Doğu Avrupa, Afrika, Orta Doğu, Türkiye ve eski Sovyetler Birliği'nden gelen göç sebebiyle artmaktadır ama endemik bölgelerden göç tek neden değildir; intravenöz ilaç kullanımı da neden konusu olabilir.

2.4. VİRAL HETEROJENİTE

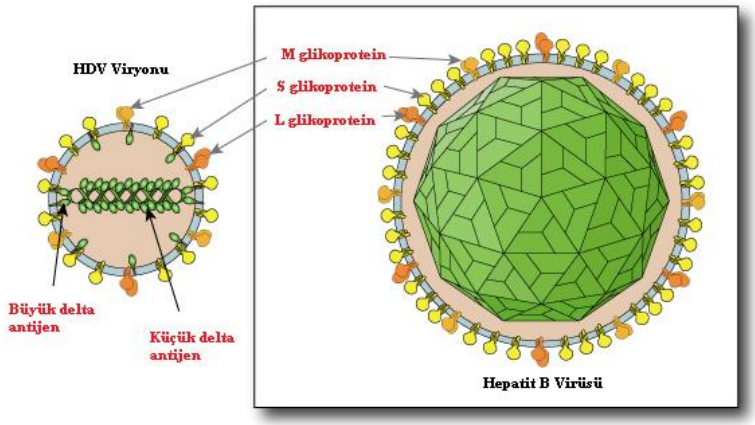
HDV RNA genomunun evrimleşme hızı çok yüksek olup aynı genotipte, nükleik asit dizisi açısından %16'ya kadar değişkenlik gösterebilir hatta aynı hastada bile virüs birbirine yakın viral varyant havuzu oluşturabilir. Bu duruma "*quasispecies*" denilir (17). Ribozim dizini ve HDAg'nin RNA bağlanma bölgesi yüksek seviyede korunmuş olmasına rağmen, C ucunda bulunan büyük HDAg (L-HDAg) çok değişkendir. Yüksek oranda korunan alanlar, genomik ve antijenomik RNA otokatalitik bölünme bölgelerinin ve HDAg'nin RNA-bağlayıcı alanının etrafına yerleştirilir. Farklı izolatların HDV genomları %39 heterojenite gösterir. Geçmişte HDV genotiplemesi karaciğer dokusunun immuno-histokimyasal analizi veya PZR ürününün

RFLP analiziyle elde edilmekte ve virüsün dünya genelinde üç ana genotipten oluştuğu bilinmekteydi (18).

Günümüzde farklı HDV genom dizileri, sekiz farklı HDV genotipinde sınıflandırılmıştır (10). Dünya çapında temsil edilen genotip 1 hariç, diğer tüm genotipler çoğunlukla belirli coğrafi bölgelerde bulunur (Şekil 2.2.).

2.5. HDV VİRYONU ve YAPISI

Nükleik asit ve protein kılıfından oluşan tam bir virüs partikülüne viryon denir. Hepatit D virüsü viryonları, HBV yüzey proteinleri, RNA genomu, hepatit delta antijeni (HDAg) olmak üzere 3 parçadan oluşmaktadır (Şekil 2.3.). HBsAg virusun replikasyonu, maturasyonu, hücreden hücreye geçebilmesi ve varlığını sürdürebilmesi için gerekli olan temel yapıdır



Şekil 2.3. HDV viryonu ve Hepatit B virüsü

Hepatit delta virüsü, sadece hepatositlerde replike olur. Hepatositlere girişi ve reseptör mekanizması, PreS1-aminoterminal bölgesi ile hepatosit yüzeyi etkileşimi sonucu olduğu kabul edilmektedir. Virüsün RNA polimeraz enzimi yoktur ve hücresel RNA polimeraz II aracılığı ile replike olur. HDV replikasyonu sırasında üç farklı RNA birikir: sirküler yapıdaki genomik RNA, sirküler tamamlayıcı antigenomik RNA, HDAg sentezleten lineer RNA (Şekil 2.6.). HDV ile ifade edilen tek protein HDAg'dır. Hepatit Delta antijeninin büyük (L-HDAg) ve küçük (S-HDAg) olarak 2 formu bulunmaktadır (Şekil 2.6). S-HDAg; RNA replikasyonu için gereklidir ve ribozom aktivitesini düzenlemektedir. L-HDAg ise viryon oluşum aşamasında HBsAg etkileşimi için gereklidir. HDV replikasyon döngüsünde; S-HDAg ve L-HDAg'yi kodlayan genomik ve antigenomik farklı uzunlukta RNA parçaları üretilir ve oluşan lineer monomer yapılar kendi üzerinden kıvrılarak enfeksiyöz dairesel formları oluşturmaktadır (19).

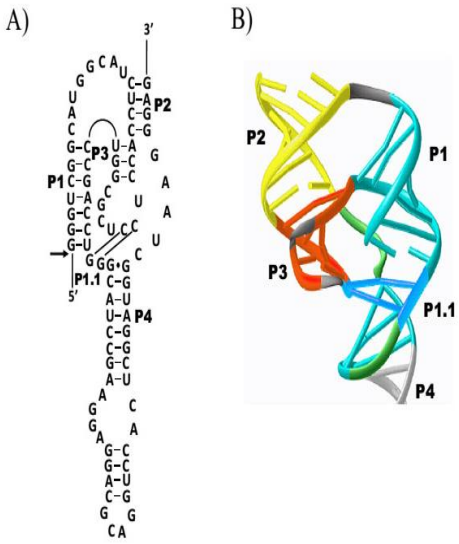
HDV GENOMU

HDV genomu, bitki viroidleri ve virüsoidleri ile bazı yapısal analojiler taşıyan yaklaşık 1.7 kb'lik bir tek sarmallı dairesel RNA'dan (ssRNA) ve negatif polariteden oluşur. Büyük miktarda GC nedeniyle, nükleotidlerin yaklaşık %74'ü kendilerini intramoleküler olarak tamamlar. HDV replikasyonu sırasında üç farklı RNA birikir: genom (~300.000 kopya), antigenom (~30.000 kopya) ve mRNA (~600 kopya) (Şekil 2.3.). Genom, suşa bağlı olarak 1672-1697 nükleotitten oluşan dairesel bir negatif tek iplikli RNA'dır. Antigenom, genomun tam bir tamamlayıcısıdır. Replikasyon, herhangi bir DNA ara maddesi olmadan, RNA yönlendirmeli olarak RNA sentezi ile gerçekleşir (20). Antigenom, HDAg'yi kodlayan benzersiz bir açık okuma çerçevesi (ORF) ve genom olarak bir ribozim alanı içerir (21, 22). Son olarak, mRNA, HDAg'nın sentezini yönlendirir. 5'şapka ve 3'poli (A) kuyruğu taşıyan antigenomla aynı polariteye sahip 800 nükleotid doğrusal bir RNA'dır (23, 24). Bu molekül kararsızdır ve replikasyon boyunca sentezlenir.

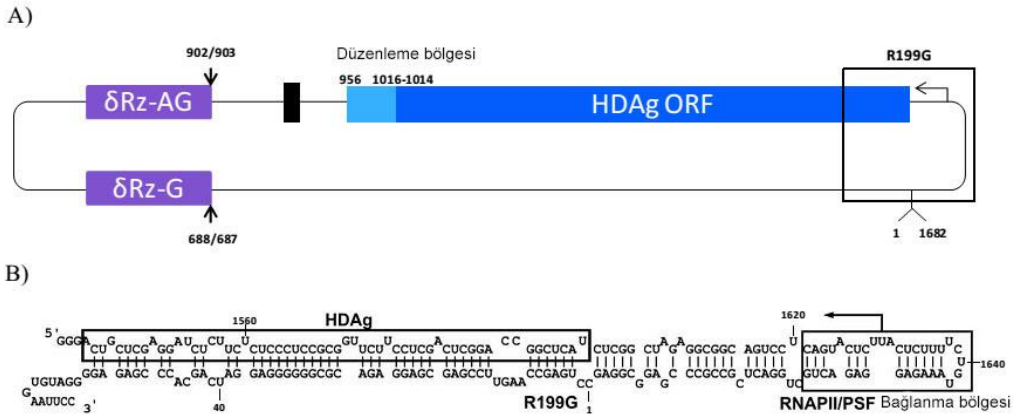
HDV RİBOZİM BÖLGESİ

HDV RNA'nın genom ve antigenom olarak adlandırılan ve replikasyon için gerekli olan bölgelerin her biri delta ribozim olarak adlandırılan fonksiyonel bir bölge içermektedir (Şekil 2.4. ve Şekil 2.5.). Ribozimler, belirli biyokimyasal reaksiyonları katalize etme yeteneğine sahip olan, DNA, RNA veya enzim olabilen moleküllerdir. Başlıca görevleri, RNA işleme, viral replikasyon ve taşıyıcı RNA biyosentezidir. HDV'nin 1138 ile 1226. nükleotitlerini kapsayan ribozim bölgesi yüksek seviyede korunmuştur.

Hepatit delta virüsü (HDV) ribozimi, kodlanmayan RNA'dır. HDV, viral replikasyon için gerekli olan ve konukçu organizmayı enfekte etmek ribozim aktivitesini kullandığı bilinen tek insan virüsüdür. Ribozim çift yuvarlanma daire mekanizması (double-rolling circle mechanism) tarafından replikasyona aracılık eder. Ribozim kristal yapısı X-ışını kristalografisi kullanılarak çözülmüştür ve çift psedoknat ile bağlı beş sarmal segment göstermektedir.



Şekil 2.4. Delta ribozim yapısı; A: karmaşık, iç içe, çifte yalancı ilmikli (double pseudoknot) ve B: HDV ribozim şematik kristal yapısı (22)

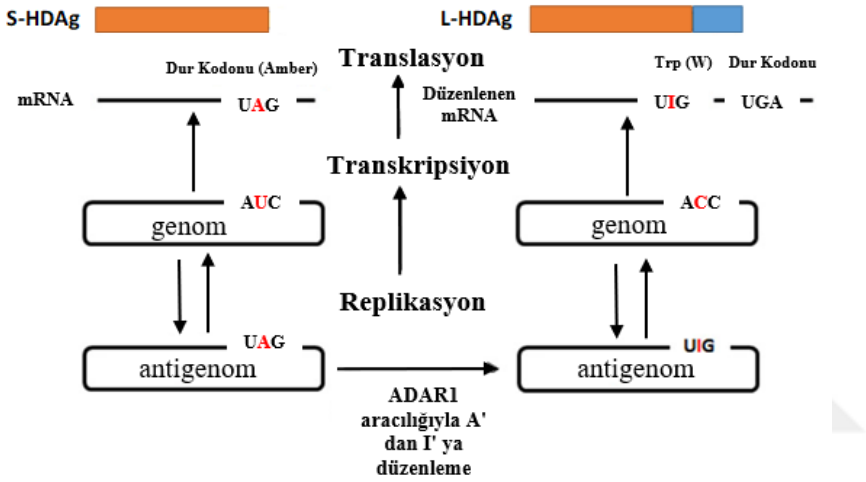


Şekil 2.5. Hepatit delta virüsünün RNA genomu; A: delta ribozim motifleri (δRz) ve ilgili kırılma bölgeleri gösterilmiştir (25) B: Tahmin edilen HDV ikincil yapısı (26)

HDV ANTİJENİ

Hepatit delta antijeni (HDAg) ilk olarak hepatit B virüsü (HBV) ile enfekte olmuş bazı hastaların hepatositlerinin çekirdeğinde tespit edildi. HDAg, HDV viryon partiküllerinin bir bileşenidir ve birlikte viral RNA genomu, viral nükleokapsit oluşturur. Her viryon partikülünde RNA molekülü başına yaklaşık 70 HDAg molekülü vardır, fakat nükleokapsidin kesin yapısı belirlenmemiştir.

Antigenom üzerindeki açık okuma bölgesi, HDV döngüsü sırasında iki farklı HDAg formunun sentezine yol açar: S-HDAg (195 amino asit; 24 kDa) ve karboksil terminaline eklenen 19 amino asitiyle birlikte L-HDAg (214 amino asit; 27 kDa). Bazı antigenomlar ADAR-1 (adenosin deaminaz-1) enzimiyle post-transkripsiyonel modifikasyon olduğunda L-HDAg oluşur (27). Amber/ W bölgesindeki adenosin (1015. amino asit) bir inosine (UAG UIG olur) deamine olur ve bir sonraki replikasyon döngüsü sırasında bir sitozinle eşlenerek AUC→ ACC ye dönüşür. Bu modifiye edilmiş genom, bir antijen üretmek için mRNA'ya kopyalandığında, dur kodonu (UAG) triptofan amino asiti (UGG) ile yer değiştirir (28). Böylece 19 kodon sonra bulunan bir sonraki dur kodonuna ulaşarak L-HDAg sentezlenir.



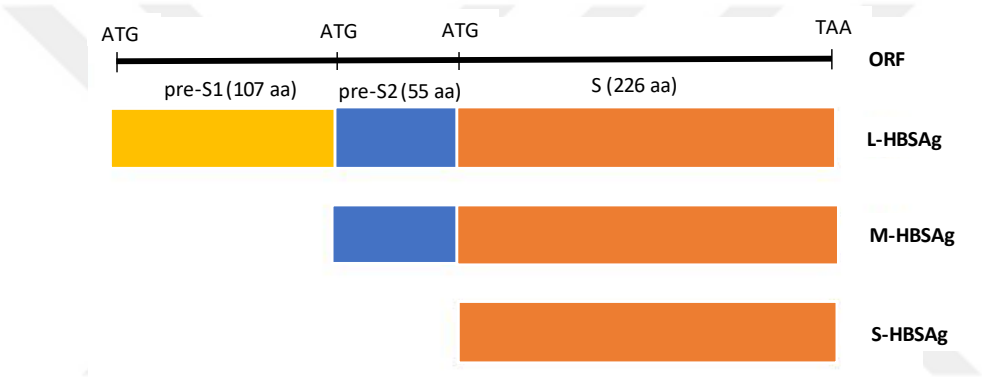
Şekil 2.6. S-HDAg ve L-HDAg üretimi (19)

L-HDAg'nin karboksil terminaline eklenen on dokuz ekstra amino asit, S-HDAg'den farklı fonksiyonel özellikler gösterir. Viral genom replikasyonunun başlatılması için S-HDAg gereklidir, viral replikasyonun geç evresinde sentezlenen L-HDAg replikasyonun temel inhibitörü olarak işlev görür ve yeni viryon partiküllerinin birleştirilmesinde görevlidir (29, 30). L-HDAg, sadece HDV genom replikasyonunu değil aynı zamanda L-HDAg ekspresyonu için gerekli amber / W bölgesinin düzenlenmesini önleyen viral replikasyonunu inhibe ederek kendi sentezini de düzenler (31). HDAg, RNA-bağlanma alanı, nükleer lokalizasyon dizisi gibi farklı fonksiyonel domainler içerir. Ek olarak L-HDAg, virüs montaj sinyali (VAS) ve nükleer ihracat sinyali içeren birkaç alan daha içerir (29, 30). L-HDAg'daki VAS, virion montajı için zorunlu kılmaktadır (32). HDAg, RNA'ya bağlanarak viral genomun transkripsiyonunu doğrudan aktive edebilir. HDAg ayrıca RNA polimeraz II'ye bağlı transkripsiyon baskılayıcıyı değiştirerek transkripsiyon uzamasını kolaylaştırabilir (29, 30, 32). HBsAg'ın yokluğunda, hem S-HDAg hem de L-HDAg çekirdeklerde nükleer lokalizasyon sinyalleri taşırken çekirdekte lokalizasyon

eğilimindedir. Bu nedenle, HBsAg, L-HDAg'nin sitoplazmik translokasyonu için elzemdir, çünkü sadece L-HDAg, viryon düzeneğindeki köklü rolü için nükleer ihracat sinyali taşır (33).

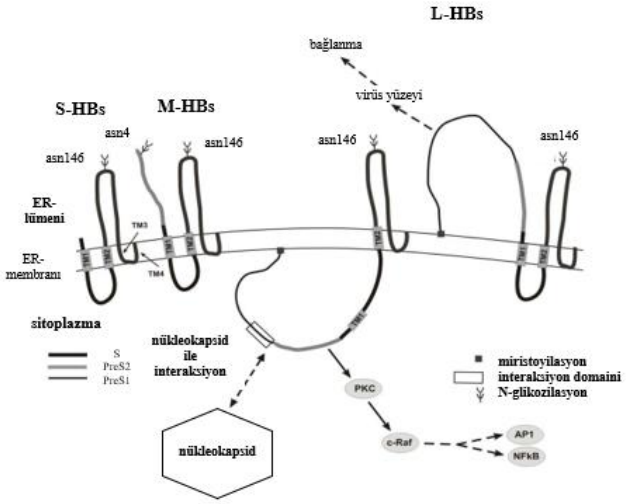
HBV ZARF PROTEİNLERİ

HBV viral genomu, ORF S, C, P ve X olmak üzere dört farklı proteini kodlayan, açık okuma çerçevesi (ORF) içerir. Açık okuma bölgesi Pre-S1, Pre-S2 ve S olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.7.). S bölgesi S (yüzey) proteinini kodlamakta olup hepatit B yüzey antijenini (HBsAg) içermektedir. M proteini pre-S2 ve S bölgeleri tarafından ve L proteini her üç bölge tarafından kodlanmaktadır. HDV, bu HBV parçacıklarını kullanarak kendi genomunu kılıflandırmaktadır.



Şekil 2.7. HBV zarf proteinleri yapısı

HBV zarf proteinleri, S-domain tarafından membrana tutturulmuş olan integral proteinleridir. Zarf proteini sentezi endoplazmik retikulumda (ER) meydana gelir (Şekil 2.8.). Zarf, HBV'nin küçük HbsAg (S-HBsAg), orta (M-HBsAg) ve büyük (L-HBsAg) olmak üzere üç zarf proteininin yaklaşık 100 kopyasından oluşur. Bu proteinlerin nispi oranı, 95: 5: 1, 22 nm. dir. S-HBsAg, 226 amino asit içerir ve endoplazmik retikulumun (ER) lipit çift tabakasına, yüksek hidrofobik N-terminal kalıntısı 4-28 ve 80-100, C-terminali (kalıntılar 165-226) ve transmembran alanları (TMDS) aracılığıyla bağlanır. M-HBsAg, 281 amino aside sahiptir ve bütün S-HBsAg'yi ve ER lümenine bakan N-terminal preS2 bölgesini içerir. L-HBsAg 389-400 amino asit içerir. Bu protein, ER membranında preS'in sitoplazmaya veya ER lümenine konumlandırılmasına dayanan iki konfigürasyona sahiptir.



Şekil 2.8. HBV'nin yüzey proteinlerinin yapısı (34)

2.6. HDV REPLİKASYONU

HDV replikasyonu, HBV'den tamamen bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Replikasyon hücre çekirdeğinde gerçekleşir. RNA pol II, HDV RNA'yı bir kere kopyalamaya başladığında transkripsiyonel aktivitesini durmadan sürdürür. Replikasyonun son basamağında lineer multimerik iplikler genomik ve antigenomik HDV-RNA'larını oluşturacak şekilde yeniden düzenlenir. Bunun için transkripsiyon ürünü, genomik ve antigenomik monomerlerini oluşturacak şekilde ribozimleri ile kesilir. Replikasyon sırasında, konağa ait adenozin deaminaz enzimi ADAR1'in işleme aktivitesi ile L-HDAg'yi kodlayan antigenomik RNA'lar üretilir. Sentezlenen genomik RNA HDAg ile bağlanır. Bir yandan da HDAg dimerizasyonu ile nükleokapsid oluşur. Hücre çekirdeğindeki nükleokapsid endoplazmik retikulum'da HBsAg ile etkileşerek zarfını kazanır. Böylece virüsün oluşumu gerçekleşmiş olur.

2.7. HDV PATOGENEZİ

Hepatit delta virüsü sadece hepatositlerde çoğaldığından, HDV enfeksiyonu ile ilişkili hücresel hasar esas olarak karaciğeri içerir. Akut HDV enfeksiyonunda, enfekte olmuş hepatositlerin, küçülmüş eozinofilik sitoplazma ve panknotik çekirdeklerin yanı sıra, sitopatik hepatoselüler hasarla tutarlı olarak, karaciğer parankiminde minimal enflamatuar hücrelerin varlığı ile karakterize dejeneratif değişikliklere uğradığı varsayılmaktadır. Büyük delta antijeni ise sitotoksik olmayıp, HDV'nin kalıcılığını arttırır ve hepatositleri immün aracılı hasara duyarlı hale getirir.

HDV akut ve kronik HDV enfeksiyonu sırasındaki immün aracılı cevaplardaki varyasyonlar dikkat çekmiştir (35, 36). Sitotoksik T lenfositleri, HDV ile enfekte olmuş hücreleri yok ederek virüsü temizlemekten sorumludur. Sadece sınırlı viral epitopları tanıma yeteneğiyle gecikmiş ve yetersiz immün cevap, enfeksiyonun temizlenememesiyle ilişkilendirilmiştir. Fulminan karaciğer yetmezliği, HBV / HDV ile enfekte olmuş hastaların %1'inde görülürken, HDV ile süperinfekte olan hastaların %5'inde gözlenmiştir. Abartılı immün cevap, özellikle hücre aracılı, fulminan karaciğer yetmezliğinde masif hepatosit nekrozu ve karaciğer hasarıyla ilişkilidir (37).

HDV enfeksiyonunun ya koinfeksiyon ya da süper enfeksiyon olarak gerçekleştiği bilinse de, kronik hepatit D enfeksiyonu sıklıkla süperinfeksiyon olarak ilerler (38). Hepatit D ile süper enfeksiyon geliştiren kronik hepatit B hastalarında kronik karaciğer yetmezliği akut hale gelebilir, asitli ve hepatik ensefalopatiye (karaciğer hasarına bağlı beyin fonksiyon bozukluğu) neden olabilir.

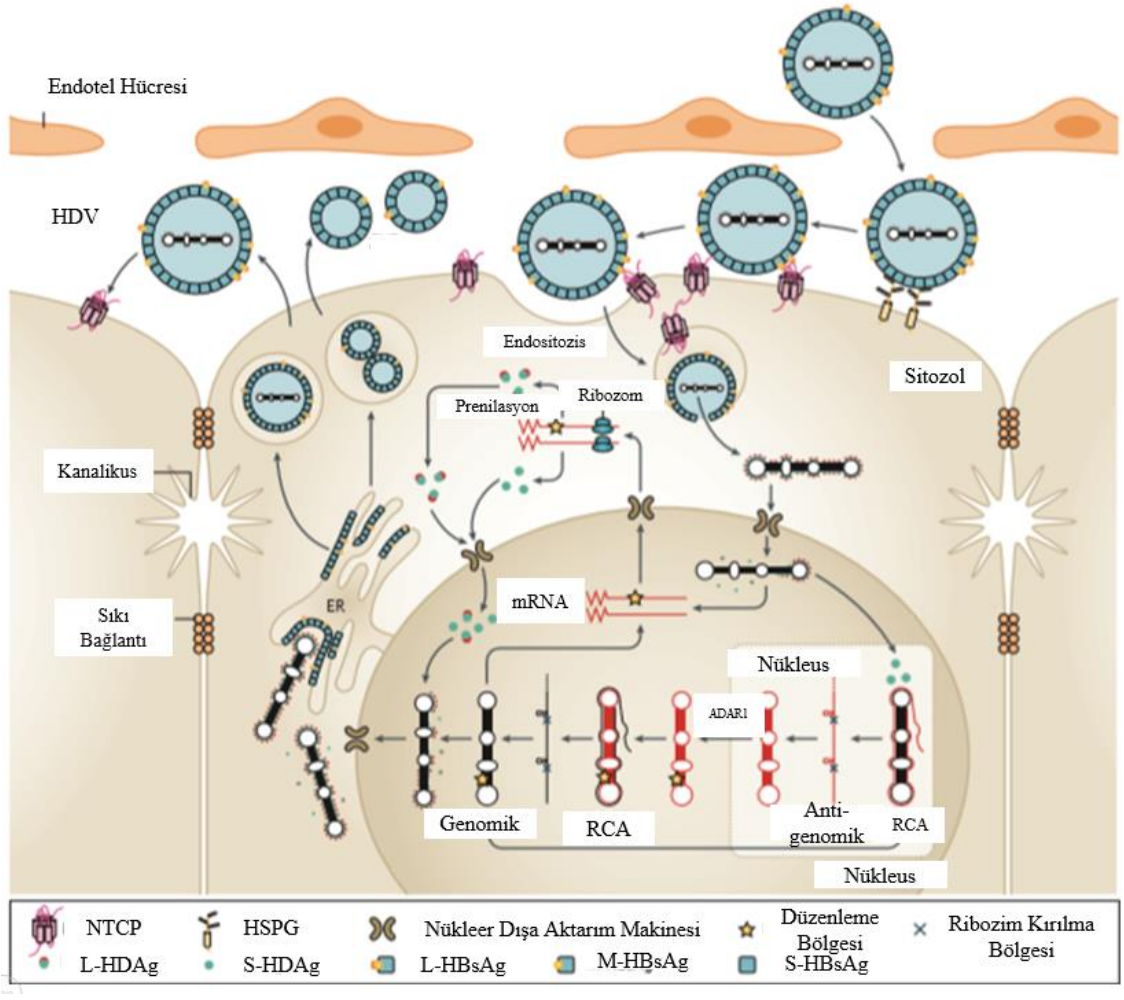
Woodchuck modellerinde hastalık seyri ve insanlardaki HDV süperinfeksiyonu arasındaki belirgin benzerlik gözlenmiştir. Böylece deneysel woodchuck modelleri, HDV patogenezi ve HDV süperinfeksiyonu ile ilişkili kronikliği hakkında önemli kanıtlar oluşturmaktadır (35, 39). Ek olarak, bu modeller HDV için yeni tedavilerin etkinliğini ve koruyucu rolünü test etmek için de önemlidir. Son olarak HDV'nin patogenezinin, HDV'nin HBV ile etkileşmesinden etkilendiği düşünülmektedir (40). Fakat bu durum net bir şekilde aydınlatılamamıştır.

2.8. HDV YAŞAM DÖNGÜSÜ

HDV viryonu hepatosite bağlandıktan sonra, Hepatit Delta virüsü hepatosite girer. Hepatosite giriş, HBV'nin girişine benzer çünkü hem HBV hem HDV'nin hücresel bağlanması, L proteininin pre-S1 alanının önemli rol oynadığı HBsAg içinde çeşitli ortak yapılara bağımlıdır (41). İlk olarak, hepatosit membranındaki heparan sülfat proteoglikanlara HDV viryonu (42, 43) yaklaşır, ardından giriş reseptörü sodyum taurokolat taşıma polipeptidine (NTCP) bağlanır (44) (Şekil 2.9). Bu aşamada, pre-S1 bölgedeki amino asitlerin bütünlüğü çok önemlidir. Hepatosit içine girdikten sonra, HDV kaplanmamıştır ve ribonükleoprotein kompleksi, HDV replikasyonunun bir çift yuvarlanma daire mekanizması (double rolling circle mechanism) yoluyla gerçekleştiği çekirdeğe yönlendirilir. Replikasyon sırasında ihtiyaç duyulan RNA polimeraz, kendi polimeraz ürünlerini kullanan hepatit B veya C virüslerinin aksine, ilaç müdahalesi için uygun olmayan bir hedef haline getiren bir konakçı enzimdir (45, 46). HDV

RNA, sadece küçük hepatit D antijeni (S-HDAg) kodlar. Başka bir protein, büyük HDAg (L-HDAg), çift sarmallı RNA üzerinde etkili olan konak enzim adenosin deaminaz (ADAR1) tarafından katalize edilen bir düzenleme olayının sonucu olarak sentezlenir. L-HDAg, HDV RNA replikasyonunu inhibe eder, ancak viryon montajı için çok önemlidir (46). Yeni oluşan ribonükleoprotein kompleksi sitoplazmaya gönderilir ve HBsAg'nin HBV zarfı ile (L-, M- ve S- yüzey antijenleri) kaplanır. Nükleoprotein kompleksi preniltransferazlar için bir substrat görevi gören L-HDAg'de 4-amino asit motifi içeren sistein ile mümkündür.

