

Kronik HBV infeksiyonu olan hastalarda pre-core/core promoter mutasyonları ve HBe antijen durumu ile ilişkileri

Relationship between mutations in the pre-core/core promoter region and HBe antigen status in patients with chronic HBV infection

Dr. Hakan BOZKAYA¹, Dr. Mithat BOZDAYI¹, Dr. Özden UZUNALIMOĞLU¹, Dr. Hülya ÇETİNKAYA¹, Dr. Cihan YURDAYDIN¹, Dr. Selim KARAYALÇIN¹, Dr. Anna SF Lok²

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji¹ Bilim Dalı, Ankara, Michigan Üniversitesi² Gastroenteroloji ve Hepatoloji Departmanı, Ann Arbor, US.

ÖZET: Hepatit B virus pre-core ve core promoter mutasyonlarının HBeAg negatif fenotiple ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Bu mutasyonların prevalansı bir coğrafi bölgeden diğerine değişir. Bu çalışmanın amacı da kronik hepatit B virus infeksiyonu olan Türk hastalarda pre-core ve core promoter mutasyonlarının prevalansını araştırmak ve bu mutasyonları hepatit B e antijen durumu ile ilişkilendirmektir. Yirmi bir hastadan elde edilen serumda polimeraz zincir reaksiyonu ve direkt dizi analizi ile pre-core ve core promoter bölgeleri incelendi. Yirmi bir hastanın tümünde 1858. nükleotidde T mevcuttu. Pre-core stop kodon mutasyonu (A 1896), 11 hepatit B e antijen pozitif hastanın 8'inde (%18), 10 hepatit B e antijen negatif hastanın 8'inde (%80) saptandı. Birinci T-A zengin bölgedeki değişiklikler (%40 hepatit B e antijen negatif hastada 1753. nükleotidde T'den C'ye ve %30 hepatit B antijen pozitif hastada 1752. nükleotidde A'dan C'ye) dışında hepatit B e antijen pozitif ve negatif hastalar arasında core promoter mutasyonlarının gerek sıklık gerek ortaya çıkma paterni açısından bir fark saptayamadık. Yalnızca bir hastada T 1762 ve A 1764'ün birlikteliği söz konusu idi. Sonuç olarak kronik hepatit B'li Türk hastalarda hepatit B e antijen negatif fenotip, pre-core mutasyonları ile ilişkili iken core promoter mutasyonları ile benzer bir ilişki şüpheli görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: **Hepatit B, mutasyon, core promoter**

HEPATİTİS B e antijeni (HBeAg), hepatit B virusun (HBV) pre-core/core bölgesinin translasyon ürününün proteolitik yıkımı ile oluşur (1,2). Çeşitli çalışmalar, HBeAg üretimini engelleyen pre-core mutasyonlarının HBV infeksiyonu seyri sırasında HBe antijen-antikor serokonversiyonu boyunca ortaya çıktığını göstermiştir (3-8). Bunlar içinde en sık görülen 28. kodonda stop kodon oluşumuna yol açan 1896 no.lu nükleotiddeki Guanin (G)'den

SUMMARY: Mutations in the hepatitis B virus pre-core and core promoter regions have been reported to be associated with hepatitis B e antigen negative phenotype. The prevalence of these mutations vary in different geographical areas. The aim of this study was to determine the prevalence of mutations in the hepatitis B virus pre-core and core promoter regions in Turkish patients with chronic hepatitis B and to correlate presence of these mutations with the hepatitis B e antigen status. Sera from 21 Turkish patients with chronic hepatitis B were analyzed by polymerase chain reaction amplifications and direct sequencing of the pre-core and core promoter regions. All the 21 patients had T at nucleotide 1858. The pre-core stop codon mutation (A 1896) was detected in 2 (18%) of 11 hepatitis B e antigen positive and 8 (80%) of 10 hepatitis B e antigen negative patients. Apart from changes involving the first T-A reach region (T-C at nucleotide 1753 in 40% hepatitis B e antigen negative and A-C at nucleotide 1752 in 30% hepatitis B e antigen positive patients), we found no difference in frequency or pattern of changes in the core promoter region between the hepatitis B e antigen positive and hepatitis B e antigen negative patients. Only one patient had co-occurrence of T 1762 and A 1764. In conclusion, hepatitis B e antigen negative phenotype in Turkish patients with chronic hepatitis B is associated with mutations in the pre-core but probably not in the core promoter region.

Key Words: **Hepatit B, mutations, core promoter**

Adenin (A)'ya değişimdir. Bu mutasyon, 1858 no.lu nükleotidde Timin (T) içeren HBV genotipleri ile infekte HBeAg negatif hastalarda sıklıkla bulunur. Bununla beraber 1858 no.lu nükleotidde sitozin (C) olan genotiplerle infekte hastalarda rastlanmaz (9-11). Bunun nedeni "pregenome encapsidation signal" olarak adlandırılan viral paketlenmede çok önemli dizideki uygun baz çiftleşmesini sürdürmek içindir. Böylece, HBeAg negatif hastalarda pre-core stop kodon mutasyon (A 1896) sıklığı belli bir coğrafi bölgedeki dominant HBV

genotipine göre jeografik bölgeden bölgeye değişiklik gösterir.

Yeni olarak Japonya'dan bildirilen iki çalışmada HBV core promoter (CP) mutasyonları HBeAg negatif hastalarda pozitif olanlara kıyasla daha sık bulunmuştur (12,13). Longitudinal çalışmalar bu mutasyonların HBeAg-HBe antikoru (anti-HBe) serokonversiyonu sırasında ortaya çıktığını göstermiştir. Bazı hastalarda bu mutasyonların A 1896 pre-core mutasyonu olmadan görülmesi, CP mutasyonlarının yalnız başına HBeAg negatif fenotipten sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. CP bölgesi, transkripsiyondan sorumlu "basic core promoter" (nükleotid 1742-1849) ve bu bölgeyi sırasıyla pozitif ve negatif olarak kontrol eden "core upstream regulatory sequence" (nükleotid 1643-1742) ve "negative regulatory element" (nükleotid 1611-1634) dizilerini içerir (14,15). Basic core promoter, dört T-A zengin bölgeye sahiptir. En sık görülen mutasyonlar ikinci T-A zengin bölgedeki (nükleotid 1758-1762, TTAAA) 1762. nükleotidde A'dan T'ye ve 1764. nükleotiddeki G'den A'ya olan değişikliklerdir. Bu mutasyonlar pre-core RNA'nın transkripsiyonunu azaltarak/yok ederek HBeAg üretimini düşürebilirler.

Amerikan hastalar üzerinde yapılan yeni bir çalışmada CP ve pre-core mutasyonlarının sık olmadığı ve T