İki preniltransferaz vardır: farnesiltransferaz ve geranilgeraniltransferaz. Bu iki enzimden, farnesiltransferaz HDV tarafından kullanılır. İkinci enzimin 15-karbonluk farnesil kısmı L-HDAg'ye bağlanır. Ribonükleoprotein kompleksinin HBsAg zarfı, HDV'de viryon morfogenezinin başarılı bir şekilde tamamlanması için bir ön koşuldur (47). Yeni viryon daha sonra ya multiveziküler gövdeler yoluyla ya da Golgi yoluyla subviral partikül sekresyon ile hücreden çıkar (41)(Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. HDV yaşam döngüsü (41)

2.9. HDV'DE KLİNİK ÖZELLİKLER ve TEŞHİS

HDV, HBV'den bağımsız enfeksiyona sebep olamayacağından, HDV enfeksiyonu her zaman HBV enfeksiyonu ile ilişkilidir. Dolayısıyla HBV'ye karşı yapılan aşılama hastaları, Hepatit delta enfeksiyonundan da korumaktadır. Bu virüslerle ko-enfeksiyon ve süper enfeksiyon olmak üzere iki ana enfeksiyon paterni oluşabilir. Ko-enfeksiyonu, her iki virüsün de akut hepatit B ve D'ye yol açan eşzamanlı bir enfeksiyondur. Klinik açıdan, bu, akut hepatit B'den (48) ayırt edilemez, ancak daha şiddetli ve iki serum alanin aminotransferaz pikleri olabilir (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) gözlenebilir. HBV, HDV için gerekli olduğundan, kronikliğe ilerleme hızı akut hepatit B ile aynıdır (<%5). Süper infeksiyon, kronik HBV ile kronik olarak enfekte olmuş bir bireyin HDV enfeksiyonudur. Bu enfeksiyon yolu, neredeyse tüm hastalarda (%80'e kadar) kronikliğe ilerleyen ciddi akut hepatite neden olur (48). Kronik HDV enfeksiyonu ortaya çıktıktan sonra, HBV nedeniyle önceden var olan karaciğer hastalığını genellikle kötüleştirir (49). Bununla birlikte, HBV replikasyonu, genellikle HDV enfeksiyonunun akut fazı sırasında düşük seviyelere bastırılır. HDV enfeksiyonunun ko-enfeksiyon ve süper-enfeksiyon durumunda klinik özellikleri arasındaki karşılaştırılması Çizelge 2.1.'de gösterilmektedir. Ko-enfeksiyon daha hafif seyirli görülürken ve kronikleşme oranı azken; süper enfeksiyon tam tersidir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. HDV enfeksiyonunun ko-enfeksiyon ve süper-enfeksiyon durumunda klinik özellikleri arasındaki karşılaştırma

	Ko-enfeksiyon	**Süper Enfeksiyon**
HBV enfeksiyonu	Akut	Kronik
Sonuç	Serokonversiyon ile iyileşme	Genellikle kalıcı enfeksiyon
Belirteçler		
HBsAg	Pozitif, erken ve geçici	Pozitif ve kalıcı
Anti-HBs	İyileşme fazında pozitif	Negatif
HDV enfeksiyonu	Akut	Akut ya da kronik
Sonuç	Serokonversiyon ile iyileşme (%5 kronikliğe ilerleme)	Genellikle kalıcı enfeksiyon (%80 kronikliğe ilerleme)
Belirteçler		

Çizelge 2.1. (devam)

Serum HDAg	Erken ve kısa ömürlü	Erken ve geçici, daha sonra tespit edilemez
Karaciğer HDAg	Pozitif ve geçici	Pozitif, son dönemlerde negative olabilir.
Serum HDV-RNA	Pozitif, erken ve geçici	Pozitif, erken ve kalıcı
RNA		
Anti-HDV	Son akut fazı, düşük titre	Hızlı artış, yüksek titre
IgM- anti-HDV	Pozitif, geçici, pentamerik	Hızlı artış, yüksek titre, monomerik

2.10. KRONİK HEPATİT DELTA'DA TEDAVİ SEÇENEKLERİ

Kronik hepatit delta (KHD), hepatotropik kaynaklı viral hepatitlerin en şiddetli formu ile ilişkilidir (46, 50, 51). Buna rağmen KHD tedavisi, 30 yıldan fazla süredir değişmemiştir ve tedavi interferonlardan (IFN) oluşmaktadır. Tedavide tek değişiklik, muhtemelen daha iyi viral yanıt oranlarına yol açmayan ancak rahat kullanıma sahip pegile-interferona (peg-IFN) geçiştir. Haftada üç kere uygulanan geleneksel IFN'lere kıyasla, haftada bir kere uygulanan peg-IFN'ler daha uygun farmokodinamik özelliklere sahiptir ve tedavide peg-IFN alfa deri altı olarak kullanılmaktadır. Tedavide peg-IFN'na ek olarak; peg -IFN'nin lamivudin ile kombinasyon tedavisi (52), ribavirin (53), adefovir (54) ve tenofovir (54) gibi tedaviler denenmiştir fakat IFN monoterapisine kıyasla daha iyi viral yanıt oranlarına yol açmadığı için hayal kırıklığı yaratmıştır. Tek istisna olarak, peg-IFN monoterapisine kıyasla daha yüksek viral yanıt oranları ile ilişkili olmayan, fakat kantitatif HBsAg seviyelerinin düşmesine sebep olan peg-IFN-adefovir kombinasyon tedavisi peg-IFN monoterapisine kıyasla umut vericiydi (54).

Optimal tedavi süresi bilinmemektedir ancak 1 yıllık tedavi en çok çalışılan ve kullanılan tedavidir. IFN'larla 1 yıllık tedavide, tedaviden 6 ay sonra hastaların yaklaşık %25'inde virolojik cevap ortaya çıkar (52, 54). Bu oran tedavi için yetersiz kalmaktadır. Birkaç pilot çalışma tedavi süresinin 2 yıla çıkarılması gerektiğini önermektedir (55, 56). Daha uzun çalışmaları destekleyen viral kinetik çalışmalar(57), KHD'nın Hepatit B ve Hepatit C'ye

kıyasla yanış yanıt verdiğini gösteren çalışma (58) tedavi süresinin artırılması gerektiğini savunmaktadır.

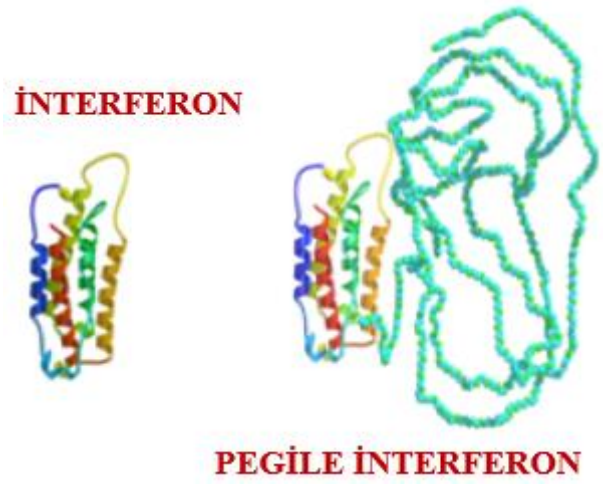
İNTERFERON TEDAVİSİ

İnterferonlar, immün sistem tarafından bakteri, virüs, parazit ve tümör hücrelerine karşı oluşturulan glikoprotein yapısındaki doğal proteinlerdir (Şekil 2.10.).

İnterferonlar; alfa, beta, gama ve tau olmak üzere 4 tiptir. İFN alfa, bazı antijen ve virüslerin uyarısı ile antikorlar tarafından salgılanırken; İFN gama antijenlerin uyarısı ile T lenfositlerinden salgılanır. Bunların yanı sıra İFN beta, fibroblast; İFN tau ise trophoblast hücrelerinden üretilir. İnterferonlar arasından İFN gama, en çok immünmodülatör etkiye sahip olmasına rağmen antiviral etkisi diğerlerine göre daha düşüktür (59).

İnterferonların 3 tip etki mekanizması bulunur. Antiviral etkisiyle viral RNA ve protein sentezini inhibe ederken, immünomodülatör etkisiyle doğal öldürücü hücre aktivitesini artırarak immün cevaba yardımcı olurlar. Antiproliferatif etkisiyle ise hücre çoğalmasını indükleyen veya ölümünü azaltan onkojenik virüslerin transforme edici etkisini baskılar.

Rekombinant İFN alfa molekülleri poli etilen glikol (PEG) ile bağlanarak **pegile interferon alfa** (peg-İFN alfa)'yı oluşturur. Pegilasyon, biyoteknolojik ürünlerin terapötik etkinliğini artırmak için yapılan bir işlemdir. Dolayısıyla peg-interferonlar, standart interferondan daha etkili olduğundan hepatit D tedavisinde daha çok tercih edilmektedir (60).



Şekil 2.10. IFN ve peg-IFN yapısı (59)

Pegilasyon işleminin tedaviye sağladığı birçok yarar vardır;

- Plazma yarı ömrünü artırır böylece ilaç kan dolaşımında daha uzun süre kalır,
- Plazma konsantrasyonunda daha az dalgalanma olur,
- Toksisite, immunojenite ve antijenite azalır,
- Enzimatik parçalanmayı önler,
- Potens (güç), fiziksel ve termal stabilite, in vivo aktivite artar,
- Hasta uyumu ve yaşam kalitesinin artar,
- Yan etkiler azalır (59)

Fakat interferonlar halen sistemik, otoimmün, hematolojik, immünolojik, nörolojik ve psikiyatrik gibi birçok yan etkiye sahiptir ve IFN'lerin gerçek tedavi başarısı çok düşüktür ve yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır (61-63). Halen faz 2 klinik çalışmalarında test edilen çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda HDV viryonunun hepatositlere girişi, HDV viryon düzeneği, HDV'nin hepatositlerden ekstrüzyonu gibi HDV yaşam döngüsünün çeşitli adımlarına müdahale etmeleri hedeflenir (64).

KHD TEDAVİSİNDE YENİ YAKLAŞIMLAR

Son 5 yılda KHD tedavisinde yeni ilaç keşfi yaklaşımları ortaya çıkmıştır. Bu ilaçlar HDV'nin yaşam döngüsünde çeşitli adımları hedeflemektedir. Bununla birlikte HBV'de işlevsel veya fonksiyonel her türlü yaklaşım HDV'nin tedavisine de katkı sunmaktadır.

Etkili tedavi için ideal işaret HBsAg klerensidir. Bununla birlikte, tedaviye kalıcı bir virolojik yanıtı olan hastaların, uzun süreli takipte HBsAg'ı temizleme şansı yüksektir. Kendi kurumumuzdan yapılan bir çalışmada, konvansiyonel veya peg-IFN'ye virolojik yanıtı olan hastaların %37'sinin ortalama 5 yıllık takipte HBsAg kaybettiği gösterilen çalışmalar mevcuttur (65). Şu anda KHD'nin yönetimi ile ilgili olarak araştırılan yeni bileşikler maddeler halinde gösterilmektedir ve yeni bileşikler hepatosit giriş inhibitörleri, farnesiltransferaz inhibitörleri ve nükleik asit polimerleridir (NAP) daha ayrıntılı olarak aşağıda tartışılacaktır.

- Hepatosit giriş inhibitörleri
- Farnesiltransferaz inhibitörleri
- Nükleik asit polimerleri
- siRNA'lar
- İmmünolojik Yaklaşımlar
- Toll benzeri reseptör antogonistleri
- Check-point inhibitörleri

- Hepatit B virüsü aşısı

1. Hepatosit Giriş İnhibitörleri

HBV'nin L-yüzey proteininin pre-S1 alanının 47 amino asidini içeren miristoyillenmiş bir lipopeptid olan Myrcludex B, ilk hepatosit giriş inhibitörüdür. Pre-S1 alandaki glisinin ve pre-S1 alandaki 77 amino asitin miristoyillenmesi hücresel bağlanma için önemli görünmektedir (66). Myrcludex B, hem intravenöz hem de subkütan formülasyonlarda test edilmiştir (67). 36 sağlıklı gönüllünün 5'inde geçici, asemptomatik serum lipaz yükselmesi gözlendi. Konjuge safra asitleri klinik sonuçlar olmadan arttı. Safra asitlerinin kardiyak aritmilerde rol oynadığı belirtilmelidir (68). Ek olarak, hematolojik parametrelerde hafif değişiklikler bildirilmiştir, ancak genel olarak Myrcludex B uygulamasının olumlu sonuçları bildirilmiştir (62, 67). Subkütan yol %85 biyolojik olarak kullanılabilirlik göstermiştir (67). Bir çalışmada, 24 hastaya 3 farklı tedaviyöntemi uygulandı. İlk gruba, 48 hafta peg-IFN monoterapisi, 2. gruba 24 hafta 2 mg / kg subkutan Myrcludex B verildi ve bundan sonra hastalara 48 hafta peg-IFN monoterapisi uygulandı. 3. gruba ise 6 ay Myrcludex B ile birlikte pegIFN tedavisi uygulanıp, ardından 6 aylık peg-IFN tedavisi uygulandı. Myrcludex B, 24 haftalık tedavinin sonunda 7 hastanın 6'sında HDV RNA'sında a>1 log10 azalmasına yol açmıştır (62). Bir hasta Myrcludex B ile monoterapi üzerinde HDV RNA negatif olmuştur. Myrcludex B'nin peg-IFN ile kombinasyonu daha etkili sonuç göstermiştir ve 7 hastanın 5'i HDV RNA negatif olmuştur. Myrcludex B ile, peg-IFN monoterapisi ve bunların kombinasyon tedavisi ile birlikte sırasıyla 1.67, 2.17 ve 2.59 log10'luk azalma meydana gelmiştir. 6 aylık tedaviden sonra 7 hastanın 5'inde uygulanan kombinasyon tedavisi ile gerçekleşen HDV RNA negatifliği umut verici sonuçlar oluşturmuştur ve kombinasyon tedavisi için sinerjistik bir etki önerilmiştir (62). Farklı doz ve tedavi süresi rejimlerine sahip Myrcludex B ile daha fazla çalışma beklenmektedir ve böyle bir çalışma halen devam etmektedir.

Myrcludex B, hem hepatit B hem de D için umut verici yeni bir ilaçtır. Yeni tedavinin KHD'da çok acil bir ihtiyaç olduğu kaçınılmaz bir gerçektir. Öncelikli olarak aşağıdaki sorunlar çözülmeye çalışılmalıdır.

(i) KHD tedavisinde kullanım için optimal doz ve süre araştırılmalıdır.

(ii) peg-IFN ile Myrcludex B kombinasyon tedavisinin, Peg-IFN monoterapisine göre üstünlüğünü ikna edici bir şekilde gösterilmelidir.

(iii) Güvenlik endişe verici görünmemektedir, ancak safra asitleri üzerindeki etkinin daha büyük bir hasta grubunda araştırılması gerekmektedir.

(iv) Günlük subkütan formülasyonu, oral bir formülasyonla değiştirme çabaları ciddiye alınmalıdır.

Hepatosit giriş inhibitörü myrcludex B, farnesiltransferaz inhibitörü lonafarnib ve nükleik asit polimerlerinin yan etkileri.

Myrcludex B

- ✓ Faz I çalışmasında lipaz ve amilaz yükselmesi gösterilmiştir ancak faz II çalışmasında yoktur.
- ✓ Belirgin klinik sonuçları olmadan taurin ve glisin ile konjüge safra asitlerinin yükselmesi saptanmıştır.
- ✓ Genellikle hafif ve geçici trombositopeni, nötropeni, lenfopeni ve eozinofili gözlenmiştir.

Lonafarnib

- ✓ Doza bağımlı veya düşük doz kohortlarında genellikle hafif ve iyi tolere edilen gastrointestinal toksisite gözlenmiştir (anoreksiya, kusma ile birlikte veya kusma olmadan mide bulantısı, ishal, kilo kaybı).

Nükleik asit polimerleri

- ✓ Saç dökülmesi, disfaji, anoreksiya, disjezi,
- ✓ Uygulama yoluna bağlı yan etkiler: periferik derece 1 hiperemi, ateş, titreme ve baş ağrısı gözlenmiştir.

2. Farnesiltransferaz İnhibitörleri

HDV viryonun montajı için büyük hepatit delta antijeninin prenillenmesi gereklidir. Farnesiltransferaz inhibitörleri, HDV için spesifiktir (69). Klinik öncesi çalışmalar *In vitro (70)* ve *in vivo* (71) olarak HDV benzeri partikül üretimini ortadan kaldırdıklarını ortaya koydu. Başka bir çalışmada ise, farnesiltransferaz inhibitörü lonafarnib (LNF) 14 KHD hastasında 28 gün boyunca test edildi. HDV RNA'nın doza bağımlı bir şekilde azalması gözlendi (61). LNF serum konsantrasyonları HDV RNA değişimi ile korelasyon gösterdi. LNF'nin bazı özellikleri verilmektedir. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde, ritonavir (RTN) ile peg-IFN kombinasyon tedavisi ve veya peg-IFN olmadan uygulanan tedavi için optimal doz süresi araştırıldı. İlk olarak LNF'li ve RTN'siz çalışmada LNF, 200 ve 300 mg'lık yüksek dozlarda,

peg-IFN ile veya RTN ile kombinasyon halinde test edilmiştir (72). LNF serum konsantrasyonları RTN ile 4-5 kat artmıştır. LNF-RTN ve LNF-peg-IFN kombinasyonları, 8 haftalık tedaviden sonra başlangıçtan 3 logs10 IU/mL'den fazla düşüşe yol açmıştır (72). Bir diğer çalışmada, LNF ve RTN ile optimal kombinasyon tedavisi ve LNF, RTN ve peg-IFN ile üçlü tedavi çalışmaları farklı süreler için test edilmiştir ve üçlü kombinasyon tedavisinin, en iyi tolere edilebilirlikle birleştirdiği görülmüştür (73). 24 haftalık tedaviden sonra 5 hastanın üçü HDV RNA negatif olmuştur.

3. Nükleik Asit Polimerleri (Nap)

NAP'lar sekanstan bağımsız fosforotiyoatlanmış oligonükleotitlerdir. Etki mekanizmaları net değildir. NAP'lar, viral döngüyü hedeflenmesine rağmen, hepatositlerdeki virüs sekresyonundan etkilenebilirler. Yüksek afinite ile amfipatik protein yapılarına bağlanırlar. Klinik öncesi çalışmalarda, ördeklerdeki HBV enfeksiyonunda NAP REP9-AC, hem *in vitro* (74) ve *in vivo* (75) da etkiliydi. İnsanlarda ilk faz I / II çalışması Bangladeş'te yapıldı. REP-2055 alan 8 HBeAg pozitif KHB hastasından yedisinde, 2 log'dan 7 log'a HBsAg'de azalmalar gösterilmiştir ve hastaların 3'ünde HBsAg temizlemiştir. 7 hastanın hepsinde anti-HBsAg titreleri gelişmiştir. Serum HBV DNA, 20 ila 27 haftalık tedaviden sonra 3 ila 7 log azalmıştır (76).

NAP'lar, çoğu vakada 6 ayı geçmeyen tedavi sürelerinden sonra hem KHD hem de KHB hastalarında HBsAg düşüşleri açısından en dramatik yanıt oranlarına yol açmıştır. KHD hastalarında, HBsAg miktarındaki azalma HDV RNA miktarındaki azalma ile ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte NAP'lar, disfaji gibi bazı olağandışı endişeleri de gündeme getirdi. Bu sebeple NAP ile monoterapi, daha iyi hazırlanmış ve yürütülmüş daha büyük çalışmalarda NAP-peg-IFN kombinasyonu ile karşılaştırılıp ele alınmalıdır. Ayrıca NAP'ların uygulama yolu (intravenöz infüzyon) da bu tedavi yaklaşımı için bir engel gibi görünmektedir.

4. İmmün Sistem Hedefli Yaklaşımlar

Terapötik aşılama yaklaşımları, yakın zamana kadar başarılı olamamıştır. Yeni yaklaşımlar: DNA aşıları (77), anti-HB bağışıklık kompleksleri (78), ve beta-glukosilseramid (79) gibi immünolojik olarak aktif adjuvanların kullanımıdır (79). Tip 1 IFN yanıtlarının indükleyicileri, toll-benzeri reseptörlerdir (TLR'ler). Birkaç klinik öncesi çalışma, TLR'lerin doğuştan gelen bağışıklık sisteminin indüklenmesindeki kilit rollerini doğrulamıştır (80). HBV DNA üzerinde, kısa tedavi süresine atfedilebilecek bir etki gözlenmemiştir.

Programlanmış ölüm proteini 1'i (PD1) ve PD1'in ligandını (PD-L1) hedefleyen ilaçlar, hem kanser immünoterapisinde hem de kronik viral hepatitte önemlidir. PD1'in bloke edilmesi, HBV'ye özgü T hücresi yanıtı aktive etmeyi amaçlar. Faz Ib klinik çalışmasında, immün sistem kontrol noktası inhibitörü nivolumab umut verici sonuçlar göstermiştir ve tek bir nivolumab dozundan sonra HBsAg seviyelerinde önemli bir düşüş gösterilmiştir (81). Fakat hepatotoksisite ve hedef dışı bağışıklık aktivasyonu bu tedavinin endişelerdir. İmmün terapinin gelecek yaklaşımları, DNA immünizasyonlu PD1 bloker ve NA tedavisi ile bir gibi kombinasyon immün terapisi kullanmak olabilir (82). siRNA'lar ve çeşitli immünolojik tedavi yaklaşımlarını temsil eder. Örneğin, Hepatit B'den tedavi dışı viral klerensin güçlü bağışıklık gerektirdiğini biliyoruz dolayısıyla, KHD tedavisinde bağışıklık temelli bir yaklaşım mantıklıdır. Bununla birlikte, viral etkinliği gösteren verilere ihtiyaç vardır. Şimdiye kadar bu tedavilerin başarı eksikliği ise, immünolojik sistemlerin kompleksliliğinden kaynaklanmaktadır.

5. Diğer Tedavi Yaklaşımları

Hepatit Delta tedavisinde kullanılmayı amaçlayan bir diğer yaklaşım, küçük susturucu RNA'lardır (siRNA'lar). ARC-520, RNA interferans aracılığıyla tüm HBV transkriptlerini azaltmak için tasarlanmış bir siRNA'dır ve KHB hastalarında yapılan bir faz IIa klinik çalışmasında tek bir enjeksiyondan sonra doza bağlı olarak HBsAg seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (83). Aynı bileşiğin çok dozlu çalışması (ayda bir kez 12 doza kadar) gerçekleştirilmiştir. Çoklu dozlama ile HBeAg-negatif hastalarda, HBeAg-pozitif hastalara göre HBsAg düzeylerinde daha fazla düşüş gözlenmiştir (84). ARC-520'nin iyi tolere edildiği bildirilmiştir, ancak taşıyıcı molekülle ilgili toksisite problemleri nedeniyle çalışma beklemeye alınmıştır.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

HDV, defektif bir RNA virüsü olması sebebiyle, yalnızca Hepatit B enfeksiyonu olan bireylerde enfeksiyon yapabilmektedir. Kronik HBV-HDV enfeksiyonu, genellikle siroza sebebiyet verir ve birlikte olan enfeksiyonun mortalite oranı, tek başına kronik HBV enfeksiyonundan daha yüksektir. HDV enfeksiyonu için hala ilaç denemeleri mevcut olsa da etkisi kanıtlanmış spesifik bir tedavi yoktur. Bununla birlikte tedavide kullanılan tek ilaç interferondur. Çalışmamızda HDV ile enfekte 13 farklı hastada, her hasta için, hastaların tedavilerinin takibi sürecinde tedavinin 0., 24., 48., 96. ve 200. haftaları alınan farklı serum örneklerinden elde edilen Hepatit Delta virüs havuzundaki viral varyantların yüksek duyarlılıkla tespit edilmesi amaçlanmıştır. Böylece kronik HDV enfeksiyonu olan hastaların tedavi öncesi, tedavi sırasında ve/veya tedavi sonrası varyasyon profilleri belirlenebilmesi, ayrıca HDV enfeksiyonunun tedavi altındaki evrimsel sürecinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen veriler ile hastaların sergiledikleri farklı klinik tabloların araştırılması da çalışmanın amaçları arasındadır.

Illumina sekanlama teknolojisi, sentez yoluyla sekanslama prensibine göre dizileme yapan teknolojilerden biridir. Illumina, derin sekanslama yaparak en minör allelleri bile kaçırmadığı için son derece güvenilir bir teknoloji olduğundan, virüs bazlı çalışmalarda çok tercih edilir. HBV, HCV, Epstein Barr gibi diğer virüslerde de tüm genom dizileme, varyant analizi gibi çalışmalarda kullanılmıştır (85-87). Çalışmamızda ise bu teknoloji, hepatit delta virüsünün tüm genomundaki varyasyonların taranması için farklı hastaların tedavi süreçleri boyunca farklı zamanlarda alınan serum örneklerinden elde edilen HDV genomları için kullanılacaktır. Yani nesil dizileme teknolojileriyle yapılmış sadece birkaç çalışma vardır(88-90). Illumina teknolojisiyle yapılan tek HDV çalışması HBV ve HDV'nin mono ve süper enfeksiyon durumlarında karakterizasyon çalışmasıdır (91). Dolayısıyla bu teknoloji dünyada ilk defa bizim projemizde HDV'nin interferon tedavisinin takibi için kullanılacaktır. Projemiz, HDV'nin tedavi öncesi ve sürecindeki örneklerden elde edilecek veriler ile, HDV viral havuzunun uygulanan tedaviden dolayı oluşan selektif baskı altında nasıl bir evrimsel süreçten geçtiğinin araştırılması açısından önemlidir. DNA dizi analizi yönteminde çığır açan bu yeni teknoloji ile elde edilecek bilgilerin hastaların klinik tabloları ile karşılaştırılması ile HDV enfeksiyonlarının tedavisinde uygulanacak yeni yöntemlere ışık tutması ve/veya hali hazırda uygulanan tedavi yöntemlerinin iyileştirilmesinde kullanılabileceği öngörülmektedir.

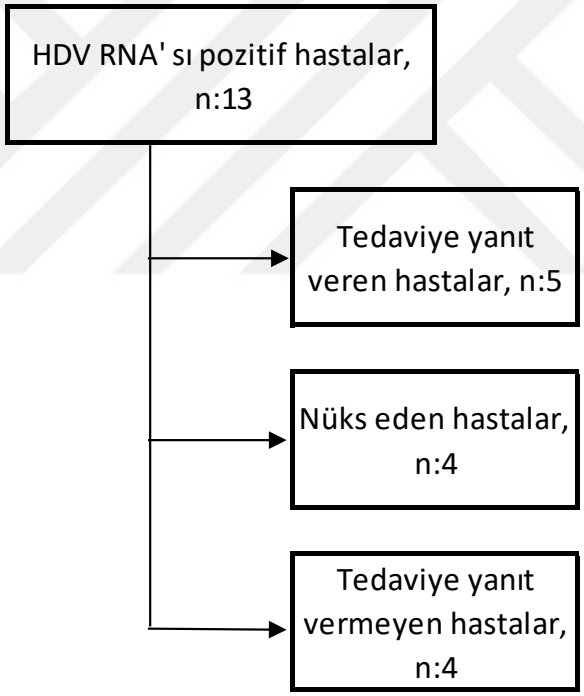
4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

HASTA SERUMLARI

Bu tez çalışmasına tedavi için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi'ne başvuran HDV RNA'sı pozitif toplam **13** hasta dahil edilmiştir (Çizelge 4.1.). Her bir hasta için tedavinin 0., 24., 48., 96., 200. haftaları alınan 5 farklı serum örnekleri çalışmada kullanılmıştır. Her farklı serumda HDV tüm genomu 5 farklı amplifikasyonla çoğaltılmıştır. Bu hasta serumları, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 28.01.2019 tarihli 02-146-19 karar numaralı etik kurul izni ile çalışılmıştır.

Çizelge 4.1. HDV RNA'sı pozitif hastaların dağılımı



KİMYASALLAR

Bu araştırmada kullanılmış kimyasalların üretici firması ve menşei ülkeler aşağıda gösterilmektedir (Çizelge 4.2.)

Çizelge 4.2. Kullanılan kimyasallar ve menşei

KİMYASALLAR	MENŞEİ

Çizelge 4.2. (devam)

Agaroz	Sigma, ABD, A9539
Asetik Asit	Riedel-de Haen, Almanya, 60 000 20
Bromofenol Mavisi	Sigma, Almanya, B6896
EDTA	Quantum, ABD, EDTA23
Etidyum Bromür	Sigma, Almanya, E8751
Etil Alkol %99,5	Kimetsan, Türkiye, KIM EL/01 EP
SDS	Sigma, Almanya
Tris	Vivantis, ABD, PR0612
HCl	Merch, Almanya, 314
PBS	Biochrom, Almanya

KİTLER VE ENZİMLER

Kullanılan kit ve enzimlerin marka, üretim yeri ve katalog numaraları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Kullanılan kitler, enzimler ve menşei

KİTLER ve ENZİMLER	MENŞEİ
High Pure Viral RNA Kit	Roche, Almanya, 11858882001
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Almanya, 04897030001
Premix Ex Taq™ Hot Start Version	Takara, Japon, RR030A

CİHAZLAR

Çalışmada kullanılan cihazlar ve marka, modeli aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Kullanılan cihazlar, marka ve modelleri

CİHAZLAR	MARKA ve MODELİ
Laminar Kabin	clanLAF, CB 1204
Distile Su Cihazı	GFL, 2002
Hassas Terazi	Sartorius, BP 110S
Jel Elektroforez Cihazı	Major Science, MP 300V
Jel Görüntüleme Sistemi	UV Transilluminator, UVP
Kuru Blok	Techne DRI BLOCK, DB 2D
Nanodrop 1000 Spektrofotometrisi	ACTGene, ASP-2680
pH metre	Mettler Toledo, MP 220
Thermal Cycler PZR Cihazı	ABI, 2720 Thermal Cycler
Santrifüj Cihazı	Hettich Zentrifugen, Mikro 200R
Vorteks Cihazı	Thermo Scientific, LP Vortex Mixer
Genetik Analiz Cihazı	Illumina-Miseq
DNA Ölçüm Cihazı	Qubit, İnvitrogen

STANDART TAMPON VE ÇÖZELTİLER

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltiler Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir. İçerikte gösterilen miktarlarda tamponlar hazırlanmıştır.

Çizelge 4.5. Kullanılan tampon ve çözeltiler

STANDART TAMPON ve ÇÖZELTİ	İÇERİK
TAE TAMPONU (10X)	48,4 gr Trisbase, 20 ml 0.5 M pH 8 EDTA, 11,42 ml Glacial Asetik asit, dH_2O ile 1000ml'ye tamamlandı.

Çizelge 4.5. (devam)

Agaroz Jel Yükleme Tamponu (6X)	%15 Fikol, %0,05 Bromofenol mavisi, %0,05 Ksilen siyanol

PRİMERLER

Bu araştırmada PZR'de kullanılmış primerler, çalışmanın yürütüldüğü Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü moleküler laboratuvarında HDV örneklerine yönelik kullanılan rutin analiz primerlerinin arasından seçilmiştir. Nested PZR kapsama bölgesi gereği, ileri ve geri primerler farklı çift primerlerden seçilip ve ΔG değerleri analizi yapılarak kapsama ve bağlanma açısından uygun olan primerler kullanılmıştır. Bu primerlerin dizin ve listesi Çizelge 4.6. ve 4.7.'de gösterilmektedir.

RT-PZR ve PZR'de Kullanılmış 1.Tur Primerler

1. tur PZR'de kullanılan primerler Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir (92).

Çizelge 4.6. Kullanılan 1. tur primerleri

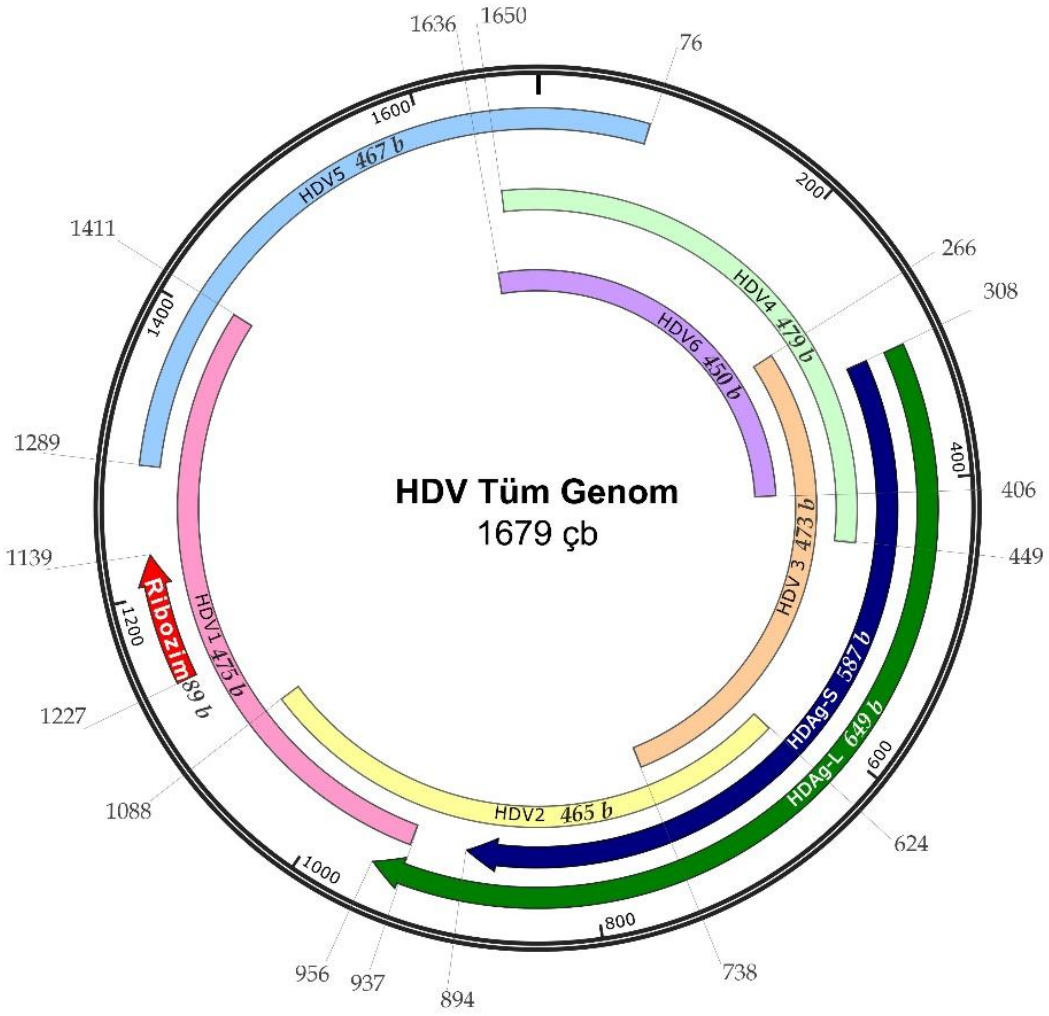
PRİMERLER	DNA DİZİSİ (5'→3')	REFERANS
HDV(D3) F	ACGAGTGAGGCTTATCCCGG	Rutin çalışmalar
HDV(E4) R	GAAGGAAGGCCCTCAAGAACAAGA	
HDV(1160) F	GCGGGCCGGCTACTCTTCTTT	
HDV(430) R	CTAGCCCCGTTGCTTTCTTTGCTTT	
HDV(720) F	GGCGCCGGCTGGGCAACATTCCGA	
HDV(710) R	GGAGGCTGGGACCATGCCGGCCA	

PZR'de kullanılmış 2. Tur Primerler

2. tur PZR'de kullanılan primer Çizelge 4.7.'de gösterilmiştir. Bu primerler kullanarak çoğaltılan alan ise Şekil 4.1.'de görünmektedir. Şekil 4.1.'de 2. tur PZR primerlerinin çoğalttıkları alanlara ek olarak HDV genomunun ribozim bölgesi ve S-HDAg ve L-HDAg gösterilmektedir.

Çizelge 4.7. Kullanılan 2. tur primerleri

PRİMERLER	DNA DİZİSİ (5'→3')	REFERANS
HDV1F	TCGTCCCCACATAGCAGA	Kendi tasarımımız
HDV1R	GAGTTGTCGAACCCAGTGAA	
HDV2F	TCCCTTAGCCATCCGAGT	
HDV2R	AGGCCCTCGAGAACAAGA	
HDV3F	ACTCTTCTTTCCCTTCTCTCGT	
HDV3R	GAAAAGAGTAAGAGCACTGAGGAT	
HDV4F	TGTCGTCCTCAAGTTTCTTGATTTT	
HDV4R	CCCGGAGTGCTTTCCAAA	
HDV5F	TGGAGACATCCTGGAAGGG	
HDV5R	GATGGACGGAATCGGGAG	
HDV6F	GTCCCTCTCGAGTTCCTCT	
HDV6R	CTCTCAACCCTTCGGCC	



Şekil 4.1. Primerlerle çoğaltılmış amplikonların ve önemli genlerin HDV genomu üzerindeki yerini gösteren şematik resim (Snapgene Software, GSL Biotech; www.snapgene.com)

4.2. YÖNTEM

GÖNÜLLÜ NİTELİĞİ

Çalışmamızda gönüllü olur formunu kabul ederek imzalayan bireylerden, HDV ile enfekte 13 farklı hastadan serum örnekleri alınmıştır. Bu hastalar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunun 28.01.2019 tarihli ve 02-146-19 sayılı kararına dayanan çalışmanın kapsamına alınan hastalardan seçilmiştir. Her hasta için, hastaların tedavilerinin takibi sürecinde 0., 24., 48., 96., ve 200. haftalarda alınan 5 farklı serum örneği çalışmada kullanılmıştır. Çalışmada cinsiyette herhangi bir kısıtlama koyulmazken, yaş sınırı yasalara uygun belirlenmiştir.

İnterferon tedavisine alınan ve tedaviye farklı cevaplar veren hastalar Çizelge 4.8.'de gösterildiği gibi araştırmaya dahil edilmiştir.

Çizelge 4.8. Araştırmaya dahil olma ve olmama kriterleri

Araştırmaya Dâhil Olma Kriterleri	**Araştırmaya Dâhil Olmama Kriterleri**
En az 6 aydır HbsAg ve anti delta (+) olma	Dekompanse karaciğer sirozu
ALT'nin normalin üst sınırından yüksek ve 10 mislinden düşük olması	Hepatosellüler karsinom varlığı
Tarama Vizitinde HDV-RNA pozitifliği	Başka karaciğer hastalığı varlığı
Kompanse karaciğer hastalığı	HCV ve HCV RNA pozitifliği
Hastalar 18-65 yaş arası olmalı	HIV pozitifliği
	Ciddi yandaş hastalık

Çizelge 4.8.'deki kriterlere uygun olarak seçilen hastaların serum örneklerinin viral yük miktarlarının belirlenmesi 2 çalışma referans alınarak yapılmıştır (93, 94). 13 hastanın hepsi **genotip-1 hastasıdır** ve farklı tarihlerdeki serum örneklerinin viral yükleri kopya/ml olarak Çizelge 4.9.'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. HDV RNA'sı pozitif 13 hastanın farklı tarihlerdeki viral yükleri (kopya/ml)

Hasta Durumu	Hasta	Başlangıç HDV-RNA	24.Hafta HDV-RNA	48.Hafta HDV-RNA	96.Hafta HDV-RNA	200. Hafta HDV-RNA
Yanıt Veren Hastalar	**MG**	5.68×10^5	3.51×10^5	2.72×10^4	<300	negatif
	MC	1.81×10^6	<300	1.04×10^4	negatif	negatif
	MY	9.53×10^4	negatif	negatif	negatif	negatif
	RC	3.76×10^5	negatif	negatif	negatif	negatif
	HA	7.69×10^4	negatif	negatif	negatif	negatif
Nüks eden Hastalar	**BG**	1.02×10^4	2.00×10^4	2.19×10^3	<300	3.9×10^4
	MB	1.59×10^5	1.15×10^3	negatif	negatif	7.1×10^4
	EK	3.10×10^4	5.95×10^4	3.07×10^3	negatif	7.00×10^4
	KK	8.02×10^4	negatif	negatif	<300	1.6×10^5

Çizelge 4.9. (devam)

Yanıt Vermeyen Hastalar	**FO**	8.10×10^{6}	5.85×10^{5}	2.31×10^{6}	2.68×10^{6}	4.1×10^{6}
	FOC	9.92×10^{4}	1.85×10^{4}	2.58×10^{4}	7.45×10^{4}	4.6×10^{5}
	MA	1.54×10^{6}	2.14×10^{6}	1.93×10^{5}	1.91×10^{6}	1.7×10^{6}
	YS	1.06×10^{6}	2.05×10^{5}	3.72×10^{4}	1.58×10^{5}	4.5×10^{5}

Yanıt veren hastalardan: MG hastasının 96. ve 200. haftalardaki serumları, MC hastasının 24., 96. ve 200. haftalardaki serumları, MY, RC ve HA hastalarının başlangıçtaki serumları hariç diğer serumları düşük viral yük sebebiyle çalışmaya alınmamıştır (Çizelge 4.9.).

Benzer şekilde nüks eden hastalardan: BG hastasının 96. haftadaki serumu, MB hastasının 48. ve 96. haftalardaki serumları, EK hastasının 96. haftadaki serumu ve KK hastasının 24., 48. ve 96. haftalardaki serumları düşük viral yük sebebiyle çalışmaya dahil edilmemiştir (Çizelge 4.9.).

HASTA SERUMUNDAN VİRAL RNA EKSTRAKSİYONU

Serumdan HDV RNA izolasyonu laminar kabin içerisinde, üretici firmanın "*High Pure Viral RNA*" (Roche) kiti içerisinde bulunan talimatlara göre yapıldı:

- 200 µl serum örneği, 4µl poli A içeren 200 µl bağlama tamponu (binding buffer) ile bir ependorf tüpüne konulur.
- İyice karıştırılır (Thermo, LP vortex, Kore) ve filtreli tüpe (high pure filter) aktarılır.
- 11000 rpm'de 15 saniye santrifüj (Hettich, Micro 200R, Almanya) edilir.
- Filtreden geçen sıvı atılır ve filtreli kolon 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon (inhibitör removal buffer) eklenir.
- 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Filtreden geçen sıvı atılır ve filtreli kolon 450 µl yıkama tamponu (wash buffer) eklenir.
- 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- 6. ve 7. basamaklar 2 kez tekrarlanır.
- 10 saniye 15000 rpm'de santrifüj edilir.
- Filtreli kolon 1,5 ml'lik steril ependorf tüpüne aktarılır ve 50 µl elüsyon tamponu (elution buffer) eklenir.

- 11000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek RNA elde edilir.

  Elde ettiğimiz viral RNA eğer o gün çalışacaksak +4°C’de, daha sonra çalışılacak ise -20°C ya da -80°C’de muhafaza edildi.

cDNA SENTEZİ

Serumdan izole edilen RNA, üretici firmanın "*Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*" (Roche) talimatlarına göre 2 aşamada yapıldı:

- RNA primer karışımının hazırlanması
  - Ekstrakte edilmiş 1µg (10 µl) viral RNA 0,2 ml’lik PZR tüpüne eklenir.
  - 2 µl random hexamer (600µM) solüsyonu eklenir.
  - 1 µl H_2O eklenir.
  - Yavaşça karıştırılır ve kısaca döndürerek çöktürülür.
  - 65°C ‘de 10 dakika inkübe edilir.
  - İnkübasyon sonrası buzda bekletilir.
- Transkripsiyon karışımının hazırlanması
  - Steril 1,5 ml’lik ependorf tüpüne 4 µl *Transkriptor Reaksyion Buffer* (5X) eklenir.
  - 2 µl *dNTP* karışımı (10mM) eklenir.
  - 0,5 µl *Protector Rnaase İnhibitör* (40U/µl) eklenir.
  - 0,5 µl *Transcriptor Reverse Transkiptaz* (20U/µl) eklenir.
  - Yavaşça karıştırılır ve kısaca döndürülerek çöktürülür.

13 µl olan RNA- primer karışımını içeren tüpe 7 µl Transkripsiyon karışımından eklenir ve Thermal cycler PZR (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler, Singapur) cihazına aşağıdaki sıcaklık ve döngüde konulur.

25°C 10 dk

55°C 30 dk

85°C 5 dk

Elde edilen cDNA’lar +4ºC kaldırılır.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

HDV genomu NCBI-Pubmed' den HQ005370.1 numaralı dizi referans alındığında 1679 baza sahiptir. Illumina-Miseq ile dizileme yapıldığından amplikonların yaklaşık 450 baz uzunluğuna sahip olması gerekmektedir. Bu sebeple tüm genom 5 farklı amplifikasyonla çoğaltılmıştır. Tezimizde spesifikliği artırmak için Nested PCR yapılmıştır. Illumina-Miseq'in tanıdığı Multiplex identifier (MID) ile birlikte 3. Tur PZR gerçekleştirilmiştir.

1. 1. Tur PZR

Çizelge 4.6.'da gösterilen primer çiftleri kullanılarak *Premix Ex Taq™ Hot Start* enziminin Çizelge 4.10.'daki protokolü uygulanarak 1. Tur PZR yapıldı.

Çizelge 4.10. 1. tur PZR reaksiyon karışımı ve koşulları

Reaksiyon Karışımı	**Miktarı**
Primer Extaq Buffer Enzim	12.5 µl
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
cDNA	5 µl
ddH20	5.5 µl
Toplam	25 µl

Döngü aşaması	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürasyon	95°C	10 dk	1 X
Denatürasyon	95°C	30 sn	30 X
Bağlanma	65°C	30 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Nihai uzama	72°C	10 dk	1 X

2. 2. Tur PZR

İlk tur PZR tamamlandığında Çizelge 4.7.'deki primer çiftleri kullanılarak Çizelge 4.11.'deki reaksiyon karışımı ve koşullarına göre *Premix Ex Taq™ Hot Start* enzimiyle 2. Tur PZR

yapılmıştır. Bu sayede 2.tur PZR ile Illumina'ya spesifik primerlerin bağlanması için diziye adaptör diziler takılmıştır.

Çizelge 4.11. 2. tur PZR reaksiyon karışımı ve koşulları

Reaksiyon Karışımı	**Miktarı**
Primer Extaq Buffer Enzim	12.5 µl
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
PZR ürünü	5 µl
ddH20	5.5 µl
Toplam	25 µl

Döngü aşaması	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürasyon	95°C	10 dk	1 X
Denatürasyon	95°C	30 sn	30 X
Bağlanma	65°C	30 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Nihai uzama	72°C	10 dk	1 X

3. 3. Tur PZR

2. tur tamamlandığında PZR'lerin parlaklığı ve spesifikliği %2'lik agaroz jelde kontrol edildi. Bantlar istenilen spesifiklikte ve parlaklıkta olduğunda 3. tur PZR aşamasına geçildi. 3. tur PZR'de Illumina-Miseq'e spesifik primer MID'leri kullanılarak *Premix Ex Taq™ Hot Start* enzimi ile Çizelge 4.12.'ye göre PZR yapıldı. 2. tur PZR örnekleri 1/1000 dilüe edilerek PZR gerçekleştirildi. Daha sonra tekrar %2'lik agaroz jelde bant parlaklığı ve spesifikliği kontrol edilerek temizleme işlemine geçildi. Spesifik olmayan bantlar görüldüğünde veya bantlar istenilen parlaklıkta olmadığında PZR tekrarlandı ve tekrar jelde görüntüleme işlemi yapıldı. Jel görüntülerinden birkaçı Şekil 5.1.' de gösterilmektedir. 3. Tur PZR'de farklı olarak döngü sayısı düşürülmüştür (Çizelge 4.12.).

Çizelge 4.12. 3. Tur PZR reaksiyon karışımı ve koşulları

Reaksiyon Karışımı	**Miktarı**		
Primer Extaq Buffer Enzim	12.5 µl		
Forward Primer (12.5 pmol)	4 µl		
Reverse Primer (12.5 pmol)	4 µl		
DNA (1/1000)	1 µl		
ddH20	3.5 µl		
Toplam	25 µl		
Döngü aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95°C	3 dk	1 X
Denatürasyon	95°C	30 sn	19 X
Bağlanma	65°C	30 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Nihai uzama	72°C	10 dk	1 X

4.2.5. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ

PZR ürünleri, agaroz jel elektroforez yöntemiyle aşağıdaki işlemler takip edilerek görüntülendi.

- 0.900 gr agaroz, 45 ml 1X TAE tamponuyla (%2'lik) karıştırılır.
- Mikrodalga da agaroz eriyene kadar ısıtılır (ortalama 1-2 dk).
- Mikrodalgadan çıkarılır ve soğuması için bekletilir.
- 1-2 µl etidyum bromür eklenir.

- Tarak jel tabağına yerleştirilir ve jel dökülür.
- Jel donduğunda (ortalama 30-60 dk) tarak çıkarılır ve jelin üstünü kaplayacak miktarda 1X TAE tamponu ilave edilir.
- İlk kuyucuğa QX174 DNA Marker'ından 3,5 µl yüklenir.
- 5 µl PZR amplifikasyon ürünü, 1 µl yükleme tamponu (boyası) ile karıştırılır ve kuyucuklara yüklenir.
- 100 V'de 35 dakika yürütülür.
- U.V ışık altında DNA bantları görüntülenir.

2. tur PZR'den sonra yüklenen PZR örneklerinin jel görüntüleri Şekil 4.2.'de gösterilmektedir. İstenilen bant parklaklığı ve spesifikliği elde edilmediğinde PZR tekrarlanmıştır.

➢ Yükleme Boyası Hazırlama

10X yükleme boyası Çizelge 4.13.'deki kimyasallar ile hazırlandı. Sonra 6X olacak şekilde seyreltildi. Her PZR ürünü yükleme boyası ile karıştırılarak görüntüleme işlemine geçildi.

Çizelge 4.13. Yükleme boyası için gerekli kimyasallar

KİMYASAL	**MİKTAR**
Bromfenol Mavisi	25 mg
Ksilen Siyanol	25 mg
Gliserol	3.3 mL
ddH_2O	6.7 mL
Toplam	**10 mL**

➢ TAE Tamponu Hazırlama

10X TAE tamponu Çizelge 4.14.'deki kimyasallara ve miktarlara göre hazırlandı. Jel hazırlama için 1X'e seyreltildi. Elektroforez tankı ve jelde 1X TAE kullanıldı. TAE ile hazırlanmış jel görüntülerinden birkaçı Şekil 5.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.14. TAE tamponu için gerekli kimyasallar

KİMYASAL	MİKTAR
Trisbase	48.4 gr
0,5 M EDTA (pH:8)	20 mL
Glacial Asetik Asit	11.42 mL
ddH_2O	968.58 mL
Toplam	**1000 mL**

- 0,5 M EDTA Hazırlama

9,3 gr EDTA distile su ile 50 mL'ye tamamlanır, balık ile karıştırıcıda karıştırılır. Çözmek için berrak renk görünene kadar yavaşça sodyum hidroksit eklenir.

PCR TEMİZLEME İŞLEMİ

Illumina-Miseq'de dizilenmeden önce yapılan 3. tur PZR örneklerimiz PZR pürifikasyon işlemine tabii tutulur. PZR temizlemede "*Agencourt AMPure XP PCR Purification*" kiti kullanıldı. Bu kiti protokolü aşağıdaki gibidir.

- 20 µl PCR örneği için 36 µl AMPure XP eklenir.
- 10 kere pipetaj yapılıp, 5 dk oda ısısında inkübe edilir.
- Agencourt SPRIP 96 Super Magnet Plate'e örnekler yerleştirilip 2 dk bekletilir.
- Süpernatant kısım atılır.
- 200 µl %70'lik alkol eklenip pipetaj yapılır, 30 sn inkübe edilir.
- Süpernatant atılır.
- Tekrar 200 µl %70'lik alkol eklenip pipetaj yapılır, 30 sn inkübe edilir.
- Süpernatant atılır.
- Agencourt SPRIP 96 Super Magnet Plate'den örnekler çıkarılır. 40 µl distile su eklenir. 10 kez pipetaj yapılır. 2 dk oda ısısında inkübe edilir.

DNA MİKTARINI ÖLÇME

Yeni nesil dizilemenin ilk aşaması olan kütüphane oluşturma aşamasına geçmek için, temizlediğimiz PZR örneklerimizin, ds-DNA miktarları ölçülmüştür. *Invitrogen Qubit 4*

Florometre, DNA, RNA ve protein miktarını doğru bir şekilde ölçmek için tasarlanmış cihazdır. Qubit 4, ayrıca RNA bütünlüğünü ve kalitesini kolayca ölçer. Aşağıdaki adımlara göre ölçme işlemi gerçekleştirilir.

- Qubit tüpleri her örnek için isimlendirilir.
- Her örnek için Qubit ds-DNA HS Buffer'dan 199 µl koyulur.
- 1 µl HS Reagent eklenerek karışım solüsyonu hazırlanır.
- 2'şer µl temizlenmiş PZR örneklerinden tüplere dağıtılır.
- Qubit Florometre'de ds-DNA ve yüksek spesifite seçilerek ölçüm gerçekleştirilir.

YENİ NESİL DİZİLEME

Hepatit Delta virüsü, yüksek oranda genetik değişkenlik gösterir (*quasispecies*). Bu durum genetik olarak özgün varyant havuzunu oluşturmaktadır.

Yakın tarihlere kadar çoğu viral genom projesi, sanger sekanslama yöntemi kullanılarak tamamlanmıştır. Sanger sekanslamanın zahmetli, zaman alıcı ve düşük verimli olması sebebiyle bilim insanları yeni nesil dizileme platformlarına yönelmiştir. Yüksek verimli sekans tekniklerinin ilerlemesiyle yeni nesil dizileme teknolojisi gelişmiş, giderek ticarileşerek yaygın kabul görmüştür. Şu anda 3. nesil dizileme platformlarının çıkmasıyla birlikte amplifikasyona gerek duyulmadan, daha kısa sürede, daha uzun okuma uzunluğu sağlanabilmektedir.

Çalışmamızda "**Illumina Miseq yeni nesil dizileme platformu"** kullanılmıştır. Yüksek doğrulukla milyonlarca okuma sağlayan Illumina dizileme yöntemi, diğer yöntemlere kıyasla güvenilir, hızlı ve ucuzdur. Illumina teknolojisinde tüm reaksiyon mikroskop slaytına benzer katı bir fazda, baz senteziyle dizileme prensibiyle gerçekleştirilir (100-450 baz). Illumina teknolojisinin çalışma prensibi kısaca şöyledir;

- Adaptörler eklenerek genomik DNA hazırlanır.
- Flow cell kanallarının yüzeyine rastgele tek zincirli DNA fragmanları bağlanır.
- Etiketlenmemiş nükleotitler ve enzim eklenir, solid fazda amplifikasyon köprüsü oluşur.
- Enzim nükleotitleri birleştirir ve solid fazda fragmanlar çift zincirli hale gelir.
- Çift zincirli moleküller denatüre edilir.
- Bütün flow cell kanallarında çift zincirli DNA üretilerek amplifikasyon tamamlanır.
- Lazer uyarımından sonra flow cell'deki her küreden floresans yayılır ve böylece görüntü yakalanır. Her kürenin ilk bazı belirlenir.

- Çoklu kimyasal döngülerle dizi okunur.
- Veriler hizalanır, referans ile kıyaslanır ve sekans farklılıkları tanımlanır (24).

PZR temizleme işleminden sonra yapılan Qubit ölçümlerine göre dilisyonlar meydan getirilerek örnekler pool haline getirildi. En soon pool 10 nm'e düşürüldü. Daha sonra bu miktar 4nm'e düşürülerek yükleme aşamasına geçildi.

➢ Cihaza Yükleme

Illumina-Miseq cihazına dilüe edilen örnekler aşağıdaki adımlar izlenerek yükleme gerçekleştirildi.

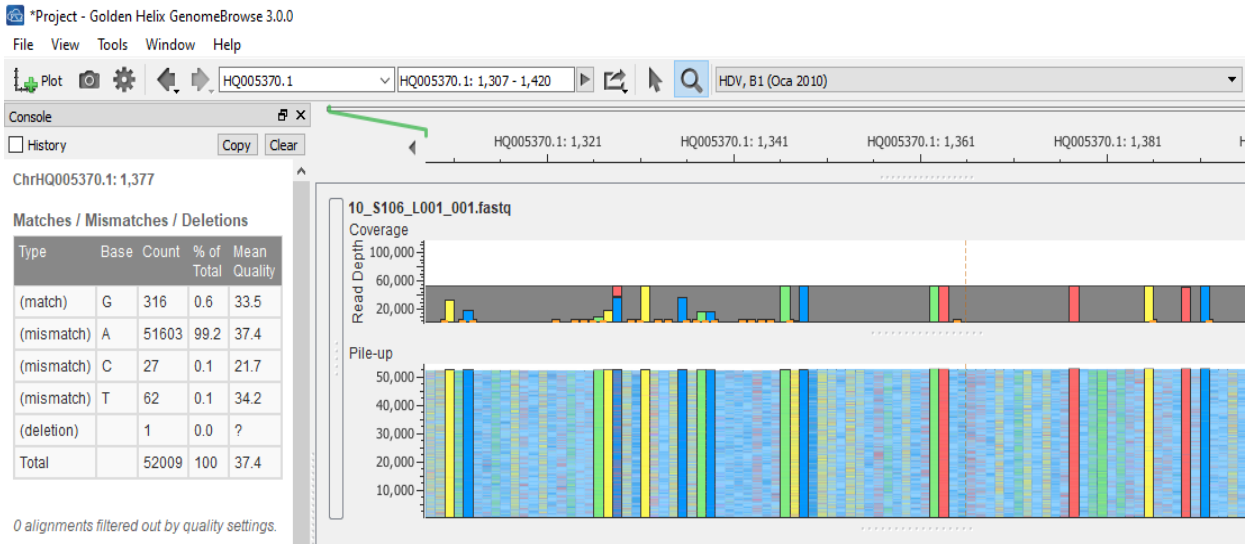
(20 µL 1N NaOH + 80 µL H_2O = 100 µL 0,2N NaOH)

- 2 µL 10nM örnek + 3 µL H_2O = 5 µL 4nM örnek + 5 µL 0,2N NaOH = 2nM örnek- (5 dk inkübasyon) + 990 µL HT1 Buffer = 1000 µL 20pM
- 2 µL 10 nM Phix kontrol + 3 µL AE Buffer (Qiagen) = 5 µL 4nM Phix. + 5 µL 0,2N NaOH = 2nM PhiX- (5'dakika ink.) + 990 µL HT1 Buffer = 1000 µL **20pM Phix**
- 187 µL 20pM Phix + 112,5 µL HT1 Buffer = **12,5pM Phix**
- **Nano V2 ve Standart V2 Kit** (500 cycle) :240 µL 20pM örnek havuzu + 330 µL HT1 Buffer + 30 µL 12,5pM Phix = **600 µL 8pM örnek**
- **V3 Kit** (600 cycle): 300 µL 20pM örnek havuzu + 270 µL HT1 Buffer + 30 µL 20pM Phix = **600 µL 10pM örnek**
- 3 µL R1, I1 ve R2 primerleri + 597 µL HT1 Buffer = **600 µL Primer**

Kartuş üzerindeki uygun bölümlere 8 pM 600 µL örnek ve 600 µL primerler yüklenir.

➢ Sonuçların Analizi

Illumina-Miseq'de yüksek doğrulukla dizilenen amplikonlarımızın analizi için "Golden Helix Genome Browser" programı kullanılmıştır (Şekil 4.2.). Öncelikle HQ005370.1 HDV genomu referans dizi olarak programa tanıtılıp, analiz için gerekli düzenlemeler yapılmıştır.

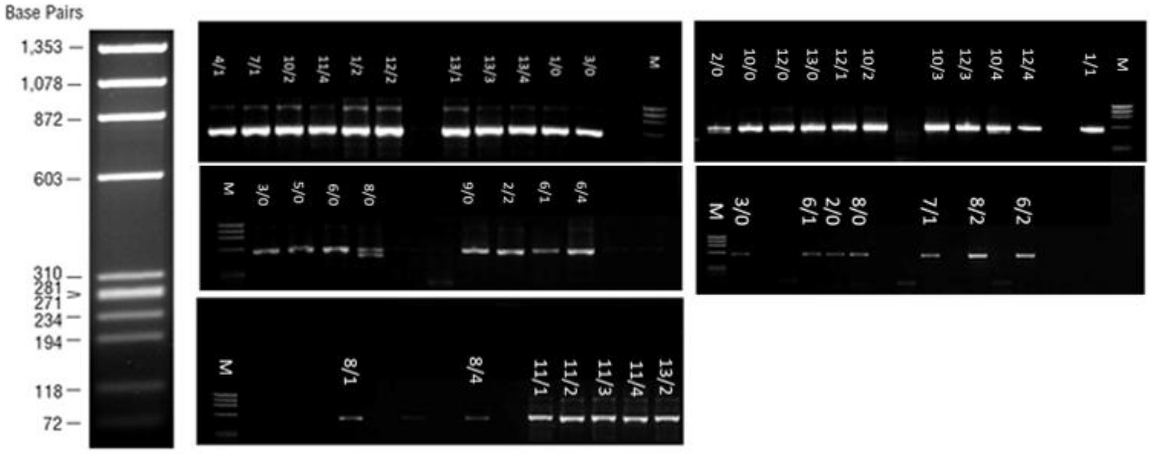


Şekil 4.2. Golden Helix-Genome Browser TNP analizi

Programın orta kısmında dizi bilgisi mevcuttur. Tek nokta polimorfizmleri renkli olarak ilgili dizi üzerinde görülmektedir (Şekil 4.2.). Polimorfizmlere çift tıklatıldığında soldaki sekme açılır ve bu sekmede referans bazın ne olduğu, hangi yanlış eşleşmelerin hangi miktarda okunduğu gösterilmektedir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

PZR ürünleri, %2'lik agaroz jelde elektroforez yöntemiyle görüntülendi. Şekil 5.1.'de jel görüntülerinden bazıları gösterildi. Silik ya da spesifik olmayan bantlar görüntülendiğinde PZR tekrarlandı ve tekrar görüntülendi.



Şekil 5.1. Çoğaltılmış amplikonların doğrulanması için PZR ürünlerinin 2X agaroz jel elektroforezi görüntüsü ve QX174 DNA Marker

5.1. NÜKS ETMİŞ VE YANIT VERMEMİŞ HASTALARIN, YANIT VERMİŞ HASTALARLA KARŞILAŞTIRILMASI

Nüks etmiş ve yanıt vermemiş hastalar, yanıt vermiş hastalarla kıyaslandığında, ortaya çıkan nükleotit farklılıkları Şekil 5.2.'de gösterilmiştir. Referans dizi esas alınarak 266. nükleotitte yanıt vermiş örneklerde yoğunlukla Guanin görünürken yanıt vermemiş ve nüks etmiş örneklerde Adenin görülmektedir. Benzer bir şekilde 268. nükleotitte yanıt vermiş örneklerde yoğunlukla Guanin görünürken yanıt vermemiş ve nüks etmiş örneklerde Timin görülmektedir. Benzer farklılıklar 269., 568., 927. ve 928. nükleotidlerde görülmektedir (Şekil 5.2.). 266., 268., 269. nükleotitlerdeki değişimler hiper değişken bölgede meydana gelmesinden ötürü önem arz etmektedir. Benzer şekilde 927. ve 928. nükleotitlerde meydana gelen değişimler S-HDAg ve L-HDAg'de gerçekleşmesinden dolayı önemlidir.

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	HİPER DEĞİŞKEN BÖLGE			Okuma Derinliği		Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg	
				266	268	269		568		927	928
HQ005370.1				G	G	T		A		G	T
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	3880	–	–	%100 A	7500	–	4000	–	%100 G
		48	100	***	***	%100 A	100	***	500	%50 A	%50G/%50C
	>MY	0	550	–	–	%100 A	550	–	500	–	–
	>RC	0	100	***	***	***	250	%100 T	480	–	–
	>HA	0	350	–	–	%100 A	450	%100 T	320	%100 A	%100 C
	>MG	0	550	–	–	***	750	–	560	–	%100 G
		24	100	***	*	***	100	***	100	***	%100 G
		48	100	***	***	***	100	***	100	***	%100 G
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	550	%100 A	%100 T	–	660	%100 T	580	%100 A	%100 C
		24	1050	%100 A	%100 T	–	250	%100 T	470	%100 A	%100 C
		48	850	%100 A	%100 T	–	200	%100 T	1200	%100 A	%100 C
		200	700	%100 A	%100 T	–	500	%100 T	550	%100 A	%100 C
	>EK	0	100	%100 A	%100 T	–	100	***	100	***	%100 C
		24	550	%100 A	%100 T	–	100	***	440	%100 A	%100 C
		48	100	%100 A	%100 T	–	150	***	530	%100 A	%100 C
		200	100	%100 A	%100 T	–	800	%100 T	750	%100 A	%100 C
	>KK	0	600	***	***	%100 A	350	–	600	%80 C	***
	>MB	0	100	%100 A	%100 T	–	100	%100 T	750	%100 A	%100 C
		24	500	%100 A	%100 T	%100 C	250	%100 T	550	%100 A	%100 C
		200	100	%100 A	%100 T	–	100	%100 T	100	%100 A	%100 C
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	26800	%100 A	%100 T	–	4000	%100 T	10500	%100 A	%100 C
		24	5200	%100 A	%100 T	–	38000	%100 T	8800	%100 A	%100 C
		48	600	%100 A	%100 T	–	1200	%100 T	700	%100 A	%100 C
		96	850	%100 A	%100 T	–	850	%100 T	450	%100 A	%100 C
		200	100	%100 A	%100 T	–	350	%100 T	450	%100 A	%100 C
	>YS	0	850	%100 A	%100 T	–	670	%100 T	800	%100 A	%100 C
		24	700	%100 A	%100 T	–	420	%100 T	950	%100 A	%100 C
		48	1050	%100 A	%100 T	–	570	%100 T	750	%100 A	%100 C
		96	850	%100 A	%100 T	–	100	%100 T	750	%100 A	%100 C
		200	700	%100 A	%100 T	–	640	%100 T	500	%100 A	%100 C
	>FO	0	500	%100 A	%100 T	–	500	%100 T	600	%100 A	%100 C
		24	730	%100 A	%100 T	–	550	%100 T	650	%100 A	%100 C
		48	850	%100 A	%100 T	–	600	%100 T	520	%100 A	%100 C
		96	100	%100 A	%100 T	–	100	%100 T	100	%100 A	%100 C
		200	100	%100 A	%100 T	–	100	%100 T	100	%100 A	%100 C
	>MA	0	600	%100 A	%100 T	–	640	%100 T	550	%65 C %35 A	%80 C
		24	800	%100 A	%100 T	–	400	%100 T	550	%100 C	–
		48	450	%100 A	%100 T	–	500	%100 T	600	%65 C %35 A	–
		96	700	%100 A	%100 T	–	400	%100 T	250	%100 C	–
		200	100	%100 A	%100 T	–	650	%100 T	600	%100 C	–

Şekil 5.2. Nüks etmiş ve yanıt vermeyen hastaların, yanıt veren hastalar ile karşılaştırılması

Oluşan bu önemli polimorfizmlerin 927. ve 928. baz lokasyonunda meydana gelmesi ile amino asit değişikliğine sebep olması söz konusudur. Normal dizide **Treonin** amino asiti mevcutken; tedaviye yanıt veren hastalarda genellikle **Prolin** amino asitine dönüşüm söz konusudur. Yanıt vermeyen ve nüks eden hastalarda ise **Valin** amino asitine dönüşüm dikkat çekmektedir. 2 farklı hastada ise (MA, KK) **Serin** amino asitine dönüşüm mevcuttur (Şekil 5.3.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg S-HDAg		AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ			
HQ005370.1				927	928	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
				G	T				
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	–	%100 G	AGT	T	AGG	P
		48	500	%50 A	%50G/%50C	AGT	T	AGG	P
	>MY	0	500	–	–	AGT	T	AGT	T
	>RC	0	480	–	–	AGT	T	AGT	T
	>HA	0	320	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
	>MG	0	560	–	%100 G	AGT	T	AGG	P
		24	100	***	%100 G	AGT	T	AGG	P
		48	100	***	%100 G	AGT	T	AGG	P
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	580	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		24	470	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		48	1200	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		200	550	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
	>EK	0	100	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		24	440	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		48	530	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		200	750	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
	>KK	0	600	%50 C	***	AGT	T	ACT	S
	>MB	0	750	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		24	550	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		200	100	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	10500	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		24	8800	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		48	700	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		96	450	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		200	450	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
	>YS	0	800	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		24	950	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		48	750	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		96	750	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		200	500	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
	>FO	0	600	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		24	650	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		48	520	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		96	100	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
		200	100	%100 A	%100 C	AGT	T	GTT	V
	>MA	0	550	%65 C %35 A	%80 C	AGT	T	GTT	V
		24	550	%100 C	–	AGT	T	ACT	S
		48	600	%65 C %35 A	–	AGT	T	ACT	S
		96	250	%100 C	–	AGT	T	ACT	S
		200	600	%100 C	–	AGT	T	ACT	S

Şekil 5.3. 927. ve 928. nükleotitlerde meydana gelen değişimlerin sebep olduğu amino asit değişimleri

Bu nükleotit lokasyonlarındaki değişimlere ek olarak 292., 316., 319., 942., 952., 981 ve 982. nükleotitlerdeki değişimler de yanıt veren- nüks etmiş hastalar ile yanıt vermeyen hastalar arası farklılık gözlenmektedir (Şekil 5.4.).

292. nükleotidde tedaviye yanıt veren hastalarda ağırlıklı olarak Guanin görülürken, yanıt vermeyen ve nüks eden hastalarda Sitozin bazı mevcuttur (Şekil 5.4.).

316. ve 319. nükleotidde genellikle yanıt veren hastalarda sırasıyla Adenin ve Timin bazları görülürken, nüks etmiş ve yanıt vermemiş hastalarda Guanin çoğunluğu dikkat çekmektedir (Şekil 5.4.).

942., 952., 981. ve 982. nükleotitlerde ise yanıt vermeyen hastalarda sırasıyla Adenin, Sitozin, Timin, Timin bazları mevcuttur (Şekil 5.4.). Yanıt veren hastalarda 942. nükleotidde Guanin, 952. nükleotidde Timin, 981. ve 982. nükleotidde Sitozin bazı mevcuttur (982. nükleotidde MY hastası Guanin). Nüks eden bazlarda da benzer değişimler söz konusudur (Şekil 5.4.). 981. Ve 982. bazlarda meydana gelen polimorfizmler S-HDAg ve L-HDAg'de meydana gelmesiyle amino asit değişimlerine de sebep olmaktadır. Örneğin, 942. nükleotidde referans kodonun amino asiti **Valin** iken Adenin nükleotitinin Guanine dönüşmesi **Prolin** amino asitine dönüşmeye neden olmuştur (Şekil 5.14.). Benzer şekilde 952. nükleotidde Sitozinden Timine değişim **Glutamik asit'**ten **Lizin** amino asiti değişimine neden olmuştur (Şekil 5.15.). 981. ve 982. nükleotitlerde meydana gelen polimorfizmlerin de neden olduğu değişimler Şekil 5.16.'da gösterilmektedir.

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	292	316	319	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg 942	952	981	982
HQ005370.1				C	A	T		A	C	T	T
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	3600	%100 G	–	%100 G	4500	–	%100 T	–	–
		48	100	%100 G	–	–	500	%100 G	%100 T	%80 C	%80 C
	>MY	0	600	–	–	–	500	%100 G	–	%100 C	%100 G
	>RC	0	100	***	***	***	450	%100 G	–	–	–
	>HA	0	250	–	–	–	300	–	–	–	–
	>MG	0	550	%100 G	–	–	800	–	%100 T	–	%100 C
		24	100	%100 G	–	–	100	–	%100 T	–	–
		48	100	***	–	–	100	–	%100 T	–	–
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	800	–	%100 G	%100 G	600	–	–	–	–
		24	1800	–	%100 G	%100 G	500	–	–	–	–
		48	1300	–	%100 G	%100 G	1200	–	–	–	–
		200	1000	–	%100 G	%100 G	550	–	–	–	–
	>EK	0	100	–	–	%100 G	100	–	–	–	–
		24	750	–	–	%100 G	450	–	–	–	–
		48	100	***	–	%100 G	550	–	–	–	–
		200	100	***	–	%100 G	800	–	–	–	–
	>KK	0	800	–	–	%100 G	550	–	–	%80 C	%60 G
	>MB	0	100	–	–	%100 G	750	%100 G	%100 T	%100 C	%100 C
		24	400	–	–	%100 G	500	%100 G	%100 T	%100 C	%100 C
		200	100	***	–	%100 G	100	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	51000	–	%100 G	%100 G	11000	–	–	–	–
		24	11000	–	%100 G	%100 G	10000	–	–	–	–
		48	750	–	%100 G	%100 G	700	–	–	–	–
		96	750	–	%100 G	%100 G	500	–	–	–	–
		200	100	–	–	***	500	–	–	–	–
	>YS	0	1300	–	%100 G	%100 G	800	–	–	–	–
		24	1000	–	%100 G	%100 G	950	–	–	–	–
		48	2000	–	%100 G	%100 G	750	–	–	–	–
		96	800	–	%100 G	%100 G	750	–	–	–	–
		200	700	–	%100 G	%100 G	550	–	–	–	–
	>FO	0	700	–	%100 G	%100 G	600	–	–	–	–
		24	1200	–	%100 G	%100 G	700	–	–	–	–
		48	1300	–	%100 G	%100 G	550	–	–	–	–
		96	100	–	%100 G	%100 G	100	–	–	–	–
		200	100	–	%100 G	%100 G	100	–	–	–	–
	>MA	0	600	–	–	%100 G	500	–	–	–	–
		24	800	–	–	%100 G	550	–	–	–	–
		48	430	–	–	%100 G	530	–	–	–	–
		96	650	–	–	%100 G	250	–	–	–	–
		200	100	–	–	%100 G	550	–	–	–	–

Şekil 5.4. Nüks etmiş ve yanıt vermeyen hastalar ile yanıt veren hastaların karşılaştırılması

5.2. NÜKS ETMİŞ HASTALARIN, YANIT VERMİŞ HASTALARLA KARŞILAŞTIRILMASI

Nüks etmiş hastaların, yanıt vermiş hastalarla kıyaslandığında, belli bölgelerde ortaya çıkmış nükleotit farklılıkları Şekil 5.5'de gösterilmiştir. Referans dizi esas alınarak Şekil 5.2.'de gösterilen nükleotidlere ilaveten 226. nükleotitte yanıt veren hastalarda çoğunlukla Sitozin

görülürken, nüks etmiş hastalarda çoğunlukla Timin görülmektedir. Benzer bir şeklide 749. nükleotitte yanıt veren hastalarda çoğunlukla Guanin görülürken nüks etmiş hastalarda çoğunlukla Adenin görülmektedir (Şekil 5.5.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	HİPER DEĞİŞKEN BÖLGE				Okuma Derinliği		Okuma Derinliği	L-HDAg		
											S-HDAg		
				226	266	268	269		568		749	927	928
HQ005370.1				C	G	G	T		A		G	G	T
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	3880	–	–	–	%100 A	7500	–	4000	–	–	%100 G
		48	100	***	***	***	%100 A	100	***	500	%50 A	%50 A	%50G/%50C
	>MY	0	550	–	–	–	%100 A	550	–	500	–	–	–
	>RC	0	100	***	***	***	***	250	%100 T	480	–	–	–
	>HA	0	350	–	–	–	%100 A	450	%100 T	320	–	%100 A	%100 C
	>MG	0	550	–	–	–	***	750	–	560	–	–	%100 G
		24	100	***	***	***	***	100	***	100	***	***	%100 G
		48	100	***	***	***	***	100	***	100	***	***	%100 G
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	550	%100 T	%100 A	%100 T	–	660	%100 T	580	%100 A	%100 A	%100 C
		24	1050	%100 T	%100 A	%100 T	–	250	%100 T	470	%100 A	%100 A	%100 C
		48	850	%100 T	%100 A	%100 T	–	200	%100 T	1200	%100 A	%100 A	%100 C
		200	700	%100 T	%100 A	%100 T	–	500	%100 T	550	%100 A	%100 A	%100 C
	>EK	0	100	***	%100 A	%100 T	–	100	***	100	%100 A	***	%100 C
		24	550	–	%100 A	%100 T	–	100	***	440	%100 A	%100 A	%100 C
		48	100	***	%100 A	%100 T	–	150	***	530	%100 A	%100 A	%100 C
		200	100	***	%100 A	%100 T	–	800	%100 T	750	%100 A	%100 A	%100 C
	>KK	0	600	–	***	***	%100 A	350	–	600	%80 A	%80 C	***
	>MB	0	100	%100 T	%100 A	%100 T	–	100	%100 T	750	%100 A	%100 A	%100 C
		24	500	%100 T	%100 A	%100 T	%100 C	250	%100 T	550	%100 A	%100 A	%100 C
		200	100	%100 T	%100 A	%100 T	–	100	%100 T	100	%100 A	%100 A	%100 C

Şekil 5.4. Nüks etmiş hastalar ile yanıt veren hastaların karşılaştırılması

5.3. DİĞER PATTERNLER

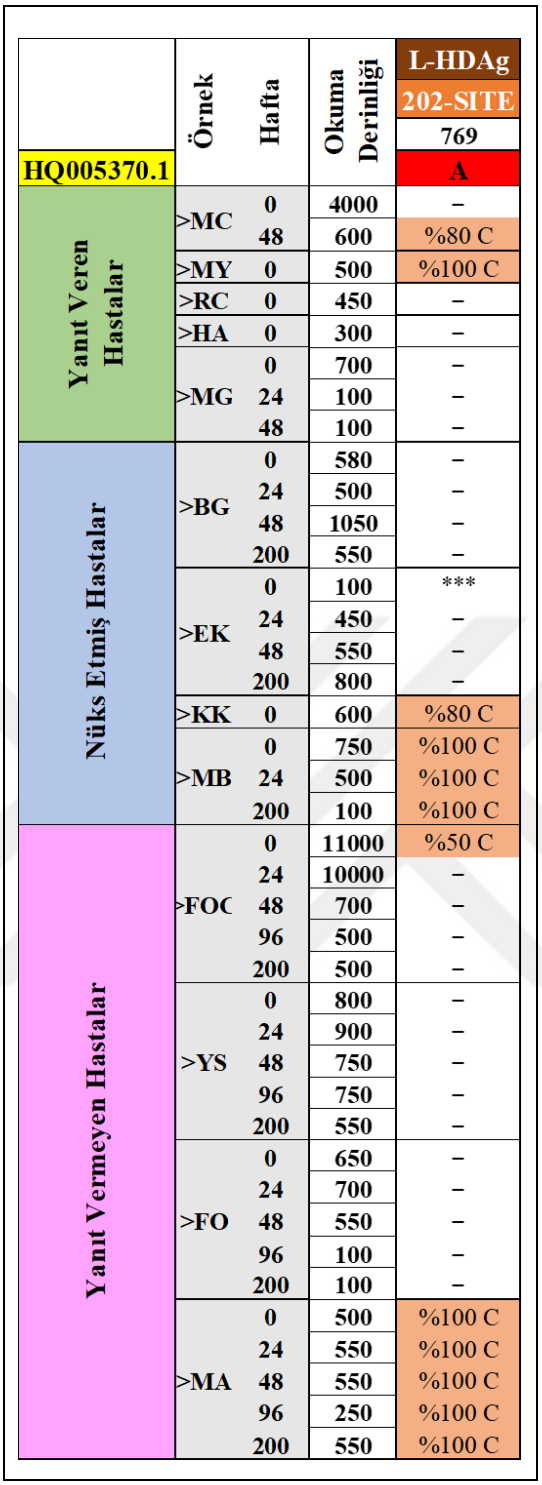
Genom dizileri incelendiğinde 425. nükleotidden sonraki 4 nükleotid uzunluğunda bir bölgede örnekler arasında farklılık gösteren paternler görülmektedir. Referans dizideki patern "ACTG" iken yanıt veren hasta serum örneklerinin çoğunda (3/5) "GCTG" görülmektedir ancak yanıt vermemiş hastaların yarısında (2/4) ve nüks etmiş hastaların yaklaşık olarak yarısında bu dört nükleotidde delesyon meydana gelmiş ve çerçeveyi kaydırarak "GGTC" paternine dönüşmüştür (Şekil 5.6.).

Yanıt vermeyen YS ve FO hastalarında ise sadece 426. nükleotidde Guanin'e değişim görülmektedir. Nüks eden ve yanıt vermeyen hastalarda, hiper değişken bölgede ve otokatalitik kırılma bölgesinde gerçekleşen 4 bazlık delesyon tedavi seyri açısından önem arz edebilir (Şekil 5.6.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	HİPER DEĞİŞKEN BÖLGE			OTOKATALİTİK KIRILMA BÖL.
				426	427	428	429
HQ005370.1				A	C	T	G
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	8500	%50 DEL	–	–	–
		48	100	***	***	***	***
	>MY	0	550	%100 G	–	–	–
	>RC	0	250	%100 G	–	–	–
	>HA	0	400	%100 G	–	–	–
	>MG	0	500	–	–	–	%50 DEL
		24	100	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	500	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL
		24	250	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL
		48	120	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL
		200	400	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL
	>EK	0	100	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***
		48	150	–	–	–	–
		200	900	%100 G	–	–	–
	>KK	0	400	–	–	–	–
	>MB	0	100	–	–	%100 DEL	%100 DEL
		24	250	–	–	%100 DEL	%100 DEL
		200	100	–	–	%100 DEL	%100 DEL
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	7000	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL
		24	35000	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL
		48	1000	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL
		96	700	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL
		200	350	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL
	>YS	0	750	%100 G	–	–	–
		24	450	%100 G	–	–	–
		48	650	%100 G	–	–	–
		96	100	%100 G	–	–	–
		200	660	%100 G	–	–	–
	>FO	0	530	%100 G	–	–	–
		24	580	%100 G	–	–	–
		48	720	%100 G	–	–	–
		96	100	%100 G	–	–	–
		200	100	%100 G	–	–	–
	>MA	0	600	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL
		24	350	%65 DEL / %35 G	%60 DEL	%100 DEL	%100 DEL
		48	450	%65 DEL / %35 G	%60 DEL	%100 DEL	%100 DEL
		96	250	%100 DEL	%60 DEL	%100 DEL	%100 DEL
		200	550	%65 DEL / %35 G	%60 DEL	%100 DEL	%80 DEL

Şekil 5.5. Hiper değişken bölgede meydana gelen değişimler

Büyük delta antijen (L-HDAg) geni üzerinde bulunan 202 bölgesi (767, 768, 769. nükleotitler) HDAg'nin çok korunmuş C-terminal ucunda bulunmaktadır. C-terminal bölgesi nükleotit dizisi açısından korunmuş bir bölge olmasına rağmen, 202 nolu pozisyonun 769. nükleotitinde 6 farklı hastadanın serum örneklerinde Adenin bazından Sitozin'e değişim söz konusudur (Şekil 5.7.).



	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg 202-SITE 769 A
HQ005370.1				
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	–
		48	600	%80 C
	>MY	0	500	%100 C
	>RC	0	450	–
	>HA	0	300	–
	>MG	0	700	–
		24	100	–
		48	100	–
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	580	–
		24	500	–
		48	1050	–
		200	550	–
	>EK	0	100	***
		24	450	–
		48	550	–
		200	800	–
	>KK	0	600	%80 C
	>MB	0	750	%100 C
		24	500	%100 C
		200	100	%100 C
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	11000	%50 C
		24	10000	–
		48	700	–
		96	500	–
		200	500	–
	>YS	0	800	–
		24	900	–
		48	750	–
		96	750	–
		200	550	–
	>FO	0	650	–
		24	700	–
		48	550	–
		96	100	–
		200	100	–
	>MA	0	500	%100 C
		24	550	%100 C
		48	550	%100 C
		96	250	%100 C
		200	550	%100 C

Şekil 5.6. 202 bölgesi nükleotid nokta polimorfizmi

5.4. TÜM GENOMDA OLASI ÖNEMLİ TEK NOKTA POLİMORFİZMLERİ (TNP)

Şekil 5.8'de farklı nükleotitlerde gerçekleşen polimorfizmler görülmektedir.

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	37	62	66	71	75	109
HQ005370.1				A	T	A	G	T	G
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	3600	–	–	–	–	–	–
		48	100	–	–	–	–	–	–
	>MY	0	600	–	–	–	–	–	–
	>RC	0	100	***	***	***	***	***	***
	>HA	0	250	***	***	***	***	***	–
	>MG	0	550	–	%80 C	–	–	–	–
		24	100	–	–	–	–	–	–
		48	100	–	–	–	–	–	–
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	800	%100 T	%100 DEL	%100 G	%100 C	–	%100 DEL
		24	1800	%100 T	%100 DEL	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL
		48	1300	%100 T	%100 DEL	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL
		200	1000	%100 T	%100 DEL	%100 G	%100 C	–	–
	>EK	0	100	–	%100 G	%100 G	–	–	–
		24	750	–	%100 G	%100 G	–	–	–
		48	100	–	%100 G	%100 G	–	–	–
		200	100	–	%100 G	%100 G	–	–	–
	>KK	0	800	–	–	%100 G	–	–	–
	>MB	0	100	–	–	%100 G	–	–	–
		24	400	–	–	%100 G	–	–	–
		200	100	–	–	%100 G	–	–	–
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	51000	%100 T	%100 DEL	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL
		24	11000	%100 T	%100 DEL	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL
		48	750	%100 T	%100 DEL	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL
		96	750	%100 T	%100 DEL	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL
		200	100	%100 T	%100 DEL	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL
	>YS	0	1300	***	***	***	***	***	–
		24	1000	***	***	***	***	***	–
		48	2000	***	***	***	***	***	–
		96	800	–	–	–	–	–	–
		200	700	***	***	***	***	***	–
	>FO	0	700	***	***	***	%100 C	***	–
		24	1200	***	***	***	***	***	–
		48	1300	***	***	***	***	***	–
		96	100	***	***	***	***	***	–
		200	100	***	***	***	***	***	–
	>MA	0	600	–	%100 A	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL
		24	800	–	%100 A	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL
		48	430	–	%100 A	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL
		96	650	–	%100 A	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL
		200	100	–	%100 A	%100 G	%100 C	%100 C	%100 DEL

Şekil 5.7. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-1

Şekil 5.9'da görülen **113.** nükleotidde yanıt vermeyen 2 hastada (FOC, MA) Guanin bazı görülürken, 2 hastada (YS, FO) Adenin bazı dikkat çekmektedir. Nüks etmiş BG hastasında benzer şekilde Guanin görülürken, HA hastası (Sitozin) hariç yanıt veren hastalarda Timin bazı görülmektedir.

114. nükleotidde, yanıt veren hastaların 0. haftalarında genellikle Guanin görülürken, interferon tedavilerinin ileri haftalarındaki homozigotluklar dikkat çekmektedir. Nüks etmiş EK ve KK

hastalarında Guanin mevcutken; BG hastasında Sitozin mevcuttur. Yanıt vermeyen YS hastası hariç tüm hastalarda da Sitozin bazı mevcuttur. **142.** nükleotidde, yanıt veren tüm hastalarda Guanin bazı mevcutken; nüks etmiş BG, MB hastalarında ve yanıt vermeyen MA hastası hariç tüm hastalarda Adenin bazı mevcuttur. 292-293. nükleotidler arası ise Guanin insersiyonu görülmektedir (Şekil 5.9.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	113	114	117-118	142	288	289	292-293	300
HQ005370.1				T	T	INS.	G	C	T	INS.	A
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	3600	–	%100 G	–	–	–	–	–	% 80 T
		48	100	–	–	–	–	–	–	–	–
	>MY	0	600	–	%100 G	–	–	–	–	–	–
	>RC	0	100	***	***	***	***	***	***	***	***
	>HA	0	250	%100 C	–	–	–	–	–	–	–
	>MG	0	550	–	%100 G	–	–	–	–	–	% 80 T
		24	100	–	–	–	–	–	–	–	–
		48	100	–	–	–	–	–	–	–	–
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	800	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	%100 A	%100 A	%100 G	%100 INS G	%100 T
		24	1800	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	%100 A	%100 A	%100 G	%100 INS G	–
		48	1300	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	%100 A	%100 A	%100 G	%100 INS G	–
		200	1000	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	%100 A	%100 A	%100 G	%100 INS G	–
	>EK	0	100	–	%100 G	–	–	%100 T	%100 C	–	–
		24	750	–	%100 G	–	–	%100 T	%100 C	–	–
		48	100	–	%100 G	–	–	%100 G	%100 C	–	–
		200	100	–	%100 G	–	–	%100 G	%100 C	–	–
	>KK	0	800	–	%100 G	–	–	%100 G	%100 A	%100 INS AG	–
	>MB	0	100	–	–	–	%100 A	–	–	–	–
		24	400	–	–	–	%100 A	–	–	–	–
		200	100	–	–	–	%100 A	–	–	–	–
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	51000	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	%100 A	%100 A	%100 G	%100 INS G	%100 T
		24	11000	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	%100 A	%100 A	%100 G	%100 INS G	%100 T
		48	750	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	%100 A	%100 A	%100 G	%100 INS G	%100 T
		96	750	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	%100 A	%100 A	%100 G	%100 INS G	%100 T
		200	100	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	%100 A	%100 A	%100 G	%100 INS G	%100 T
	>YS	0	1300	%100 A	–	–	%100 A	%100 A	%100 A	–	–
		24	1000	%100 A	–	–	%100 A	%100 A	%100 A	–	–
		48	2000	%100 A	–	–	%100 A	%100 A	%100 A	–	–
		96	800	%100 A	–	–	%100 A	%100 A	%100 A	–	–
		200	700	%100 A	–	–	%100 A	%100 A	%100 A	–	–
	>FO	0	700	%100 A	%100 C	–	%100 A	%100 A	%100 G	–	–
		24	1200	%100 A	%100 C	–	%100 A	%100 A	%100 G	–	–
		48	1300	%100 A	%100 C	–	%100 A	%100 A	%100 G	–	–
		96	100	%100 A	%100 C	–	%100 A	–	%100 G	–	–
		200	100	%100 A	%100 C	–	%100 A	–	%100 G	–	–
	>MA	0	600	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	–	%100 T	–	%100 INS G	–
		24	800	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	–	–	–	%100 INS G	%100 T
		48	430	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	–	–	–	%100 INS G	%100 T
		96	650	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	–	–	–	%100 INS G	%100 T
		200	100	%100 G	%100 C	% 100 INS ACGC	–	–	–	%100 INS G	%100 T

Şekil 5.8. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-2

340. ve **341.** nükleotitlerde yanıt vermeyen hastalarda genellikle Guanin bazı mevcutken; yanıt veren ve nüks etmiş hastaların çoğunda sırasıyla Adenin ve Sitozin bazları mevcuttur. 332. nükleotidde Guanin bazının delesyonu mevcuttur (Şekil 5.10.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	308	332	333	334	338	340	341	342
HQ005370.1				A	G	C	G	G	A	C	C
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	3600	–	–	–	–	–	–	–	–
		48	100	–	–	–	–	–	–	–	–
	>MY	0	600	–	–	–	–	–	–	–	–
	>RC	0	100	***	***	***	***	***	***	***	***
	>HA	0	250	–	–	–	–	–	%100 G	%100 G	–
	>MG	0	550	–	–	–	–	–	–	–	–
		24	100	–	–	–	–	–	–	–	–
		48	100	–	–	–	–	–	–	–	–
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	800	%100 G	% 100 DEL	%100 A	%100 T	%100 A	–	–	%100 G
		24	1800	%100 G	% 100 DEL	%100 A	%100 T	%100 A	–	–	%100 G
		48	1300	%100 G	% 100 DEL	%100 A	%100 T	%100 A	–	–	%100 G
		200	1000	%100 G	% 100 DEL	%100 A	% 100 DEL	%100 A	–	–	%100 G
	>EK	0	100	%100 G	–	–	–	–	–	–	–
		24	750	%100 G	–	–	–	–	–	% 100 DEL	–
		48	100	%100 G	–	–	–	–	–	% 100 DEL	–
		200	100	%100 G	–	–	–	–	%100 G	%100 G	–
	>KK	0	800	%100 G	–	–	–	–	–	% 100 DEL	–
	>MB	0	100	–	–	–	–	–	–	–	–
		24	400	–	–	–	–	–	–	–	–
		200	100	–	–	–	–	–	–	–	–
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	51000	%100 G	% 100 DEL	%100 A	%100 T	% 80 A	%100 G	–	%100 G
		24	11000	%100 G	% 100 DEL	%100 A	%100 T	% 80 A	%100 G	–	%100 G
		48	750	%100 G	% 100 DEL	%100 A	%100 T	% 80 A	%100 G	–	%100 G
		96	750	%100 G	% 100 DEL	%100 A	%100 T	% 80 A	%100 G	%100 G	%100 G
		200	100	%100 G	–	–	–	–	%100 G	%100 G	%100 G
	>YS	0	1300	–	–	–	–	–	%100 G	%100 G	–
		24	1000	–	–	–	–	–	%100 G	%100 G	–
		48	2000	–	–	–	–	–	%100 G	%100 G	–
		96	800	–	–	–	–	–	%100 G	%100 G	–
		200	700	–	–	–	–	–	%100 G	%100 G	–
	>FO	0	700	–	–	%100 G	%100 T	–	%100 G	%100 G	–
		24	1200	–	–	% 100 DEL	%100 T	–	%100 G	%100 G	–
		48	1300	–	–	% 100 DEL	%100 T	–	%100 G	%100 G	–
		96	100	–	–	–	%100 T	–	%100 G	%100 G	–
		200	100	–	–	–	%100 T	–	%100 G	%100 G	–
	>MA	0	600	%100 G	% 100 DEL	%100 T	%100 T	%100 A	–	–	%100 G
		24	800	%100 G	% 100 DEL	%70 A / %30 T	%100 T	%100 A	–	–	%100 G
		48	430	%100 G	% 100 DEL	%65 A / %35 T	%100 T	%100 A	–	–	%100 G
		96	650	%100 G	% 100 DEL	%60 T / % 40 A	%100 T	%100 A	–	–	%100 G
		200	100	%100 G	% 100 DEL	%60 T / % 40 A	%100 T	%100 A	–	–	%100 G

Şekil 5.9. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-3

Şekil 5.11.'de görülen 388. nükleotidde nüks eden BG ve MB hastalarında, yanıt vermeyen FOC ve MA hastalarında Timin bazı mevcutken, diğer hastalarda Sitozin bazı mevcuttur. Benzer şekilde 707. nükleotidde yanıt vermeyen ve nüks eden hastalarda Timin bazı değişimi dikkat çekmektedir (Şekil 5.11.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	388	568	574	707	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg 800	851	854
HQ005370.1				C	A	T	C		A	G	G
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	8800	–	–	–	–	4500	–	–	–
		48	100	–	–	–	%50 T	500	%60 T/%40G	–	%80 A
	>MY	0	550	–	–	–	–	500	–	–	%100 C
	>RC	0	100	–	%100 T	–	–	450	–	–	–
	>HA	0	450	–	%100 T	%100 DEL	–	300	%100 G	%100 A	%100 T
	>MG	0	600	–	–	–	%100 T	800	%100 DEL	–	–
		24	100	***	***	***	***	100	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	100	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	600	%100 T	%100 T	%100 G	%100 T	600	%50 C/ %50 T	%100 A	%100 T
		24	250	%100 T	%100 T	%100 G	%100 T	500	%75 T/ %25 C	%80 A	%100 T
		48	170	%90 T	%100 T	%80 G	%100 T	1200	%100 T	–	%100 T
		200	500	%100 T	%100 T	%100 G	%100 T	550	%100 T	%80 A	%100 T
	>EK	0	100	–	–	–	–	100	–	–	%100 A
		24	100	–	–	–	–	450	–	–	%100 A
		48	150	–	–	–	–	550	–	–	%100 A
		200	920	–	%100 T	–	–	800	%100 G	%50 A	%65T / %35A
	>KK	0	350	–	–	–	%80 T	550	–	–	%80 C
	>MB	0	100	%100 T	%100 T	–	%100 T	750	%75 T/ %25 C	–	%100 A
		24	250	%100 T	%100 T	–	%100 T	500	%100 C	–	%100 A
		200	100	%100 T	%100 T	–	%100 T	100	%100 C	–	%100 A
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	4000	%100 T	%100 T	%100 G	%100 T	11000	%100 T	–	%100 T
		24	38000	%100 T	%100 T	%100 G	%100 T	10000	%100 C	–	%100 T
		48	1200	%100 T	%100 T	%100 G	%100 T	700	%100 C	–	–
		96	850	%100 T	%100 T	%100 G	%100 T	500	%100 C	–	%100 T
		200	350	%100 T	%100 T	%100 G	%100 T	500	%100 C	–	%100 A
	>YS	0	780	–	%100 T	%100 DEL	–	800	%100 G	%100 A	%100 T
		24	450	–	%100 T	%100 DEL	–	950	%100 G	%100 A	–
		48	650	–	%100 T	%100 DEL	–	750	%100 G	%100 A	%100 T
		96	100	–	%100 T	%100 DEL	–	750	%100 G	%100 A	%100 T
		200	650	–	%100 T	%100 DEL	–	550	%100 G	%100 A	%100 T
	>FO	0	550	–	%100 T	%100 DEL	–	600	%100 G	%100 A	%100 T
		24	600	–	%100 T	%100 DEL	–	700	%100 G	%100 A	%100 T
		48	710	–	%100 T	%100 DEL	–	550	%100 G	%100 A	%100 T
		96	100	–	%100 T	%100 DEL	–	100	%100 G	%100 A	%100 T
		200	100	–	%100 T	%100 DEL	–	100	%100 G	%100 A	%100 T
	>MA	0	700	%100 T	%100 T	–	%100 T	500	–	–	%80 A
		24	400	%100 T	%100 T	–	%100 T	550	–	–	–
		48	450	%100 T	%100 T	–	%100 T	530	–	–	–
		96	400	%100 T	%100 T	–	%100 T	250	–	–	–
		200	600	%100 T	%100 T	–	%100 T	550	–	–	–

Şekil 5.10. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-4

1022. ve **1023.** nükleotitlerde ki nüks eden ve yanıt vermeyen hastalardaki sırasıyla Sitozin ve Guanin değişimleri aynı hastalarda ve peş peşe gelmiştir (Şekil 5.12.). Bu nükleotidler S-HDAg ve L-HDAg üzerinde bulunduğundan amino asit değişimine sebep olur (Şekil 5.17.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg 1022	1023	1026	1028	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg 1070	1094	1095
HQ005370.1				T	C	G	A		A	T	C
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4500	–	–	–	–	4000	–	–	–
		48	500	–	–	–	–	100	***	***	***
	>MY	0	500	%100 C	–	–	%100 C	850	–	–	–
	>RC	0	450	–	–	%100 DEL	%100 DEL	100	***	***	***
	>HA	0	300	–	–	–	%100 T	100	***	***	***
	>MG	0	800	–	–	–	%100 C	100	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	100	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	100	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	600	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	750	%100 G	%60 G/ %40 C	%100 T
		24	500	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	750	%100 G	%60 C / % 40 G	%100 T
		48	1200	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	1000	%100 G	%60 C / % 40 G	%100 T
		200	550	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	100	%100 G	%60 C / % 40 G	%100 T
	>EK	0	100	%100 C	%100 G	–	–	100	***	***	***
		24	450	%100 C	%100 G	–	%100 C	100	***	***	***
		48	550	%100 C	%100 G	–	%100 C	100	***	***	***
		200	800	%100 C	%100 G	–	%100 C	100	***	***	***
	>KK	0	550	%100 C	%80 G	%80 C	%50 G / %50 C	100	***	***	***
	>MB	0	750	–	–	–	–	100	***	***	***
		24	500	–	–	–	–	100	***	***	***
		200	100	–	–	–	–	100	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	11000	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	50000	%100 G	%80 C	%80 T
		24	10000	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	10046	%100 G	%80 C	%80 T
		48	700	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	1200	%100 G	%80 C	%80 T
		96	500	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	1100	%100 G	%80 C	%80 T
		200	500	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	550	%100 G	%80 C	%80 T
	>YS	0	800	–	–	–	%100 T	500	–	%80 C	–
		24	950	–	–	–	%100 T	550	–	–	–
		48	750	–	–	–	%100 T	500	–	–	–
		96	750	–	–	–	%100 T	600	–	–	–
		200	550	–	–	–	%100 T	1100	–	–	–
	>FO	0	600	–	–	–	%100 T	600	%100 T	%100 A	%100 T
		24	700	–	–	–	%100 T	850	%100 T	%100 A	%100 T
		48	550	–	–	–	%100 T	850	%100 T	%100 A	%100 T
		96	100	–	–	–	%100 T	800	%100 T	%100 A	%100 T
		200	100	–	–	–	%100 T	850	%100 T	%100 A	%100 T
	>MA	0	500	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	100	***	***	***
		24	550	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	100	***	***	***
		48	530	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	100	***	***	***
		96	250	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	100	***	***	***
		200	550	%100 C	%100 G	%100 C	%100 G	100	***	***	***

Şekil 5.11. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-5

1235. nükleotidde nüks eden ve yanıt vermeyen hastalarda (BG, FOC, YS, FO) Guanin bazı dikkat çekmektedir. Benzer şekilde eksik okumalar mevcut olsa da 1264. nükleotidde aynı hastalarda Sitozin bazı mevcuttur. Diğer hastalar referans dizi ile benzerdir (Şekil 5.13.).
1292., 1293. ve 1294 aynı kodonun nükleotitleridir. Bu nükleotitlerdeki değişimler amino asit değişimine sebep olduğu için olası önemlidir (Şekil 5.21.).

1292. nükleotidde nüks eden ve yanıt vermeyen 4 hastada (BG, FOC, YS, FO) Timin bazı mevcutken; 1293. ve 1294. nükleotitlerde Adenin bazı mevcuttur. Benzer şekilde aynı

hastalarda 1295. nükleotidde Sitozin, 1346. nükleotidde Guanin ağırlığı dikkat çekmektedir (Şekil 5.13.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg									
				S-HDAg									
				1235	1264	1277	1292	1293	1294	1295	1346	1373-1374	1388
HQ005370.1				A	T	C	C	T	G	T	A	INS.	C
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	–	–	–	%65 A/ %35 G	%100 G	%100 C	–	–	–	–
		48	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	>MY	0	850	–	–	–	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	–	%100 C	–	–
	>RC	0	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	>HA	0	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	>MG	0	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	–	–
		24	750	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	–	–
		48	1000	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	–	–
		200	100	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	–	–
	>EK	0	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	>KK	0	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	>MB	0	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	50000	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	–	–
		24	10046	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	–	–
		48	1200	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	–	–
		96	1100	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	–	–
		200	550	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	–	–
	>YS	0	500	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	%100 T INS	%100 G
		24	550	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	%100 T INS	%100 G
		48	500	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	%100 T INS	%100 G
		96	600	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	%100 T INS	%100 G
		200	1100	%100 G	%100 C	%100 T	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	%100 T INS	%100 G
	>FO	0	600	%100 G	%100 C	–	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	%100 T INS	%100 G
		24	850	%100 G	%100 C	–	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	%100 T INS	%100 G
		48	850	%100 G	%100 C	–	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	%100 T INS	%100 G
		96	800	%100 G	%100 C	–	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	%100 T INS	%100 G
		200	850	%100 G	%100 C	–	%100 T	%100 A	%100 A	%100 C	%100 G	%100 T INS	%100 G
	>MA	0	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		96	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Şekil 5.12. Tüm genomda olası önemli TNP'ler-6

5.5. TÜM GENOMDA OLASI ÖNEMLİ AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ

S-HDAg, 785-1372. nükleotitler arası kodlanan bölgedir. Şekil 5.8. ile 5.13. arası gösterilen tablolardaki olası önemli polimorfizmler yanlış anlamlı veya sessiz mutasyonlara sebep olmaktadır. Bu kodlanan bölge içinde gerçekleşen önemli amino asit farklılıkları tabloları ise Şekil 5.14. ile Şekil 5.24. arası gösterilmektedir. Gerçekleşen baz değişimlerinin amino asit düzeyinde de farklılıklara sebep olması tedavi seyrine olası etkisini daha da artırmaktadır.

942. nükleotidde yanıt veren ve nüks eden MC, MY, RC, MB hastalarında Adenin bazından Guanin'e olan dönüşüm amino asiti de değiştirmiştir. Bu hastalarda aminoasit **Valin**'den **Prolin**'e dönüşmüştür (Şekil 5.14.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg	AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ			
HQ005370.1				942	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
				A				
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4500	-	TAC	V	TAC	V
		48	500	%100 G	TAC	V	TGC	P
	>MY	0	500	%100 G	TAC	V	TGC	P
	>RC	0	450	%100 G	TAC	V	TGC	P
	>HA	0	300	-	TAC	V	TAC	V
	>MG	0	800	-	TAC	V	TAC	V
		24	100	-	TAC	V	TAC	V
		48	100	-	TAC	V	TAC	V
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	600	-	TAC	V	TAC	V
		24	500	-	TAC	V	TAC	V
		48	1200	-	TAC	V	TAC	V
		200	550	-	TAC	V	TAC	V
	>EK	0	100	-	TAC	V	TAC	V
		24	450	-	TAC	V	TAC	V
		48	550	-	TAC	V	TAC	V
		200	800	-	TAC	V	TAC	V
	>KK	0	550	-	TAC	V	TAC	V
	>MB	0	750	%100 G	TAC	V	TGC	P
		24	500	%100 G	TAC	V	TGC	P
		200	100	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	11000	-	TAC	V	TAC	V
		24	10000	-	TAC	V	TAC	V
		48	700	-	TAC	V	TAC	V
		96	500	-	TAC	V	TAC	V
		200	500	-	TAC	V	TAC	V
	>YS	0	800	-	TAC	V	TAC	V
		24	950	-	TAC	V	TAC	V
		48	750	-	TAC	V	TAC	V
		96	750	-	TAC	V	TAC	V
		200	550	-	TAC	V	TAC	V
	>FO	0	600	-	TAC	V	TAC	V
		24	700	-	TAC	V	TAC	V
		48	550	-	TAC	V	TAC	V
		96	100	-	TAC	V	TAC	V
		200	100	-	TAC	V	TAC	V
	>MA	0	500	-	TAC	V	TAC	V
		24	550	-	TAC	V	TAC	V
		48	530	-	TAC	V	TAC	V
		96	250	-	TAC	V	TAC	V
		200	550	-	TAC	V	TAC	V

Şekil 5.13. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-1

952. nükleotidde MC, MG ve MB hastalarında Timin bazına dönüşme ile referans kodon TTC'nin TTT'ye dönüşmüştür böylece **Glutamik Asit, Lizin**'e değişmiştir (Şekil 5.15.).

HQ005370.1	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg	AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ			
				952	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
				C				
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4500	%100 T	TTC	E	TTT	K
		48	500	%100 T	TTC	E	TTT	K
	>MY	0	500	–	TTC	E	TTC	E
	>RC	0	450	–	TTC	E	TTC	E
	>HA	0	300	–	TTC	E	TTC	E
	>MG	0	800	%100 T	TTC	E	TTT	K
		24	100	%100 T	TTC	E	TTT	K
		48	100	%100 T	TTC	E	TTT	K
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	600	–	TTC	E	TTC	E
		24	500	–	TTC	E	TTC	E
		48	1200	–	TTC	E	TTC	E
		200	550	–	TTC	E	TTC	E
	>EK	0	100	–	TTC	E	TTC	E
		24	450	–	TTC	E	TTC	E
		48	550	–	TTC	E	TTC	E
		200	800	–	TTC	E	TTC	E
	>KK	0	550	–	TTC	E	TTC	E
	>MB	0	750	%100 T	TTC	E	TTT	K
		24	500	%100 T	TTC	E	TTT	K
		200	100	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	11000	–	TTC	E	TTC	E
		24	10000	–	TTC	E	TTC	E
		48	700	–	TTC	E	TTC	E
		96	500	–	TTC	E	TTC	E
		200	500	–	TTC	E	TTC	E
	>YS	0	800	–	TTC	E	TTC	E
		24	950	–	TTC	E	TTC	E
		48	750	–	TTC	E	TTC	E
		96	750	–	TTC	E	TTC	E
		200	550	–	TTC	E	TTC	E
	>FO	0	600	–	TTC	E	TTC	E
		24	700	–	TTC	E	TTC	E
		48	550	–	TTC	E	TTC	E
		96	100	–	TTC	E	TTC	E
		200	100	–	TTC	E	TTC	E
	>MA	0	500	–	TTC	E	TTC	E
		24	550	–	TTC	E	TTC	E
		48	530	–	TTC	E	TTC	E
		96	250	–	TTC	E	TTC	E
		200	550	–	TTC	E	TTC	E

Şekil 5.14. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-2

981. ve **982.** peş peşe gelen nükleotitlerde yanıt veren ve nüks etmiş hastalarda meydana gelen polimorfizmler **Lizin** amino asitinden **Glisin**, **Arjinin** ve **Glutamik Asit** gibi farklı amino asitlere dönüşmüştür (Şekil 5.16.).

HQ005370.1	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg 981 T	L-HDAg / S-HDAg 982 T	AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4500	–	–	CTT	K	CTT	K
		48	500	%80 C	%80 C	CTT	K	CCC	G
	>MY	0	500	%100 C	%100 G	CTT	K	CCG	R
	>RC	0	450	–	–	CTT	K	CTT	K
	>HA	0	300	–	–	CTT	K	CTT	K
	>MG	0	800	–	%100 C	CTT	K	CTC	E
		24	100	–	–	CTT	K	CTT	K
		48	100	–	–	CTT	K	CTT	K
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	600	–	–	CTT	K	CTT	K
		24	500	–	–	CTT	K	CTT	K
		48	1200	–	–	CTT	K	CTT	K
		200	550	–	–	CTT	K	CTT	K
	>EK	0	100	–	–	CTT	K	CTT	K
		24	450	–	–	CTT	K	CTT	K
		48	550	–	–	CTT	K	CTT	K
		200	800	–	–	CTT	K	CTT	K
	>KK	0	550	%80 C	%60 G	CTT	K	CCG	R
	>MB	0	750	%100 C	%100 C	CTT	K	CCC	G
		24	500	%100 C	%100 C	CTT	K	CCC	G
		200	100	***	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	11000	–	–	CTT	K	CTT	K
		24	10000	–	–	CTT	K	CTT	K
		48	700	–	–	CTT	K	CTT	K
		96	500	–	–	CTT	K	CTT	K
		200	500	–	–	CTT	K	CTT	K
	>YS	0	800	–	–	CTT	K	CTT	K
		24	950	–	–	CTT	K	CTT	K
		48	750	–	–	CTT	K	CTT	K
		96	750	–	–	CTT	K	CTT	K
		200	550	–	–	CTT	K	CTT	K
	>FO	0	600	–	–	CTT	K	CTT	K
		24	700	–	–	CTT	K	CTT	K
		48	550	–	–	CTT	K	CTT	K
		96	100	–	–	CTT	K	CTT	K
		200	100	–	–	CTT	K	CTT	K
	>MA	0	500	–	–	CTT	K	CTT	K
		24	550	–	–	CTT	K	CTT	K
		48	530	–	–	CTT	K	CTT	K
		96	250	–	–	CTT	K	CTT	K
		200	550	–	–	CTT	K	CTT	K

Şekil 5.15. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-3

Art arda gelen **1022.** ve **1023.** nükleotitlerde nüks eden ve yanıt vermeyen hastalarda sırasıyla meydana gelen Sitozin ve Guanin değişimleri amino asiti **Glisin**'den **Alanin**'e dönüştürmüştür. Yanıt veren hastalarda ise referans kodon değişime uğramamıştır. Dolayısıyla yanıt vermeyen ve nüks eden hastalarda meydana gelen bu amino asit değişimleri tedavi seyrini anlamak için önem arz edebilir (Şekil 5.17.).

HQ005370.1	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg S-HDAg 1022 T	L-HDAg S-HDAg 1023 C	AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4500	–	–	TCC	G	TCC	G
		48	500	–	–	TCC	G	TCC	G
	>MY	0	500	%100 C	–	TCC	G	CCC	G
	>RC	0	450	–	–	TCC	G	TCC	G
	>HA	0	300	–	–	TCC	G	TCC	G
	>MG	0	800	–	–	TCC	G	TCC	G
		24	100	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	600	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		24	500	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		48	1200	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		200	550	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
	>EK	0	100	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		24	450	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		48	550	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		200	800	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
	>KK	0	550	%100 C	%80 G	TCC	G	GCG	A
	>MB	0	750	–	–	TCC	G	TCC	G
		24	500	–	–	TCC	G	TCC	G
		200	100	–	–	TCC	G	TCC	G
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	11000	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		24	10000	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		48	700	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		96	500	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		200	500	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
	>YS	0	800	–	–	TCC	G	TCC	G
		24	950	–	–	TCC	G	TCC	G
		48	750	–	–	TCC	G	TCC	G
		96	750	–	–	TCC	G	TCC	G
		200	550	–	–	TCC	G	TCC	G
	>FO	0	600	–	–	TCC	G	TCC	G
		24	700	–	–	TCC	G	TCC	G
		48	550	–	–	TCC	G	TCC	G
		96	100	–	–	TCC	G	TCC	G
		200	100	–	–	TCC	G	TCC	G
	>MA	0	500	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		24	550	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		48	530	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		96	250	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A
		200	550	%100 C	%100 G	TCC	G	GCG	A

Şekil 5.16. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-4

1026. nükleotitte nüks etmiş ve yanıt vermeyen hastalarda meydana gelen Guanin'den Sitozin'e dönüşüm amino asiti **Serin**'den **Sistein**'e değiştirmiştir. Yanıt veren hastalarda büyük oranda referans kodon ile homologluk tespit edilmiştir. Yalnızca RC hastasının nükleotitindeki delesyon ile birlikte **Serin**, **Fenilalanin**'e dönüşmüştür (Şekil 5.18.). Yanıt vermeyen ve nüks eden hastalardaki bu amino asit değişimi tedavinin ilerleyişini anlamak için olası önemlidir.

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg	AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ			
HQ005370.1				1026 G	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4500	–	AGA	S	AGA	S
		48	500	–	AGA	S	AGA	S
	>MY	0	500	–	AGA	S	AGA	S
	>RC	0	450	%100 DEL	AGA	S	AAA	F
	>HA	0	300	–	AGA	S	AGA	S
	>MG	0	800	–	AGA	S	AGA	S
		24	100	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	600	%100 C	AGA	S	ACA	C
		24	500	%100 C	AGA	S	ACA	C
		48	1200	%100 C	AGA	S	ACA	C
		200	550	%100 C	AGA	S	ACA	C
	>EK	0	100	–	AGA	S	AGA	S
		24	450	–	AGA	S	AGA	S
		48	550	–	AGA	S	AGA	S
		200	800	–	AGA	S	AGA	S
	>KK	0	550	%80 C	AGA	S	ACA	C
	>MB	0	750	–	AGA	S	AGA	S
		24	500	–	AGA	S	AGA	S
		200	100	–	AGA	S	AGA	S
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	11000	%100 C	AGA	S	ACA	C
		24	10000	%100 C	AGA	S	ACA	C
		48	700	%100 C	AGA	S	ACA	C
		96	500	%100 C	AGA	S	ACA	C
		200	500	%100 C	AGA	S	ACA	C
	>YS	0	800	–	AGA	S	AGA	S
		24	950	–	AGA	S	AGA	S
		48	750	–	AGA	S	AGA	S
		96	750	–	AGA	S	AGA	S
		200	550	–	AGA	S	AGA	S
	>FO	0	600	–	AGA	S	AGA	S
		24	700	–	AGA	S	AGA	S
		48	550	–	AGA	S	AGA	S
		96	100	–	AGA	S	AGA	S
		200	100	–	AGA	S	AGA	S
	>MA	0	500	%100 C	AGA	S	ACA	C
		24	550	%100 C	AGA	S	ACA	C
		48	530	%100 C	AGA	S	ACA	C
		96	250	%100 C	AGA	S	ACA	C
		200	550	%100 C	AGA	S	ACA	C

Şekil 5.17. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-5

Art arda gelen 1094. ve 1095. nükleotitlerde meydana gelen polimorfizmler **Glutamik asit**, **Glisin**, **Aspartik asit** gibi farklı amino asit değişimlerine sebep olmuştur. Eksik okumalar mevcut olmak ile birlikte yanıt vermeyen ve nüks eden hastalardaki **Glutamik asit** ve **Aspartik asit** dönüşümleri dikkat çekmektedir (Şekil 5.19.).

HQ005370.1	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg S-HDAg		AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ			
				1094	1095	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
				T	C				
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	–	–	TCC	G	TCC	G
		48	100	***	***	***	***	***	***
	>MY	0	850	–	–	TCC	G	TCC	G
	>RC	0	100	***	***	***	***	***	***
	>HA	0	100	***	***	***	***	***	***
	>MG	0	100	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	%60 G/ %40 C	%100 T	TCC	G	CTC	E
		24	750	%60 C / % 40 G	%100 T	TCC	G	CTC	E
		48	1000	%60 C / % 40 G	%100 T	TCC	G	CTC	E
		200	100	%60 C / % 40 G	%100 T	TCC	G	CTC	E
	>EK	0	100	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***
	>KK	0	100	***	***	***	***	***	***
	>MB	0	100	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	44000	%80 C	%80 T	TCC	G	CTC	E
		24	100	%80 C	%80 T	TCC	G	CTC	E
		48	1200	%80 C	%80 T	TCC	G	CTC	E
		96	1100	%80 C	%80 T	TCC	G	CTC	E
		200	550	–	–	TCC	G	TCC	G
	>YS	0	500	%80 C	–	TCC	G	CCC	G
		24	550	–	–	TCC	G	TCC	G
		48	500	–	–	TCC	G	TCC	G
		96	600	–	–	TCC	G	TCC	G
		200	1100	–	–	TCC	G	TCC	G
	>FO	0	600	%100 A	%100 T	TCC	G	ATC	D
		24	850	%100 A	%100 T	TCC	G	ATC	D
		48	850	%100 A	%100 T	TCC	G	ATC	D
		96	800	%100 A	%100 T	TCC	G	ATC	D
		200	850	%100 A	%100 T	TCC	G	ATC	D
	>MA	0	100	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***
		96	100	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***

Şekil 5.18. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-6

1264. nükleotitte meydana gelen Sitozin'den Timin'e değişim amino asiti de **İzolösin**'den **Valin**'e dönüştürmüştür. Bu dönüşümün yanıt vermeyen ve nüks eden hastalarda meydana gelmesi, yanıt veren hastalarda ise değişim olmaması dikkat çekmektedir (Şekil 5.20.).

HQ005370.1	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg	AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ			
				1264	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
				T				
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	-	GAT	I	GAT	I
		48	100	***	***	***	***	***
	>MY	0	850	-	GAT	I	GAT	I
	>RC	0	100	***	***	***	***	***
	>HA	0	100	***	***	***	***	***
	>MG	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	%100 C	GAT	I	GAC	V
		24	750	%100 C	GAT	I	GAC	V
		48	1000	%100 C	GAT	I	GAC	V
		200	100	%100 C	GAT	I	GAC	V
	>EK	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***
	>KK	0	100	***	***	***	***	***
	>MB	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	44000	%100 C	GAT	I	GAC	V
		24	100	%100 C	GAT	I	GAC	V
		48	1200	%100 C	GAT	I	GAC	V
		96	1100	%100 C	GAT	I	GAC	V
		200	550	%100 C	GAT	I	GAC	V
	>YS	0	500	%100 C	GAT	I	GAC	V
		24	550	%100 C	GAT	I	GAC	V
		48	500	%100 C	GAT	I	GAC	V
		96	600	%100 C	GAT	I	GAC	V
		200	1100	%100 C	GAT	I	GAC	V
	>FO	0	600	%100 C	GAT	I	GAC	V
		24	850	%100 C	GAT	I	GAC	V
		48	850	%100 C	GAT	I	GAC	V
		96	800	%100 C	GAT	I	GAC	V
		200	850	%100 C	GAT	I	GAC	V
	>MA	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***
		96	100	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***

Şekil 5.19. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-7

1292., 1293. ve **1294.** nükleotitlerdeki nüks etmiş ve yanıt vermemiş hastalardaki değişim kodonu komple değiştirerek **CTG**'den **TAA**'ya dönüştürmüştür. Böylece amino asitte **Glutamin**'den **Lösin**'e değişmiştir. Tedaviye yanıt veren MC hastasının 0. haftasındaki

değişimler **Alanin** amino asitine sebep olurken, MY hastasının 0. haftasındaki peş peşe gelen delesyonlar **Lizin** amino asitine sebep olmaktadır (Şekil 5.21.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg			AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ			
HQ005370.1				1292	1293	1294	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
				C	T	G				
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	%65 A/ %35 G	%100 G	%100 C	CTG	Q	GCT	A
		48	100	***	***	***	***	***	***	***
	>MY	0	850	%100 DEL	%100 DEL	%100 DEL	CTG	Q	AAA	K
	>RC	0	100	***	***	***	***	***	***	***
	>HA	0	100	***	***	***	***	***	***	***
	>MG	0	100	***	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		24	750	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	O	TAA	L
		48	1000	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		200	100	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
	>EK	0	100	***	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***	***
	>KK	0	100	***	***	***	***	***	***	***
	>MB	0	100	***	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	44000	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		24	100	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		48	1200	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		96	1100	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		200	550	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
	>YS	0	500	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		24	550	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		48	500	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		96	600	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		200	1100	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
	>FO	0	600	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		24	850	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		48	850	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		96	800	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
		200	850	%100 T	%100 A	%100 A	CTG	Q	TAA	L
	>MA	0	100	***	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***	***
		96	100	***	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***	***

Şekil 5.20. Tüm genomda olası önemli amino asit değişimleri-8

5.6. DİĞER AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ

1028. nükleotidde RC hastasında meydana gelen delesyon amino asiti **Lösin'den, Fenilalanin**'e dönüşmüştür (Şekil 5.22.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg	AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ			
HQ005370.1				1028 / A	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	–	AAG	L	AAG	L
		48	100	–	AAG	L	AAG	L
	>MY	0	850	%100 C	AAG	L	CAG	L
	>RC	0	100	%100 DEL	AAG	L	AAA	F
	>HA	0	100	%100 T	AAG	L	TAG	L
	>MG	0	100	%100 C	AAG	L	CAG	L
		24	100	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	%100 G	GAG	L	GAG	L
		24	750	%100 G	GAG	L	GAG	L
		48	1000	%100 G	GAG	L	GAG	L
		200	100	%100 G	GAG	L	GAG	L
	>EK	0	100	–	AAG	L	AAG	L
		24	100	%100 C	AAG	L	CAG	L
		48	100	%100 C	AAG	L	CAG	L
		200	100	%100 C	AAG	L	CAG	L
	>KK	0	100	%50 G / %50 C	AAG	L	GAG	L
	>MB	0	100	–	AAG	L	AAG	L
		24	100	–	AAG	L	AAG	L
		200	100	–	AAG	L	AAG	L
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	44000	%100 G	AAG	L	GAG	L
		24	100	%100 G	AAG	L	GAG	L
		48	1200	%100 G	AAG	L	GAG	L
		96	1100	%100 G	AAG	L	GAG	L
		200	550	%100 G	AAG	L	GAG	L
	>YS	0	500	%100 T	AAG	L	TAG	L
		24	550	%100 T	AAG	L	TAG	L
		48	500	%100 T	AAG	L	TAG	L
		96	600	%100 T	AAG	L	TAG	L
		200	1100	%100 T	AAG	L	TAG	L
	>FO	0	600	%100 T	AAG	L	TAG	L
		24	850	%100 T	AAG	L	TAG	L
		48	850	%100 T	AAG	L	TAG	L
		96	800	%100 T	AAG	L	TAG	L
		200	850	%100 T	AAG	L	TAG	L
	>MA	0	100	%100 G	AAG	L	GAG	L
		24	100	%100 G	AAG	L	GAG	L
		48	100	%100 G	AAG	L	GAG	L
		96	100	%100 G	AAG	L	GAG	L
		200	100	%100 G	AAG	L	GAG	L

Şekil 5.21. Diğer amino asit değişimleri-1

1070. nükleotidde BG ve FOC hastalarında Adenin'den Guanin'e değişim amino asiti etkilememiştir. FO hastasında ise Timin'e olan değişim amino asiti **Aspartik Asit**'den **Glutamik Asit**'e dönüştürmüştür (Şekil 5.23.).

HQ005370.1	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg / S-HDAg / 1070 / A	AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ			
					REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	–	ATC	D	ATC	D
		48	100	***	***	***	***	***
	>MY	0	850	–	ATC	D	ATC	D
	>RC	0	100	***	***	***	***	***
	>HA	0	100	***	***	***	***	***
	>MG	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	%100 G	ATC	D	GTC	D
		24	750	%100 G	ATC	D	GTC	D
		48	1000	%100 G	ATC	D	GTC	D
		200	100	%100 G	ATC	D	GTC	D
	>EK	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***
	>KK	0	100	***	***	***	***	***
	>MB	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	44000	%100 G	ATC	D	GTC	D
		24	100	%100 G	ATC	D	GTC	D
		48	1200	%100 G	ATC	D	GTC	D
		96	1100	%100 G	ATC	D	GTC	D
		200	550	%100 G	ATC	D	GTC	D
	>YS	0	500	–	ATC	D	ATC	D
		24	550	–	ATC	D	ATC	D
		48	500	–	ATC	D	ATC	D
		96	600	–	ATC	D	ATC	D
		200	1100	–	ATC	D	ATC	D
	>FO	0	600	%100 T	ATC	D	TTC	E
		24	850	%100 T	ATC	D	TTC	E
		48	850	%100 T	ATC	D	TTC	E
		96	800	%100 T	ATC	D	TTC	E
		200	850	%100 T	ATC	D	TTC	E
	>MA	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***
		96	100	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***

Şekil 5.22. Diğer amino asit değişimleri-2

Şekil 5.24.'de görülen 1346. nükleotidde 4 farklı hastanın tüm serum örneklerinde Adenin'den Guanin'e değişim olsa da amino asit düzeyinde değişim olmamıştır. Sadecee MY hastasında Sitozin'e gerçekleşen değişim amino asiti de **Aspartik asit**'den **Glutamik asit**'e dönüştürmüştür.

HQ005370.1	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg S-HDAg	AMİNO ASİT DEĞİŞİMLERİ			
				1346	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
				A				
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	–	ATC	D	ATC	D
		48	100	***	***	***	***	***
	>MY	0	850	%100 C	ATC	D	CTC	E
	>RC	0	100	***	***	***	***	***
	>HA	0	100	***	***	***	***	***
	>MG	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	%100 G	ATC	D	GTC	D
		24	750	%100 G	ATC	D	GTC	D
		48	1000	%100 G	ATC	D	GTC	D
		200	100	%100 G	ATC	D	GTC	D
	>EK	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***
	>KK	0	100	***	***	***	***	***
	>MB	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	44000	%100 G	ATC	D	GTC	D
		24	100	%100 G	ATC	D	GTC	D
		48	1200	%100 G	ATC	D	GTC	D
		96	1100	%100 G	ATC	D	GTC	D
		200	550	%100 G	ATC	D	GTC	D
	>YS	0	500	%100 G	ATC	D	GTC	D
		24	550	%100 G	ATC	D	GTC	D
		48	500	%100 G	ATC	D	GTC	D
		96	600	%100 G	ATC	D	GTC	D
		200	1100	%100 G	ATC	D	GTC	D
	>FO	0	600	%100 G	ATC	D	GTC	D
		24	850	%100 G	ATC	D	GTC	D
		48	850	%100 G	ATC	D	GTC	D
		96	800	%100 G	ATC	D	GTC	D
		200	850	%100 G	ATC	D	GTC	D
	>MA	0	100	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***
		96	100	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***

Şekil 5.23. Diğer amino asit değişimleri-3

5.7. TÜM GENOMDA OLASI ÖNEMLİ KODON DEĞİŞİMLERİ

Yukarıdaki amino asit değişimlerine sebep olan polimorfizlere ek olarak, amino asit değişimine sebep olmayan sessiz mutasyonlar da mevcuttur. Bu mutasyonlardan muhtemel en önemli olanlar aşağıdaki gibi tablolar haline getirilmiştir.

Şekil 5.25.'de 800. nükleotit lokasyonunda, yanıt vermeyen 2 farklı hastada (YS ve FO) Guanin, FOC hastasında ise 0. haftası (Timin) hariç Sitozin görülmektedir. Nüks eden ve

tedaviye yanıt veren diğer hastalarda farklı değişimler mevcuttur. Fakat bu değişimlerin tamamı kodon düzeyinde kalıp amino asiti değiştirmemektedir. Ayrıca bu farklı değişimler arasında anlamlı sonuç görülememektedir .

851. nüklotidde ise farklı hastalarda Guanin'den Adenin'e değişim söz konusudur. Yanıt veren HA hastasının 0. haftasında, BG hastasının 3 farklı serum numunesinde, EK hastasının 200. haftası alınan serum örneğinde ve yanıt vermeyen YS ve FO hastalarının tüm serum örneklerinde Guanin'den Adenin'e değişim söz konusudur. Bu değişim de kodon seviyesinde kalmıştır (Şekil 5.25.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg S-HDAg	KODON DEĞİŞİMLERİ		L-HDAg S-HDAg	KODON DEĞİŞİMLERİ	
HQ005370.1				800 A	REFERANS KODON	TNP	851 G	REFERANS KODON	TNP
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC
		48	<100	%60 T/%40G	AGT	TGT	–	GAC	GAC
	>MY	0	850	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC
	>RC	0	<100	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC
	>HA	0	<100	%100 G	AGT	GGT	%100 A	GAC	AAC
	>MG	0	<100	%100 DEL	AGT		–	GAC	GAC
		24	<100	***	***	***	***	***	***
		48	<100	***	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	%50 C/ %50 T	AGT	CGT	%100 A	GAC	AAC
		24	750	%75 T/ %25 C	AGT	TGT	%80 A	GAC	AAC
		48	1000	%100 T	AGT	TGT	–	GAC	GAC
		200	100	%100 T	AGT	TGT	%80 A	GAC	AAC
	>EK	0	<100	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC
		24	<100	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC
		48	<100	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC
		200	<100	%100 G	AGT	GGT	%50 A	GAC	AAC
	>KK	0	<100	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC
	>MB	0	<100	%75 T/ %25 C	AGT	TGT	–	GAC	GAC
		24	<100	%100 C	AGT	CGT	–	GAC	GAC
		200	<100	%100 C	AGT	CGT	–	GAC	GAC
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	44000	%100 T	AGT	TGT	–	GAC	GAC
		24	100	%100 C	AGT	CGT	–	GAC	GAC
		48	1200	%100 C	AGT	CGT	–	GAC	GAC
		96	1100	%100 C	AGT	CGT	–	GAC	GAC
		200	550	%100 C	AGT	CGT	–	GAC	GAC
	>YS	0	500	%100 G	AGT	GGT	%100 A	GAC	AAC
		24	550	%100 G	AGT	GGT	%100 A	GAC	AAC
		48	500	%100 G	AGT	GGT	%100 A	GAC	AAC
		96	600	%100 G	AGT	GGT	%100 A	GAC	AAC
		200	1100	%100 G	AGT	GGT	%100 A	GAC	AAC
	>FO	0	600	%100 G	AGT	GGT	%100 A	GAC	AAC
		24	850	%100 G	AGT	GGT	%100 A	GAC	AAC
		48	850	%100 G	AGT	GGT	%100 A	GAC	AAC
		96	800	%100 G	AGT	GGT	%100 A	GAC	AAC
		200	850	%100 G	AGT	GGT	%100 A	GAC	AAC
	>MA	0	<100	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC
		24	<100	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC
		48	<100	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC
		96	<100	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC
		200	<100	–	AGT	AGT	–	GAC	GAC

Şekil 5.24. Tüm genomda olası önemli kodon değişimleri-1

1235. nükleotidde ise eksik okumalar mevcut olsa da yanıt vermeyen 3 hastada ve BG hastasında Adenin'den Guanin'e değişim olması, yanıt veren MC ve MY hastasında Adenin olması dikkat çekmektedir. Bu iki farklı noktada gerçekleşen değişimler yine kodon seviyesinde kalmıştır (Şekil 5.26.).

HQ005370.1	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg S-HDAg 854 G	KODON DEĞİŞİMLERİ REFERANS KODON	KODON DEĞİŞİMLERİ TNP	L-HDAg S-HDAg 1235 A	KODON DEĞİŞİMLERİ REFERANS KODON	KODON DEĞİŞİMLERİ TNP
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	–	GCC	GCC	–	ATC	ATC
		48	<100	%80 A	GCC	ACC	***	***	***
	>MY	0	850	%100 C	GCC	CCC	–	ATC	ATC
	>RC	0	<100	–	GCC	GCC	***	***	***
	>HA	0	<100	%100 T	GCC	TCC	***	***	***
	>MG	0	<100	–	GCC	GCC	***	***	***
		24	<100	***	***	***	***	***	***
		48	<100	***	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		24	750	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		48	1000	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		200	100	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
	>EK	0	<100	%100 A	GCC	ACC	***	***	***
		24	<100	%100 A	GCC	ACC	***	***	***
		48	<100	%100 A	GCC	ACC	***	***	***
		200	<100	%65T / %35A	GCC	TCC	***	***	***
	>KK	0	<100	%80 C	GCC	CCC	***	***	***
	>MB	0	<100	%100 A	GCC	ACC	***	***	***
		24	<100	%100 A	GCC	ACC	***	***	***
		200	<100	%100 A	GCC	ACC	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	44000	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		24	100	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		48	1200	–	GCC	GCC	%100 G	ATC	GTC
		96	1100	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		200	550	%100 A	GCC	ACC	%100 G	ATC	GTC
	>YS	0	500	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		24	550	–	GCC	GCC	%100 G	ATC	GTC
		48	500	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		96	600	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		200	1100	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
	>FO	0	600	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		24	850	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		48	850	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		96	800	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
		200	850	%100 T	GCC	TCC	%100 G	ATC	GTC
	>MA	0	<100	%80 A	GCC	ACC	***	***	***
		24	<100	–	GCC	GCC	***	***	***
		48	<100	–	GCC	GCC	***	***	***
		96	<100	–	GCC	GCC	***	***	***
		200	<100	–	GCC	GCC	***	***	***

Şekil 5.25. Tüm genomda olası önemli kodon değişimleri-2

Şekil 5.27.'de görülen 1277. nükleotidde BG, FOC ve YS hastalarının tüm serum örneklerinde Sitozin'den Timin'e değişim görülmektedir.

1295. nükleotidde de BG, FOC, YS ve FO hastalarının tüm serum örneklerinde Timin'den Sitozin'e dönüşüm mevcuttur (Şekil 5.27.).

HQ005370.1	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	L-HDAg S-HDAg 1277 C	KODON DEĞİŞİMLERİ REFERANS KODON	KODON DEĞİŞİMLERİ TNP	L-HDAg S-HDAg 1295 T	KODON DEĞİŞİMLERİ REFERANS KODON	KODON DEĞİŞİMLERİ TNP
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	–	CCT	CCT	–	TTT	TTT
		48	100	***	***	***	***	***	***
	>MY	0	850	–	CCT	CCT	–	TTT	TTT
	>RC	0	100	***	***	***	***	***	***
	>HA	0	100	***	***	***	***	***	***
	>MG	0	100	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
		24	750	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
		48	1000	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
		200	100	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
	>EK	0	100	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***
	>KK	0	100	***	***	***	***	***	***
	>MB	0	100	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	44000	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
		24	100	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
		48	1200	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
		96	1100	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
		200	550	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
	>YS	0	500	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
		24	550	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
		48	500	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
		96	600	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
		200	1100	%100 T	CCT	TCT	%100 C	TTT	CTT
	>FO	0	600	–	CCT	CCT	%100 C	TTT	CTT
		24	850	–	CCT	CCT	%100 C	TTT	CTT
		48	850	–	CCT	CCT	%100 C	TTT	CTT
		96	800	–	CCT	CCT	%100 C	TTT	CTT
		200	850	–	CCT	CCT	%100 C	TTT	CTT
	>MA	0	100	***	***	***	***	***	***
		24	100	***	***	***	***	***	***
		48	100	***	***	***	***	***	***
		96	100	***	***	***	***	***	***
		200	100	***	***	***	***	***	***

Şekil 5.26. Tüm genomda olası önemli kodon değişimleri-3

5.8. RİBOZİM BÖLGESİNDE MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLER

HDV'nin 1138 ile 1226. nükleotitlerini kapsayan bölge ribozim bölgesi olarak adlandırılır. Yüksek seviyede korunan bu bölge viral replikasyon için aracılık eder. Dolayısıyla bu bölgede meydana gelen nükleotit ve amino asit değişimleri tedavinin seytine ışık tutabilir.

Ribozim bölgesinde meydana gelen muhtemel en önemli tek nükleotit polimorfizmleri Şekil 5.28. ve Şekil 5.29.'da gösterilmektedir. Gösterilen bu değişimlerden **1140., 1153., 1155. ve**

1184. nükleotitlerdeki değişimler dikkat çekmektedir. Eksik okumalar mevcut olsa da gerçekleşen bu TNP'lerin ağırlıklı olarak nüks eden ve yanıt vermeyen hastalarda meydana gelmesi tedavinin ilerleyişini aydınlatabilir.

1140. nükleotidde yanıt veren MC hastasının 0. haftası, nüks eden BG hastasının 4 farklı serumu, yanıt vermeyen FOC ve FO hastalarının tüm serumlarında Sitozin'den Timin'e dönüşüm söz konusudur (Şekil 5.28.).

1153. nükleotidde yanıt veren MC ve MY hastalarının 0. haftaları, nüks eden BG hastasının tüm serumları ve yanıt vermeyen FOC, YS ve FO hastalarının tüm haftalarında alınan serum örneklerinde Guanin nükleotidinden Sitozin'e dönüşüm görülmektedir (Şekil 5.28.).

1155. nükleotidde de 1153. nükleotidde TNP görülen bütün hastaların serumlarında benzer şekilde Timin'den Sitozin'e TNP mevcuttur (Şekil 5.28.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	RİBOZİM BÖLGESİ					
				1140	1145	1153	1155	1169	1176
HQ005370.1				C	C	G	T	A	T
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	%100 T	–	%100 C	%100 C	–	–
		48	<100	***	***	***	***	***	***
	>MY	0	850	–	%100 T	%100 C	%100 C	–	–
	>RC	0	<100	***	***	***	***	***	***
	>HA	0	<100	***	***	***	***	***	***
	>MG	0	<100	***	***	***	***	***	***
		24	<100	***	***	***	***	***	***
		48	<100	***	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	%100 T	%100 T	%100 C	%100 C	–	–
		24	750	%100 T	%80 T	%100 C	%100 C	–	–
		48	1000	%100 T	%50 T	%100 C	%100 C	–	–
		200	100	%100 T	%50 T	%100 C	%100 C	–	–
	>EK	0	<100	***	***	***	***	***	***
		24	<100	***	***	***	***	***	***
		48	<100	***	***	***	***	***	***
		200	<100	***	***	***	***	***	***
	>KK	0	<100	***	***	***	***	***	***
	>MB	0	<100	***	***	***	***	***	***
		24	<100	***	***	***	***	***	***
		200	<100	***	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	44000	%80 T	–	%100 C	%100 C	–	%50 C
		24	100	%100 T	–	%100 C	%100 C	–	%50 C
		48	1200	%50 T	–	%100 C	%50 C	–	%50 C
		96	1100	%100 T	–	%100 C	%100 C	–	%50 C
		200	550	%100 T	–	%100 C	%100 C	–	–
	>YS	0	500	–	–	%100 C	%100 C	%100 T	–
		24	550	–	–	%100 C	%100 C	%100 T	–
		48	500	–	–	%100 C	%100 C	%100 T	–
		96	600	–	–	%100 C	%100 C	%100 T	–
		200	1100	–	–	%100 C	%100 C	%100 T	–
	>FO	0	600	%100 T	–	%100 C	%100 C	%100 T	–
		24	850	%100 T	–	%100 C	%100 C	%100 T	–
		48	850	%100 T	–	%100 C	%100 C	%100 T	–
		96	800	%100 T	–	%100 C	%100 C	%100 T	–
		200	850	%100 T	–	%100 C	%100 C	%100 T	–
	>MA	0	<100	***	***	***	***	***	***
		24	<100	***	***	***	***	***	***
		48	<100	***	***	***	***	***	***
		96	<100	***	***	***	***	***	***
		200	<100	***	***	***	***	***	***

Şekil 5.27. Ribozim bölgesinde meydana gelen TNP'ler-1

1184. nükleotidde ise MC ve MY hastalarının 0. haftaları, nüks eden BG hastası, FOC, FO ve YS hastasının 0., 24. ve 200 haftalarında Timin'den Sitozin'e dönüşüm görülmektedir (Şekil 5.29.).

1217. nükleotidde de benzer şekilde MC ve MY hastalarının 0. haftaları, BG, FOC, FO, YS hastalarında Sitozin'den Timin'e dönüşüm görülmektedir (Şekil 5.29.).

	Örnek	Hafta	Okuma Derinliği	RİBOZİM BÖLGESİ				
				1181	1182	1184	1187	1217
HQ005370.1				A	T	T	A	C
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	4000	–	–	%100 C	%100 G	%100 T
		48	<100	***	***	***	***	***
	>MY	0	850	%100 G	–	%100 C	%100 G	%100 T
	>RC	0	<100	***	***	***	***	***
	>HA	0	<100	***	***	***	***	***
	>MG	0	<100	***	***	***	***	***
		24	<100	***	***	***	***	***
		48	<100	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	750	–	–	%100 C	–	%100 T
		24	750	–	–	%100 C	–	%100 T
		48	1000	–	–	%100 C	–	%100 T
		200	100	–	–	%100 C	–	%100 T
	>EK	0	<100	***	***	***	***	***
		24	<100	***	***	***	***	***
		48	<100	***	***	***	***	***
		200	<100	***	***	***	***	***
	>KK	0	<100	***	***	***	***	***
	>MB	0	<100	***	***	***	***	***
		24	<100	***	***	***	***	***
		200	<100	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	44000	–	–	%100 C	–	%100 T
		24	100	–	–	%100 C	–	%100 T
		48	1200	–	–	%100 C	–	%100 T
		96	1100	–	–	%100 C	–	%100 T
		200	550	–	–	%100 C	–	%100 T
	>YS	0	500	%100 G	%100 C	%50 C	%100 G	%100 T
		24	550	%100 G	%100 C	%20 C	%100 G	%100 T
		48	500	%100 G	%100 C	–	%100 G	%100 T
		96	600	%100 G	%100 C	–	%100 G	%100 T
		200	1100	%100 G	%100 C	%40 C	%100 G	%100 T
	>FO	0	600	–	–	%100 C	–	%100 T
		24	850	–	–	%100 C	–	%100 T
		48	850	–	–	%100 C	–	%100 T
		96	800	–	–	%100 C	–	%100 T
		200	850	–	–	%100 C	–	%100 T
	>MA	0	<100	***	***	***	***	***
		24	<100	***	***	***	***	***
		48	<100	***	***	***	***	***
		96	<100	***	***	***	***	***
		200	<100	***	***	***	***	***

Şekil 5.28. Ribozim bölgesinde meydana gelen TNP'ler-2

RİBOZİM BÖLGESİNDE MEYDANA GELEN AMİNO ASİT VE KODON DEĞİŞİMLERİ

Şekil 5.28. ve Şekil 5.29.'da gösterilen tek nokta polimorfizmleri amino asit ve kodon değişimlerine sebep olmaktadır. Ribozim bölgesinde meydana gelen bu değişimler viral replikasyonu olası etkileyebileceğinden, tedaviye yanıt durumu hakkında bilgi verebilir. 1140. nükleotidde meydana gelen Sitozin'den Timin'e gerçekleşen değişim amino asiti **Arjinin**'den **Glutamin**'e dönüştürmüştür (Şekil 5.30.).

	Örnek	Hafta	RİBOZİM BÖLGESİ				
			1140	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
HQ005370.1			C				
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	%100 T	CCG	R	CTG	Q
		48	***	***	***	***	***
	>MY	0	–	CCG	R	CCG	R
	>RC	0	***	***	***	***	***
	>HA	0	***	***	***	***	***
	>MG	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	%100 T	CCG	R	CTG	Q
		24	%100 T	CCG	R	CTG	Q
		48	%100 T	CCG	R	CTG	Q
		200	%100 T	CCG	R	CTG	Q
	>EK	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***
	>KK	0	***	***	***	***	***
	>MB	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	%80 T	CCG	R	CTG	Q
		24	%100 T	CCG	R	CTG	Q
		48	%50 T	CCG	R	CTG	Q
		96	%100 T	CCG	R	CTG	Q
		200	%100 T	CCG	R	CTG	Q
	>YS	0	–	CCG	R	CCG	R
		24	–	CCG	R	CCG	R
		48	–	CCG	R	CCG	R
		96	–	CCG	R	CCG	R
		200	–	CCG	R	CCG	R
	>FO	0	%100 T	CCG	R	CTG	Q
		24	%100 T	CCG	R	CTG	Q
		48	%100 T	CCG	R	CTG	Q
		96	%100 T	CCG	R	CTG	Q
		200	%100 T	CCG	R	CTG	Q
	>MA	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
		96	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***

Şekil 5.29. Ribozim bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-1

1153. nükleotidde gerçekleşen değişimler Şekil 5.31.'de gösterilmektedir.

	Örnek	Hafta	RİBOZİM BÖLGESİ				
			1153	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
HQ005370.1			G				
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	%100 C	GGG	P	GGC	A
		48	***	***	***	***	***
	>MY	0	%100 C	GGG	P	GGC	A
	>RC	0	***	***	***	***	***
	>HA	0	***	***	***	***	***
	>MG	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	%100 C	GGG	P	GGC	A
		24	%100 C	GGG	P	GGC	A
		48	%100 C	GGG	P	GGC	A
		200	%100 C	GGG	P	GGC	A
	>EK	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***
	>KK	0	***	***	***	***	***
	>MB	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	%100 C	GGG	P	GGC	A
		24	%100 C	GGG	P	GGC	A
		48	%100 C	GGG	P	GGC	A
		96	%100 C	GGG	P	GGC	A
		200	%100 C	GGG	P	GGC	A
	>YS	0	%100 C	GGG	P	GGC	A
		24	%100 C	GGG	P	GGC	A
		48	%100 C	GGG	P	GGC	A
		96	%100 C	GGG	P	GGC	A
		200	%100 C	GGG	P	GGC	A
	>FO	0	%100 C	GGG	P	GGC	A
		24	%100 C	GGG	P	GGC	A
		48	%100 C	GGG	P	GGC	A
		96	%100 C	GGG	P	GGC	A
		200	%100 C	GGG	P	GGC	A
	>MA	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
		96	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***

Şekil 5.30. Ribozim bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-2

1155 nolu nükleotidde aynı hastalarda meydana gelen Timin'den Sitozin'e değişim ise amino asiti **Lizin**'den **Arjinin**'e dönüştürmüştür. Eksik okumalar mevcut olsa da amino asit

değişimlerinin nüks eden ve yanıt veren hastalarda meydana gelmesi hastaların interferon tedavisine yanıtları hakkında bilgi verebilir (Şekil 5.32.).

	Örnek	Hafta	RİBOZİM BÖLGESİ				
HQ005370.1			1155 T	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	%100 C	CTT	K	CCT	R
		48	***	***	***	***	***
	>MY	0	%100 C	CTT	K	CCT	R
	>RC	0	***	***	***	***	***
	>HA	0	***	***	***	***	***
	>MG	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	%100 C	CTT	K	CCT	R
		24	%100 C	CTT	K	CCT	R
		48	%100 C	CTT	K	CCT	R
		200	%100 C	CTT	K	CCT	R
	>EK	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***
	>KK	0	***	***	***	***	***
	>MB	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	%100 C	CTT	K	CCT	R
		24	%100 C	CTT	K	CCT	R
		48	%50 C	CTT	K	CCT	R
		96	%100 C	CTT	K	CCT	R
		200	%100 C	CTT	K	CCT	R
	>YS	0	%100 C	CTT	K	CCT	R
		24	%100 C	CTT	K	CCT	R
		48	%100 C	CTT	K	CCT	R
		96	%100 C	CTT	K	CCT	R
		200	%100 C	CTT	K	CCT	R
	>FO	0	%100 C	CTT	K	CCT	R
		24	%100 C	CTT	K	CCT	R
		48	%100 C	CTT	K	CCT	R
		96	%100 C	CTT	K	CCT	R
		200	%100 C	CTT	K	CCT	R
	>MA	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
		96	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***

Şekil 5.31. Ribozim Bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-3

1176. nükleotidde gerçekleşen değişimler Şekil 5.33.'de gösterilmektedir. Bu değişimler tek bir hastanı serumunda gerçekleştiğinden, anlamlı sonuç görünmemektedir.

	Örnek	Hafta	RİBOZİM BÖLGESİ				
HQ005370.1			1176 T	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	-	CTC	E	CTC	E
		48	***	***	***	***	***
	>MY	0	-	CTC	E	CTC	E
	>RC	0	***	***	***	***	***
	>HA	0	***	***	***	***	***
	>MG	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	-	CTC	E	CTC	E
		24	-	CTC	E	CTC	E
		48	-	CTC	E	CTC	E
		200	-	CTC	E	CTC	E
	>EK	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***
	>KK	0	***	***	***	***	***
	>MB	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	%50 C	CTC	E	CCC	G
		24	%50 C	CTC	E	CCC	G
		48	%50 C	CTC	E	CCC	G
		96	%50 C	CTC	E	CCC	G
		200	-	CTC	E	CTC	E
	>YS	0	-	CTC	E	CTC	E
		24	-	CTC	E	CTC	E
		48	-	CTC	E	CTC	E
		96	-	CTC	E	CTC	E
		200	-	CTC	E	CTC	E
	>FO	0	-	CTC	E	CTC	E
		24	-	CTC	E	CTC	E
		48	-	CTC	E	CTC	E
		96	-	CTC	E	CTC	E
		200	-	CTC	E	CTC	E
	>MA	0	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***
		96	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***

Şekil 5.32. Ribozim bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-4

Yanıt vermeyen YS hastasının 1181. ve 1182. nükleotitlerinde sırasıyla Adenin'den Guanin'e ve Timin'den Sitozin'e değişim görülmektedir. Aynı hastada ard arda meydana gelen bu değişimler amino asiti **Aspartik asit**'den **Glisin**'e dönüştürmüştür (Şekil 5.34.) Bu nükleotitlerde de anlamlı sonuçlar görünmemektedir..

	Örnek	Hafta	RİBOZİM BÖLGESİ					
			1181	1182	REFERANS KODON	PROTEİN	TNP	PROTEİN
HQ005370.1			A	T				
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	–	–	ATC	D	ATC	D
		48	***	***	***	***	***	***
	>MY	0	%100 G	–	ATC	D	GTC	D
	>RC	0	***	***	***	***	***	***
	>HA	0	***	***	***	***	***	***
	>MG	0	***	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	–	–	ATC	D	ATC	D
		24	–	–	ATC	D	ATC	D
		48	–	–	ATC	D	ATC	D
		200	–	–	ATC	D	ATC	D
	>EK	0	***	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***	***
	>KK	0	***	***	***	***	***	***
	>MB	0	***	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	–	–	ATC	D	ATC	D
		24	–	–	ATC	D	ATC	D
		48	–	–	ATC	D	ATC	D
		96	–	–	ATC	D	ATC	D
		200	–	–	ATC	D	ATC	D
	>YS	0	%100 G	%100 C	ATC	D	GCC	G
		24	%100 G	%100 C	ATC	D	GCC	G
		48	%100 G	%100 C	ATC	D	GCC	G
		96	%100 G	%100 C	ATC	D	GCC	G
		200	%100 G	%100 C	ATC	D	GCC	G
	>FO	0	–	–	ATC	D	ATC	D
		24	–	–	ATC	D	ATC	D
		48	–	–	ATC	D	ATC	D
		96	–	–	ATC	D	ATC	D
		200	–	–	ATC	D	ATC	D
	>MA	0	***	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***	***
		96	***	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***	***

Şekil 5.33. Ribozim bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-5

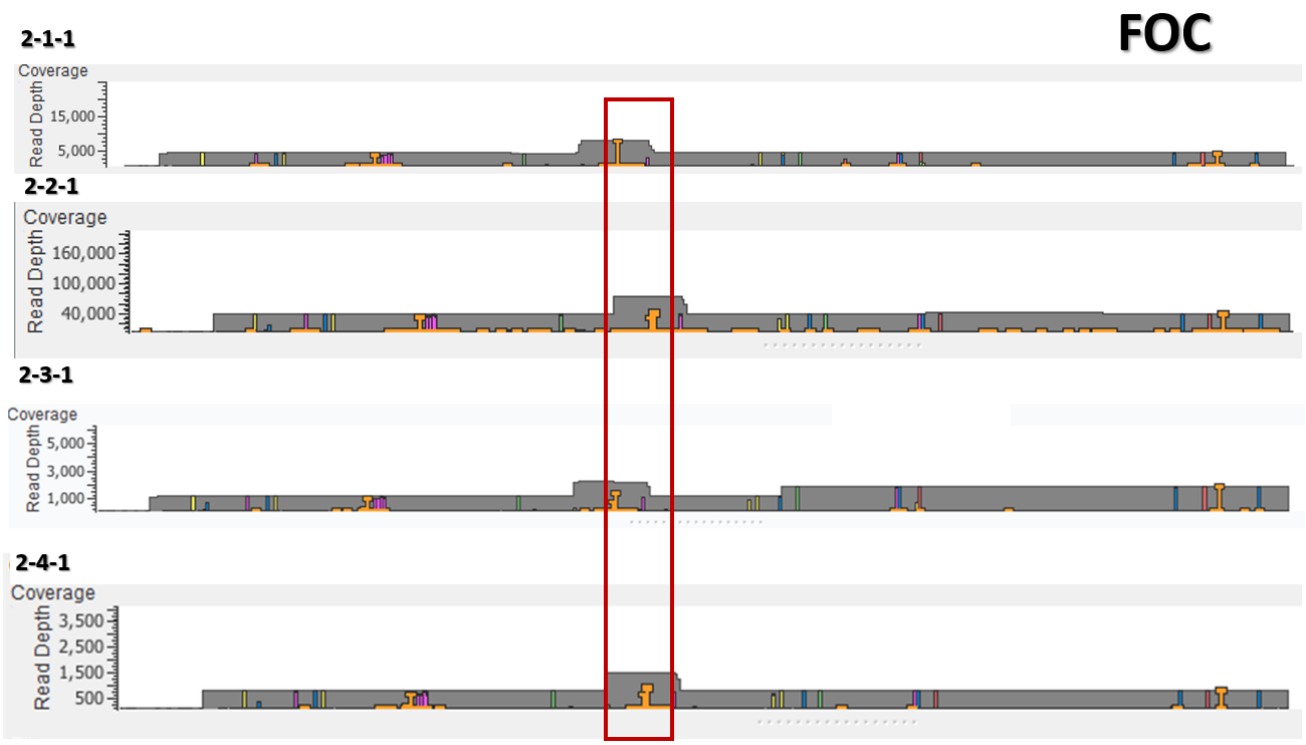
Şekil 5.35.'de görülen 1184. ve 1217. nükleotit lokasyonunda, yanıt veren MC ve MY hastalarının 0. haftasında, nüks eden BG hastasında, yanıt vermeyen FOC, YS ve FO hastalarında sırasıyla Timin'den Sitozin'e ve Sitozin'den Timin'e değişim görülmektedir. Bu değişimler kodonu değiştirsede amino asiti değiştirmeyerek sessiz mutasyonlara sebep olmuştur.

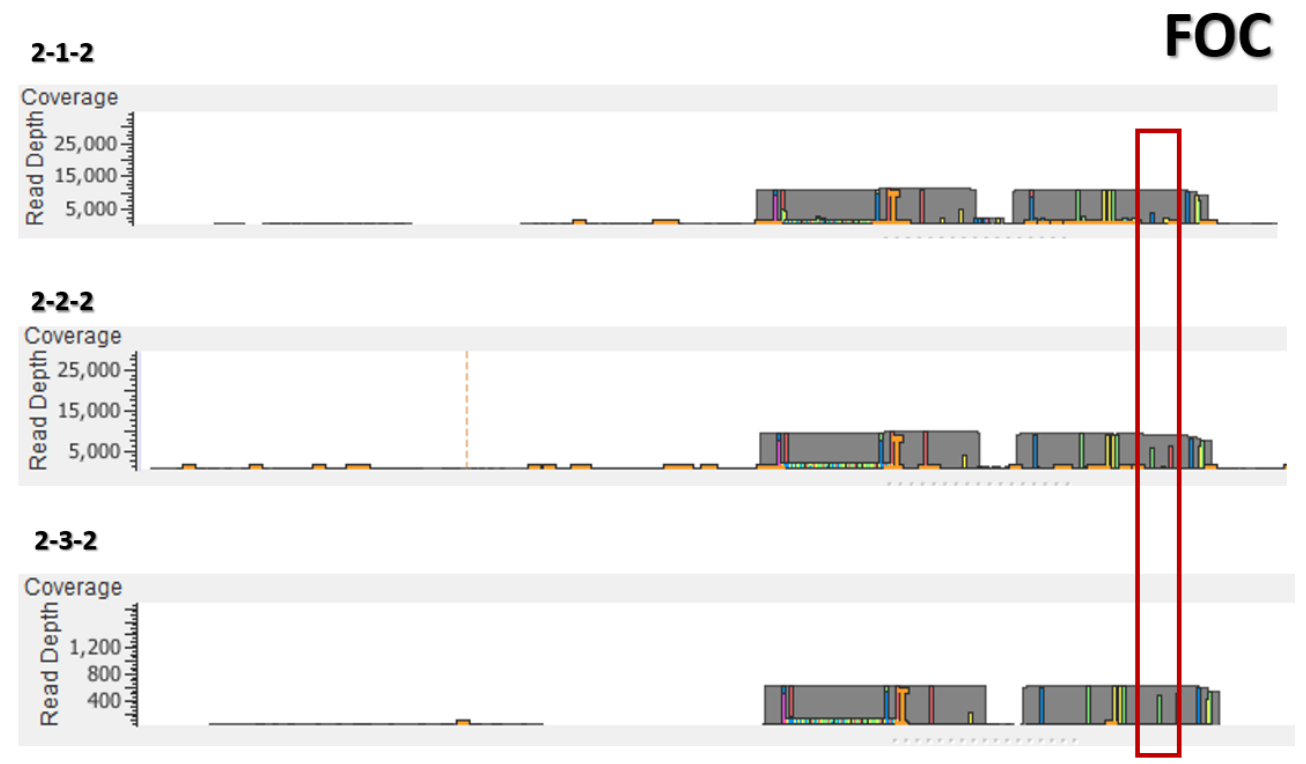
	Örnek	Hafta	RİBOZİM BÖLGESİ					
			1184	REFERANS KODON	TNP	1217	REFERANS KODON	TNP
HQ005370.1			T			C		
Yanıt Veren Hastalar	>MC	0	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		48	***	***	***	***	***	***
	>MY	0	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
	>RC	0	***	***	***	***	***	***
	>HA	0	***	***	***	***	***	***
	>MG	0	***	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***	***
Nüks Etmiş Hastalar	>BG	0	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		24	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		48	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		200	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
	>EK	0	***	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***	***
	>KK	0	***	***	***	***	***	***
	>MB	0	***	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***	***
Yanıt Vermeyen Hastalar	>FOC	0	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		24	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		48	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		96	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		200	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
	>YS	0	%50 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		24	%20 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		48	–	TTT	TTT	%100 T	CCC	TCC
		96	–	TTT	TTT	%100 T	CCC	TCC
		200	%40 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
	>FO	0	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		24	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		48	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		96	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
		200	%100 C	TTT	CTT	%100 T	CCC	TCC
	>MA	0	***	***	***	***	***	***
		24	***	***	***	***	***	***
		48	***	***	***	***	***	***
		96	***	***	***	***	***	***
		200	***	***	***	***	***	***

Şekil 5.34. Ribozim bölgesinde meydana gelen amino asit ve kodon değişimleri-6

SERUM ÖRNEKLERİNDE SÜRECE BAĞLI DEĞİŞİMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Serum örneklerinde sürece bağlı değişimler incelendiğinde büyük çaplı değişim olmadığı görülmüştür. Genel olarak bir hastanın 0., 24., 48., 96. ve 200. haftalarındaki serum örneklerinde varyantları arasında benzerlik görülmüştür. Örnek olarak, 2 farklı yanıt vermeyen hastanın (FOC, YS) serum örnekleri Şekil 5.36. ve Şekil 5.37.'da incelenmiştir.


FOC
2-1-1
Coverage
Read Depth
15,000
5,000
2-2-1
Coverage
Read Depth
160,000
100,000
40,000
2-3-1
Coverage
Read Depth
5,000
3,000
1,000
2-4-1
Coverage
Read Depth
3,500
2,500
1,500
500


FOC
2-1-2
Coverage
Read Depth
25,000
15,000
5,000
2-2-2
Coverage
Read Depth
25,000
15,000
5,000
2-3-2
Coverage
Read Depth
1,200
800
400

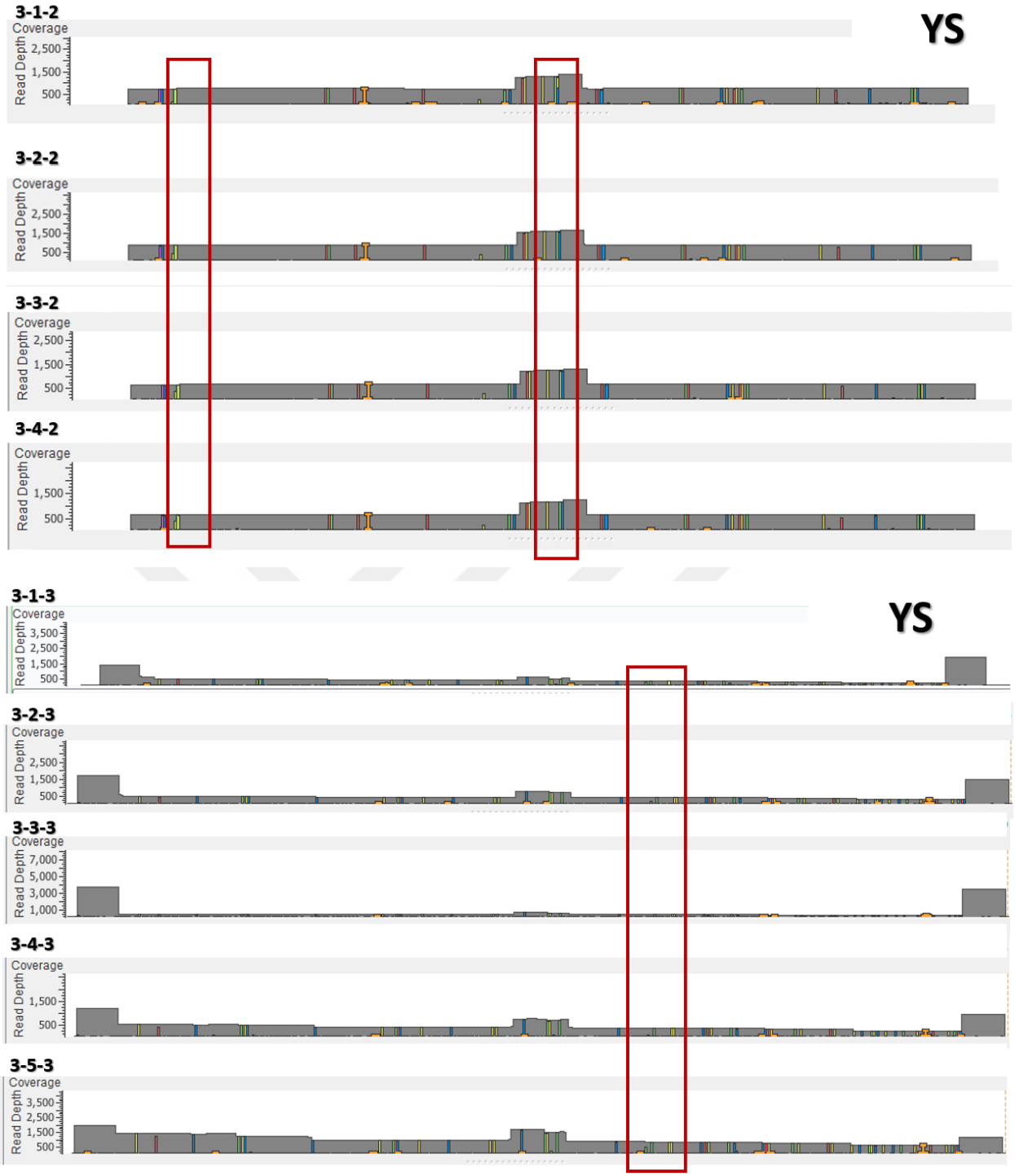


Şekil 5.35. FOC hastasının serum örneklerinin sürece bağlı değişimlerin incelemesi

FOC hastasının 0., 24., 48. ve 96. haftalarındaki serumları incelendiğinde genel olarak benzerlik gözlenmiştir. 509-510. nükleotitler arası 0. hafta serum örneğinde tek başına Adenin insersiyonu görülürken; 24., 48., ve 96. haftalarında 509-510 arası referans genomla birlikte heterozigot olarak Adenin insersiyonu, 510-511 nükleotitleri arası heterozigot Guanin insersiyonu görünmüştür.

Genomun devamı incelendiğinde 968. nükleotitte 0. hafta serumunda %31 oranında referans genom ile birlikte Timin heterozigotluğu görülürken 24. Ve 48. haftalarda bu heterozigotluk yerine referans genom görülmüştür. 24. haftada 965. nükleotitte %61 oranında Guanin ile birlikte referans genom heterozigot olarak görülürken; 48. haftada bu oran %75'e çıkmıştır. Benzer şekilde 24. hafta serumunda 983. nükleotit lokasyonunda %66 oranında Adenin ile referans genom heterozigot olarak gözlenirken; 48. haftada bu oran % 79.4'e çıkmıştır.

FOC hastasının 170. nükleotit noktasında 0. ve 24. haftalarında Adenin ile referans genom nükleotiti olan Sitozin'in sırasıyla %26.1 ve %26.9 oranlarında heterozigotluğu görülürken; 48. haftada görülmemiştir.



Şekil 5.36. YS hastasının serum örneklerinde sürece bağlı değişimlerin incelenmesi

Yanıt vermeyen YS hastasının tüm serum örneklerinde genomu sürece bağlı incelendiğinde büyük oranda benzerlik görülmüştür. 616. nükleotitte 0. hafta serumunda Timin'den Sitozin'e gerçekleşen değişim %13.7 oranındayken; 24., 48., ve 96. haftalarda artarak devam etmiştir ve 96. haftada %59.8'e ulaşmıştır.

829. nükleotitte, 0. haftada %34.2 oranında Sitozin ile %59.1 oranında Timin heterozigot olarak görülürken; 24., 48., ve 96. haftalarda tek başına Timin polimorfizmi %99 oranında görülmüştür.

Genomun devamı incelendiğinde 1277. nükleotitte 0. hafta serumunda %48.1 oranında Timin ile referans nükleotit Sitozin heterozigot olarak görülürken 24., 48., 96. ve 200. hafta serumlarında ortalama %94 oranında Timin polimorfizmi görülmüştür.

Diğer hastalarında serum örnekleri sürece bağlı değerlendiğinde birkaç noktada minör değişimler gözlenmiştir. Bu değişimler çok küçük farklarla gerçekleştiğinde çalışmamıza eklenmemiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Hepatit delta virüsü yaklaşık 1,7 kb uzunluğunda halkasal RNA genomuna sahiptir ve bu genomun replikasyonu, otokatalitik kırılma ve ligasyona bağlı bir dönen halka mekanizmasıyla gerçekleşmektedir (95). Otokatalitik kırılmaya uğrayan en kısa RNA parçası 117 baz uzunluğundadır (96). Bu bölgenin büyük bir kısmı HDV ribozim kısmını kapsamaktadır.

Çalışmamızda 13 farklı KHD hastasının farklı tarihlerdeki serum örneklerinde viral varyant farklılıklarını tespit etmek amaçlanmıştır. NCBI-Pubmed'e Hepatit Delta Virüsü ve yeni nesil sekanslama yazıldığında sadece 8 çalışma çıkmaktadır (90, 91). Bu çalışmaların çoğu virüs karakterizasyonu çalışmalarıdır. İki farklı çalışma ise Hepatit virüslerinde ve viral dirençlere karşı normal sekanslamanın yetersiz kalıp yeni nesil dizileme teknolojisinin ve derin sekanslamanın önemini vurgulamaktadır (97, 98). Hepatit B ve C kadar Hepatit Delta virüsü'nün araştırılmaması bu konu hakkında büyük bir literatür eksikliğini göstermektedir. Çalışmamız dünyada ilk defa gerçekleştirilmiş olup, HDV' nin büyük bir literatür açığını doldurmaktadır. Dünya'da yaklaşık 20 milyon HDV hastası bulunduğundan, çalışmamızda interferon tedavi sürecine ışık tutmayı amaçlayarak, 3 farklı hasta grubunda interferon tedavilerinin farklı süreçlerinde alınan serum örneklerindeki yanıt farklılıklarını inceledik. Hasta grupları arasında viral varyant farklılıkları bulunması, virüsün evrimsel sürecini anlamayı sağlar ve tedavi sürecini kolaylaştırır. Örneğin, bir hasta tedavi için geldiğinde serum örneklerinde **yanıt vermeyen hastalardaki varyantlarla benzerlik tespit edildiğinde interferon tedavisi başlanmayabilir.** Böylece **hastanın, hastalığa ek olarak interferonun yan etkilerinden müzdarip olmasının önüne geçilebilir.**

HİPER DEĞİŞKEN BÖLGEDE MEYDANA GELEN TNP'LERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

HDV RNA genomunun üzerinde bulunan hiper-değişken bölgeler farklı coğrafik bölgelerdeki yaygın HDV tiplerinin tanımlanmasında anahtar rol oynamaktadır (99). Şekil 5.2.'de gösterilen 266, 268, 269 numaralı nükleotidler HDV RNA genomunun hiper-değişken bölge (99) olarak tanımlanan bu bölge üzerinde bulunmaktadır ve bu noktalarda hasta grupları arasında belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Bu nükleotitlere ek olarak 113. ve 319. nükleotitlerde de önemli farklılıklar tespit edilmiştir.

Araştırmalar 34 nükleotit uzunluğunda olan ve çalışmamızda 429-460 nükleotitler arası bölgenin, RNA'nın oto-kırılma özelliğini kazanmasında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (96). Aynı zamanda bu bölgenin başlangıcında bulunan G zengin dizideki mutasyonların otokatalitik aktiviteyi hemen hemen yok ettiği çalışmalarda gösterilmiştir (100).

Şekil 5.6.'da farklı hasta gruplarının farklı tarihlerdeki serum örneklerinden elde edilen dizilerde, HDV genomunun **426-429 bölgesinde**, nüks eden ve tedaviye yanıt vermeyen hastalarda delesyon ağırlıklı paternler tespit edilmiştir. Bu bölgenin otokatalitik kırılma bölgesinin hemen başlangıcında bulunması sebebiyle, tespit edilen bu farklı paternlerin otokatalitik aktivite üzerinde farklı etkileri olabilir ve bu bölgedeki farklı paternler hastaların interferon tedavisine verdiği yanıt üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabilir. Dolayısıyla hiper değişken bölgede bu saptanan mutasyonlar, tedavi-yanıt ilişkisini aydınlatmada önemli olabileceği gibi, enfekte olunan hepatit delta virüsünün coğrafik menşei hakkında da bilgi verebilir.

S-HDAG VE L-HDAG ÜZERİNDE GERÇEKLEŞEN TNP'LERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Şekil 5.2.'de gösterilen 927 ve 928 nolu nükleotitler, L-HDAg ve S-HDAg'yi kodlayan gen bölgesi üzerindedirler. Dolayısıyla bu noktadaki varyantlar, hem HDV viral genomun kendi üzerine katlanması sonrasında oluşturduğu 3 boyutlu yapının fonksiyonu ile hem de genomdan kodlanan proteinlerin fonksiyonlarıyla ilişkili olabilir. Örneğin, antijen-antikor affinitesini, kodlanan delta antijeninde meydana gelen amino asit değişiklikleri etkileyebilir. 927 ve 928 nolu nükleotitlerde tedaviye yanıt vermeyen ve nüks eden hastaların tüm serum örneklerinde sırasıyla A ve C nükleotitleri gözlenirken; tedaviye yanıt vermiş hastalarda, 927. nükleotitte kullanılan referans genom ile hemen hemen aynı nükleotitlere sahip viral genom dizileri gözlenmiştir. 928. nükleotidde ise yanıt veren hastalarda ağırlıklı olarak G nükleotidine dönüşüm söz konusudur (Şekil 5.2.). Ayrıca 927. ve 928. nükleotitlerde ki bu değişim amino asit farklılıklarına da sebep olmaktadır. Referans genomda **Treonin** amino asiti mevcutken, yanıt veren hastalarda **Prolin** amino asiti, yanıt vermeyen ve nüks eden hastalarda ağırlıklı olarak **Valin** amino asitine değişim gözlenmiştir. Ayrıca 2 farklı hastada (MA, KK) **Serin** amino asitine dönüşüm söz konusudur (Şekil 5.3.). **Dolayısıyla bu pozisyondaki nükleotitler doğrudan veya dolaylı olarak tedaviye verilen yanıtı etkileme yeteneğine sahip olabileceği öngörülmektedir.**

Büyük delta antijen geni üzerinde bulunan 202 nolu bölgesi (767, 768, 769. nükleotitler), HDAg'nin çok korunmuş C-terminal ucunda bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, bu noktada meydana gelen değişikliklerin HDV genomunun coğrafik orijinini belirmekte önemli olduğu ve bu noktanın epidemiyolojik çalışmalarda HDV suşlarının coğrafik dağılımlarını belirlemede kullanılabileceği belirtilmiştir (101). Dolayısıyla 202 noktasındaki nükleotid dizisi HDV'nin farklı coğrafyalarda bulunan farklı subtipleriyle ilgili bilgi verebilmektedir. Viral enfeksiyonların tedavisinde genotip farklılıklarının tedaviye verilen yanıt üzerinde etkili olabildiği göz önüne alındığında, bu çalışmadaki örneklerde tespit edilen 202 noktasındaki varyasyonlar da incelenmiştir.

C-terminal bölgesi nükleotid dizisi açısından korunmuş bir bölge olmasına rağmen, 202 nolu pozisyonunun 769. nükleotidinde, çalışılan 40 örnekten sadece 7 adedinde GCC kodonu gözlenmektedir ve kalan numunelerin TCC olarak referans ile homolog olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.7.). Bu çalışmada antisens bir referans dizi esas alındığından, 202 nolu nükleotid ve ilgili kodon ters komplement olarak gösterilmiştir. Dolayısıyla bu lokasyonda T bazı bulunduğu zaman TCC kodonu **Serin** amino asidini kodlar ancak bu baz G olduğunda, GCC kodonu **Alanin** amino asidini kodlamaktadır. Amino asit değişimi tedavinin ilerleyişi açısından önemli olsa da ortaya çıkan tabloya bakıldığında, tedaviye verilen yanıtın bu nükleotit ile ilişkili olduğunu gösteren bir seyir veya benzerlik tespit edilememiştir.

RİBOZİM BÖLGESİNDE MEYDANA GELEN TNP'LERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hepatit Delta virüsünün replikasyonuna aracılık eden ribozim bölgesi, genomun 1138. ile 1226. nükleotitler arasını kapsar. Çalışmamızda 3 farklı hasta profilindeki tüm genom incelemeleri, yüksek derecede korunmuş bu bölgede olası önemli nükleotit farklılıkları gerçekleştiğini göstermektedir. Gerçekleşen bu farklılıklarda aminoasit değişimlerine sebep olan farklılıklarda mevcuttur (Ör:1140. 1153. ve 1155. nükleotitler). Bu bölgede gerçekleşen her bir değişimin, tedavinin gidişatını da etkileyeceği muhtemeldir fakat kesin sonuca ulaşabilmek için daha çok hastada daha kapsamlı çalışmalara gerek duyulmaktadır.

6.2. SONUÇ

Bu çalışmada, HDV ile enfekte 13 farklı genotip 1 hastasında, interferon tedavisine verilen yanıt farklılıklarının viral genomdaki değişikliklerle ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır. **266, 268, 269, 319, 749, 927, 928** ve **426-429** bölgesinde tedaviye yanıt veren, nüks eden ve yanıt vermeyen hasta grupları arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Özellikle 927. ve 928.

nükleotitlerde gerçekleşen değişimlerin yanıt veren hastalarla, nüks eden-yanıt vermeyen hastalar kıyaslandığında farklı aminoasitler sentezlemesine yol açması tedavi yanıtına etkiyi daha da arttırmaktadır. Bu konuda daha fazla hasta sayısıyla yapılacak daha geniş çaplı çalışmalar, HDV viral varyantlarıyla tedaviye yanıt arasındaki ilişkinin aydınlatılmasında önemli rol oynayacaktır. HDV'ye ait hücre kültür sistemlerinin geliştirilmesiyle tespit edilen viral varyantların öneminin *in vitro* olarak gösterilmesi de HDV tedavisinde geliştirilebilecek yeni antiviral ajanların ilaç duyarlılık testlerinin hızlı, etkili ve güvenilir bir şekilde yapılmasına imkân sağlayacaktır. Ayrıca çok büyük çapta güvenilir veri sağlayan yeni nesil dizi analizi teknolojilerinin bu bu çalışmalara aracılık etmesi, bu konuda yapılan testlerdeki duyarlılığı oldukça artıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. Gut. 1977;18(12):997-1003.

2. Rizzetto M, Canese M, Gerin J, London W, Sly D, Purcell R. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. Journal of Infectious Diseases. 1980;141(5):590-602.

3. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih J, Purcell RH, Gerin JL. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1980;77(10):6124-8.

4. Perez-Vargas J, Amirache F, Boson B, Mialon C, Freitas N, Sureau C, et al. Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. Nature communications. 2019;10(1):1-15.

5. Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anaïs P, Drugan T, et al. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. Journal of virology. 2004;78(5):2537-44.

6. Farci P. Delta hepatitis: an update. Journal of hepatology. 2003;39(1):212-9.

7. Huang C-R, Lo SJ. Evolution and diversity of the human hepatitis d virus genome. Advances in Bioinformatics. 2010;2010.

8. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1980;77(10):6124-8. Epub 1980/10/01. PubMed PMID: 6934539; PubMed Central PMCID: PMC350226.

9. Cross TJ, Rizzi P, Horner M, Jolly A, Hussain MJ, Smith HM, et al. The increasing prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in South London. Journal of medical virology. 2008;80(2):277-82.

10. Le Gal F, Gault E, Ripault M-P, Serpaggi J, Trinchet J-C, Gordien E, et al. Eighth major clade for hepatitis delta virus. Emerging infectious diseases. 2006;12(9):1447.

11. Bozdayı A, Aslan N, Bozdayı G, Türkyılmaz A, Sengezer T, Wend U, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. Archives of virology. 2004;149(11):2115-29.

12. Pascarella S, Negro F. Hepatitis D virus: an update. Liver International. 2011;31(1):7-21.

13. Değertekin H, Yalcin K, Yakut M. The prevalence of hepatitis delta virus infection in acute and chronic liver diseases in Turkey: an analysis of clinical studies. The Turkish journal

of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology. 2006;17(1):25-34.

14. Gaeta GB, Stroffolini T, Smedile A, Niro G, Mele A. Hepatitis delta in Europe: vanishing or refreshing? Hepatology. 2007;46(4):1312-3.

15. Wedemeyer H, Heidrich B, Manns MP. Hepatitis D virus infection—not a vanishing disease in Europe! Hepatology. 2007;45(5):1331-2.

16. Le Gal F, Castelneau C, Gault E, Al Hawajri N, Marcellin P, Deny P. Hepatitis D virus infection-Not a vanishing disease in Europe! Reply. Hepatology. 2007;45(5):1332-3.

17. Deny P. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? Hepatitis Delta Virus: Springer; 2006. p. 151-71.

18. Casey JL, Brown TL, Colan EJ, Wignall FS, Gerin JL. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993;90(19):9016-20. Epub 1993/10/01. PubMed PMID: 8415646; PubMed Central PMCID: PMCPMC47492.

19. Chen R, Linnstaedt SD, Casey JL. RNA editing and its control in hepatitis delta virus replication. Viruses. 2010;2(1):131-46.

20. Chen P-J, Kalpana G, Goldberg J, Mason W, Werner B, Gerin J, et al. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1986;83(22):8774-8.

21. Sharmeen L, Kuo M, Dinter-Gottlieb G, Taylor J. Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage. Journal of virology. 1988;62(8):2674-9.

22. Ferré-D'Amaré AR, Zhou K, Doudna JA. Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. Nature. 1998;395(6702):567-74.

23. Hsieh S, Chao M, Coates L, Taylor J. Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. Journal of virology. 1990;64(7):3192-8.

24. Nie X, Chang J, Taylor JM. Alternative processing of hepatitis delta virus antigenomic RNA transcripts. Journal of virology. 2004;78(9):4517-24.

25. Beeharry Y, Pelchat M. Subversion of RNA Processing Pathways by the Hepatitis delta Virus. 2011. doi: 10.5772/21332.

26. Abrahem A, Pelchat M. Formation of an RNA polymerase II preinitiation complex on an RNA promoter derived from the hepatitis delta virus RNA genome. Nucleic acids research. 2008;36(16):5201-11. doi: 10.1093/nar/gkn501. PubMed PMID: 18682525; PubMed Central PMCID: PMC2532721.

27. Wong SK, Lazinski DW. Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002;99(23):15118-23.

28. Lo K, Hwang SB, Duncan R, Trousdale M, Lai MM. Characterization of mRNA for hepatitis delta antigen: exclusion of the full-length antigenomic RNA as an mRNA. Virology. 1998;250(1):94-105.

29. Dastgerdi ES, Herbers U, Tacke F. Molecular and clinical aspects of hepatitis D virus infections. World journal of virology. 2012;1(3):71.

30. Greco-Stewart V, Pelchat M. Interaction of host cellular proteins with components of the hepatitis delta virus. Viruses. 2010;2(1):189-212.

31. Sato S, Cornillez-Ty C, Lazinski DW. By inhibiting replication, the large hepatitis delta antigen can indirectly regulate amber/W editing and its own expression. Journal of virology. 2004;78(15):8120-34.

32. Tseng C-H, Lai M. Hepatitis delta virus RNA replication. Viruses. 2009;1(3):818-31.

33. Wang Y-C, Huang C-R, Chao M, Lo SJ. The C-terminal sequence of the large hepatitis delta antigen is variable but retains the ability to bind clathrin. Virology journal. 2009;6(1):31.

34. Schädler S, Hildt E. HBV life cycle: entry and morphogenesis. Viruses. 2009;1(2):185-209.

35. Casey JL, Tennant BC, Gerin JL. Genetic changes in hepatitis delta virus from acutely and chronically infected woodchucks. Journal of virology. 2006;80(13):6469-77.

36. Fiedler M, Roggendorf M. Immunology of HDV infection. Hepatitis Delta Virus: Springer; 2006. p. 187-209.

37. D'Ugo E, Canitano A, Catone S, Argentini C, Giuseppetti R, Orobello S, et al. Kinetics of WHV-HDV replication in acute fatal course of woodchuck hepatitis. Archives of virology. 2008;153(11):2069.

38. De Sousa BC, Cunha C. Development of mathematical models for the analysis of hepatitis delta virus viral dynamics. PloS one. 2010;5(9):e12512.

39. Casey J, Gerin J. The woodchuck model of HDV infection. Hepatitis Delta Virus: Springer; 2006. p. 211-25.

40. Niro GA, Smedile A. Current concept in the pathophysiology of hepatitis delta infection. Current infectious disease reports. 2012;14(1):9-14.

41. Lempp FA, Ni Y, Urban S. Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2016;13(10):580-9.

42. Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein–dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. Hepatology. 2007;46(6):1759-68.

43. Sureau C, Salisse J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. Hepatology. 2013;57(3):985-94.

44. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. elife. 2012;1:e00049.

45. Yurdaydin C, Idilman R. Therapy of delta hepatitis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015;5(10):a021543.

46. Yurdaydın C, Idilman R, Bozkaya H, Bozdayi A. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis. Journal of viral hepatitis. 2010;17(11):749-56.

47. Glenn JS, Watson JA, Havel CM, White JM. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. Science. 1992;256(5061):1331-3.

48. Smedile A, Verme G, Cargnel A, Dentico P, Opolon P, Vergani D, et al. Influence of delta infection on severity of hepatitis B. The Lancet. 1982;320(8305):945-7.

49. Smedile A, Dentico P, Zanetti A, Sagnelli E, Nordenfelt E, Actis GC, et al. Infection with the delta agent in chronic HBsAg carriers. Gastroenterology. 1981;81(6):992-7.

50. Rizzetto M. Hepatitis D: thirty years after. Journal of hepatology. 2009;50(5):1043-50.

51. Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2010;7(1):31.

52. Yurdaydın C, Bozkaya H, Önder F, Şentürk H, Karaaslan H, Akdoğan M, et al. Treatment of chronic delta hepatitis with lamivudine vs lamivudine+ interferon vs interferon. Journal of Viral Hepatitis. 2008;15(4):314-21.

53. Niro GA, Ciancio A, Gaeta GB, Smedile A, Marrone A, Olivero A, et al. Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta. Hepatology. 2006;44(3):713-20.

54. Wedemeyer H, Yurdaydìn C, Dalekos GN, Erhardt A, Çakaloğlu Y, Değertekin H, et al. Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta. New England Journal of Medicine. 2011;364(4):322-31.

55. Yurdaydın C, Bozkaya H, Karaaslan H, Önder F, Erkan Ö, Yalçın K, et al. A pilot study of 2 years of interferon treatment in patients with chronic delta hepatitis. Journal of viral hepatitis. 2007;14(11):812-6.

56. Wedemeyer H, Yurdaydin C, Ernst S, Caruntu F, Curescu M, Yalcin K, et al. O4 prolonged therapy of hepatitis delta for 96 weeks with pegylated-interferon-α-2a plus tenofovir or placebo does not prevent HDVRNA relapse after treatment: the hidit-2 study. Journal of Hepatology. 2014;60(1):S2-S3.

57. Yurdaydin C, editor Treatment of chronic delta hepatitis. Seminars in liver disease; 2012: Thieme Medical Publishers.

58. Guedj J, Rotman Y, Cotler SJ, Koh C, Schmid P, Albrecht J, et al. Understanding early serum hepatitis D virus and hepatitis B surface antigen kinetics during pegylated interferon-alpha therapy via mathematical modeling. Hepatology. 2014;60(6):1902-10.

59. www.vhsd.org. Interferon.

60. Soriano V, Sherman KE, Barreiro P. Hepatitis delta and HIV infection. Aids. 2017;31(7):875-84.

61. Koh C, Canini L, Dahari H, Zhao X, Uprichard SL, Haynes-Williams V, et al. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. The Lancet Infectious Diseases. 2015;15(10):1167-74.

62. Bogomolov P, Alexandrov A, Voronkova N, Macievich M, Kokina K, Petrachenkova M, et al. Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase Ib/IIa study. Journal of hepatology. 2016;65(3):490-8.

63. Bazinet M, Pantea V, Cebotarescu V, Cojuhari L, Jimbei P, Albrecht J, et al. Update on the safety and efficacy of REP 2139 monotherapy and subsequent combination therapy with pegylated interferon alpha-2a in Caucasian patients with chronic HBV/HDV co-infection. Journal of Hepatology. 2016;64(2):S584-S5.

64. Yurdaydin C. Recent advances in managing hepatitis D. F1000Research. 2017;6.

65. Keskin O, Tuzun A, Karakaya F, Kalkan C, Kartal A, Karatayli E, et al. Prolongation of interferon therapy increases maintained virological response rates and improves the natural course of chronic delta hepatitis: 2033. Hepatology. 2015;62.

66. Blanchet M, Sureau C. Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. Journal of virology. 2007;81(11):5841-9.

67. Blank A, Markert C, Hohmann N, Carls A, Mikus G, Lehr T, et al. First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B. Journal of hepatology. 2016;65(3):483-9.

68. Rainer PP, Primessnig U, Harenkamp S, Doleschal B, Wallner M, Fauler G, et al. Bile acids induce arrhythmias in human atrial myocardium—implications for altered serum bile acid composition in patients with atrial fibrillation. Heart. 2013;99(22):1685-92.

69. Glenn J. Prenylation of HDAg and antiviral drug development. Hepatitis Delta Virus: Springer; 2006. p. 133-49.

70. Bordier BB, Marion PL, Ohashi K, Kay MA, Greenberg HB, Casey JL, et al. A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. Journal of Virology. 2002;76(20):10465-72.

71. Bordier BB, Ohkanda J, Liu P, Lee S-Y, Salazar F, Marion PL, et al. In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. The Journal of clinical investigation. 2003;112(3):407-14.

72. Yurdaydin C, Idilman R, Choong I, Kalkan C, Keskin O, Karakaya M, et al. O118: Optimizing the prenylation inhibitor lonafarnib using ritonavir boosting in patients with chronic delta hepatitis. Journal of Hepatology. 2015;62:S252.

73. Yurdaydin C, Idilman R, Keskin O, Kalkan C, Karakaya M, Caliskan A, et al. A phase 2 dose-optimization study of lonafarnib with ritonavir for the treatment of chronic delta hepatitis—end of treatment results from the LOWR HDV-2 study. J Hepatol. 2017;66(1 Supplement):S33-S4.

74. Noordeen F, Vaillant A, Jilbert AR. Nucleic acid polymers inhibit duck hepatitis B virus infection in vitro. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013;57(11):5291-8.

75. Noordeen F, Vaillant A, Jilbert AR. Nucleic acid polymers prevent the establishment of duck hepatitis B virus infection in vivo. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013;57(11):5299-306.

76. Al-Mahtab M, Bazinet M, Vaillant A. Safety and efficacy of nucleic acid polymers in monotherapy and combined with immunotherapy in treatment-naive Bangladeshi patients with HBeAg+ chronic hepatitis B infection. PloS one. 2016;11(6):e0156667.

77. Mancini-Bourgine M, Fontaine H, Scott-Algara D, Pol S, Bréchot C, Michel ML. Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. Hepatology. 2004;40(4):874-82.

78. Fontaine H, Kahi S, Chazallon C, Bourgine M, Varaut A, Buffet C, et al. Anti-HBV DNA vaccination does not prevent relapse after discontinuation of analogues in the treatment of chronic hepatitis B: a randomised trial—ANRS HB02 VAC-ADN. Gut. 2015;64(1):139-47.

79. Mizrahi M, Lalazar G, Ya'acov AB, Livovsky DM, Horowitz Y, Zolotarov L, et al. β-Glycoglycosphingolipid-induced augmentation of the anti-HBV immune response is associated with altered CD8 and NKT lymphocyte distribution: a novel adjuvant for HBV vaccination. Vaccine. 2008;26(21):2589-95.

80. Zhang E, Lu M. Toll-like receptor (TLR)-mediated innate immune responses in the control of hepatitis B virus (HBV) infection. Medical microbiology and immunology. 2015;204(1):11-20.

81. Gane E, Gaggar A, Nguyen A, Subramanian G, McHutchison J, Schwabe C, et al. A phase1 study evaluating anti-PD-1 treatment with or without GS-4774 in HBeAg negative chronic hepatitis B patients. Journal of Hepatology. 2017;66(1):S26-S7.

82. Liu J, Zhang E, Ma Z, Wu W, Kosinska A, Zhang X, et al. Enhancing virus-specific immunity in vivo by combining therapeutic vaccination and PD-L1 blockade in chronic hepadnaviral infection. PLoS Pathog. 2014;10(1):e1003856.

83. Yuen M-F, Chan H, Given B, Hamilton J, Schluep T, Lewis D, et al. Phase II, dose ranging study of ARC-520, a siR-NA-based therapeutic, in patients with chronic hepatitis B virus infection: LB-21. Hepatology. 2014;60(6).

84. Yuen M-F, Liu K, Chan H, Given B, Schluep T, Hamilton J, et al. Prolonged RNA interference therapy with ARC-520 Injection in treatment naïve, HBeAg positive and negative patients with chronic HBV results in significant reductions of HBs antigen. Journal of Hepatology. 2017;66(1):S27.

85. Ninomiya M, Ueno Y, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Kondo Y, et al. Use of illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants. Journal of clinical microbiology. 2012;50(3):857-66.

86. McNaughton AL, Roberts HE, Bonsall D, de Cesare M, Mokaya J, Lumley SF, et al. Illumina and Nanopore methods for whole genome sequencing of hepatitis B virus (HBV). Scientific reports. 2019;9(1):1-14.

87. Mechelli R, Manzari C, Policano C, Annese A, Picardi E, Umeton R, et al. Epstein-Barr virus genetic variants are associated with multiple sclerosis. Neurology. 2015;84(13):1362-8.

88. Hetzel U, Szirovicza L, Smura T, Prähauser B, Vapalahti O, Kipar A, et al. Identification of a novel deltavirus in Boa Constrictors. MBio. 2019;10(2):e00014-19.

89. Beeharry Y, Rocheleau L, Pelchat M. Conserved features of an RNA promoter for RNA polymerase II determined from sequence heterogeneity of a hepatitis delta virus population. Virology. 2014;450:165-73.

90. Sopena S, Godoy C, Tabernero D, Homs M, Gregori J, Riveiro-Barciela M, et al. Quantitative characterization of hepatitis delta virus genome edition by next-generation sequencing. Virus research. 2018;243:52-9.

91. Godoy C, Tabernero D, Sopena S, Gregori J, Cortese MF, González C, et al. Characterization of hepatitis B virus X gene quasispecies complexity in mono-infection and hepatitis delta virus superinfection. World journal of gastroenterology. 2019;25(13):1566.

92. Celik I, Karatayli E, Cevik E, Kabakci SG, Karatayli SC, Dinc B, et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of hepatitis delta viruses isolated from nine Turkish patients. Arch Virol. 2011;156(12):2215-20. Epub 2011/10/11. doi: 10.1007/s00705-011-1120-y. PubMed PMID: 21984217.

93. Karataylı E, Altunoğlu YÇ, Karataylı SC, Alagöz SGK, Çınar K, Yalçın K, et al. A one step real time PCR method for the quantification of hepatitis delta virus RNA using an external armored RNA standard and intrinsic internal control. Journal of clinical virology. 2014;60(1):11-5.

94. Chudy M, Hanschmann K-M, Bozdayi M, Kreß J, Nübling M, Standardization WECoB, et al. Collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis D virus RNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. World Health Organization, 2013.

95. Chen PJ, Kalpana G, Goldberg J, Mason W, Werner B, Gerin J, et al. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1986;83(22):8774-8. PubMed PMID: 2430299; PubMed Central PMCID: PMCPMC387014.

96. Wu HN, Lai MM. Reversible cleavage and ligation of hepatitis delta virus RNA. Science. 1989;243(4891):652-4. PubMed PMID: 2492677.

97. Quer J, Rodríguez-Frias F, Gregori J, Tabernero D, Soria ME, García-Cehic D, et al. Deep sequencing in the management of hepatitis virus infections. Virus research. 2017;239:115-25.

98. Tabernero D, Cortese MF, Buti M, Rodriguez-Frias F. HDV evolution—will viral resistance be an issue in HDV infection? Current opinion in virology. 2018;32:100-7.

99. Lee CM, Changchien CS, Chung JC, Liaw YF. Characterization of a new genotype II hepatitis delta virus from Taiwan. J Med Virol. 1996;49(2):145-54. doi: 10.1002/(SICI)1096-9071(199606)49:2<145::AID-JMV12>3.0.CO;2-D. PubMed PMID: 8991938.

100. Macnaughton TB, Wang YJ, Lai MM. Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage sites. J Virol. 1993;67(4):2228-34. Epub 1993/04/01. PubMed PMID: 8445730; PubMed Central PMCID: PMCPmc240348.

101. Le Gal F, Badur S, Hawajri NA, Akyuz F, Kaymakoglu S, Brichler S, et al. Current hepatitis delta virus type 1 (HDV1) infections in central and eastern Turkey indicate a wide genetic diversity that is probably linked to different HDV1 origins. Arch Virol. 2012;157(4):647-59. doi: 10.1007/s00705-011-1212-8. PubMed PMID: 22241621.

EKLER

EK1: Tüm genom dizilerinin işaretleme rehberi

Tüm genomu elde edilen örnekler GenBank: HQ005370.1 (92) HDV RNA tüm genomunu referans alınarak align edilip, align edilen dizilerin nokta mutasyonları, delesyonları, insersiyonları nükleotidin yüzdesi işaretlenmiştir. Ayrıca Ribozim, S-HDAg ve L-HDAg genlerin konumu, otokatalitik kırılma bölgeleri ve hiper-değişgen bölgesi belirlenmiştir (Şekil 4.1.). Polimorfizmler ile ilgili işaretleme rehberi aşağıda gösterilmiştir.

%100 A	ADENİN	% 50 A/%50 G	A / G HETEROZİGOT
%100 T	TİMİN	% 50 A/%50 T	A / T HETEROZİGOT
%100 G	GUANİN	% 50 A/%50 C	A / C HETEROZİGOT
%100 C	SİTOZİN	% 50 C/%50 G	C / G HETEROZİGOT
%100 DEL	DELESYON	% 50 C/%50 T	C / T HETEROZİGOT
%100 INS	İNSERSİYON	% 50 T/%50 G	T / G HETEROZİGOT
–	HOMOLOG	***	EKSİK OKUMALAR

Tüm genom dizilerinin işaretleme rehberi

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ayşe Nur MİDİLLİ

Doğum Yeri: İkizce

Doğum Tarihi: 21.02.1996

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca (başlangıç seviyesinde)

Eğitim Durumu

Lise: Samsun Canik İMKB Anadolu Lisesi (2009-2013)

Lisans: Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik (2013-2017)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji (2017-devam ediyor)

Yayınlar ve Bildiriler

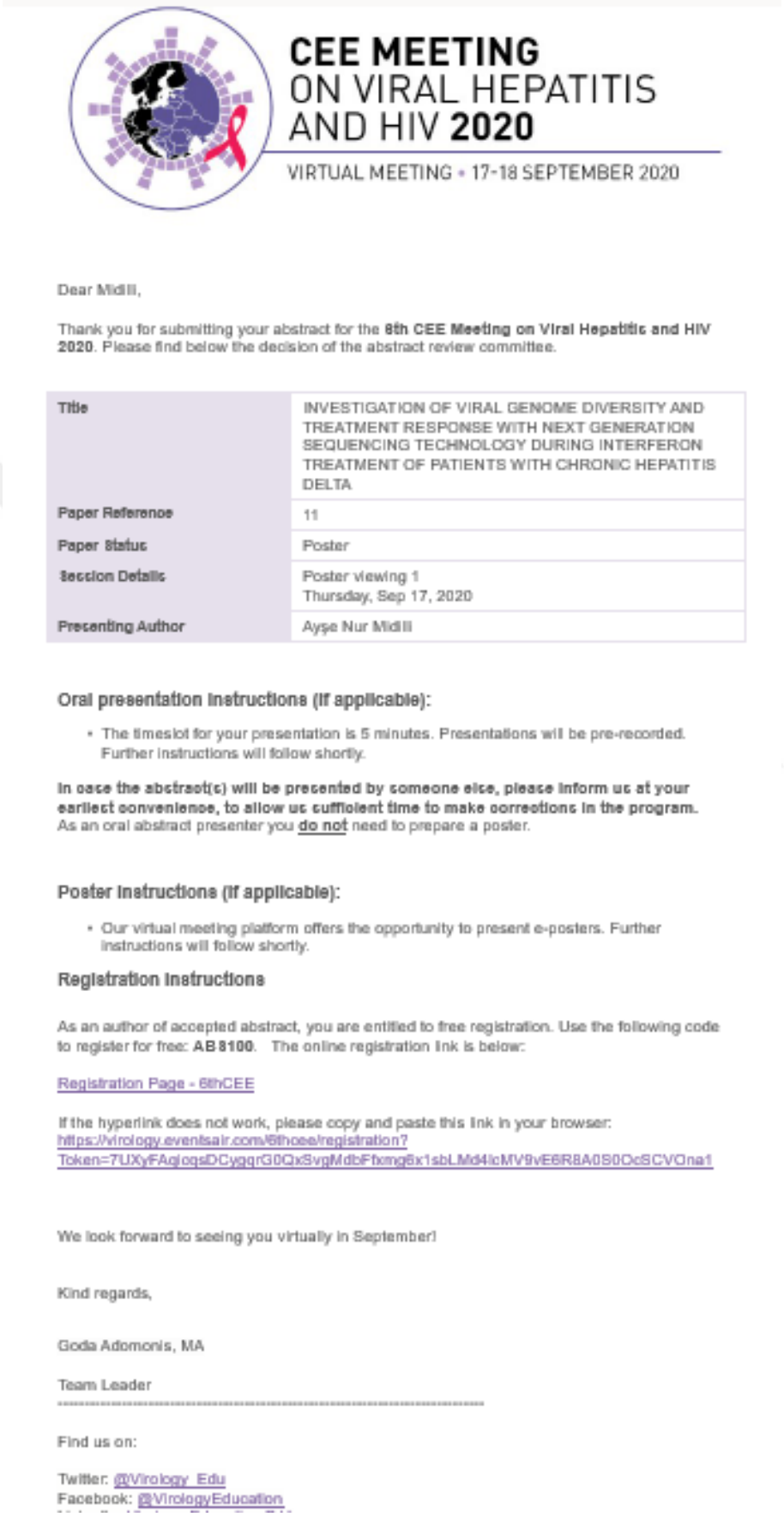
Necdet Mehmet ÜNEL*, Rahmi ÇETİNKAYA, Ayşe Nur MİDİLLİ, Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU, Mehmet Cengiz BALOGLU, "Identificationand Analysis of Hsp60 Genes in Melon", International Conference on Agriculture, Forest, Food, Sciences and Technologies Cappadocia , (ICAFOF) , Nevşehir/ Turkey, 15-17 May 2017.

İş Tecrübesi

Kurumu: Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB)-Aziz Sancar Araştırma Merkezi

Görevi: Proje Personeli **Yılları:** 2020- devam ediyor

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR



CEE MEETING ON VIRAL HEPATITIS AND HIV 2020

VIRTUAL MEETING • 17-18 SEPTEMBER 2020

Dear Midili,

Thank you for submitting your abstract for the **8th CEE Meeting on Viral Hepatitis and HIV 2020**. Please find below the decision of the abstract review committee.

Title	INVESTIGATION OF VIRAL GENOME DIVERSITY AND TREATMENT RESPONSE WITH NEXT GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGY DURING INTERFERON TREATMENT OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS DELTA
Paper Reference	11
Paper Status	Poster
Session Details	Poster viewing 1 Thursday, Sep 17, 2020
Presenting Author	Ayşe Nur Midili

Oral presentation instructions (if applicable):

- The timeslot for your presentation is 5 minutes. Presentations will be pre-recorded. Further instructions will follow shortly.

In case the abstract(s) will be presented by someone else, please inform us at your earliest convenience, to allow us sufficient time to make corrections in the program.
As an oral abstract presenter you **do not** need to prepare a poster.

Poster instructions (if applicable):

- Our virtual meeting platform offers the opportunity to present e-posters. Further instructions will follow shortly.

Registration instructions

As an author of accepted abstract, you are entitled to free registration. Use the following code to register for free: **AB8100**. The online registration link is below:

Registration Page - 8thCEE

If the hyperlink does not work, please copy and paste this link in your browser:
https://virology.eventsair.com/8thcee/registration?Token=7UXyFAqIoqsDCyggrG0QxSvgMdbFhxmg8x1sbLMd4icMV9vE6R8A0S0OcSCVCna1

We look forward to seeing you virtually in September!

Kind regards,

Goda Adomonis, MA

Team Leader

Find us on:

Twitter: @Virology_Edu
Facebook: @VirologyEducation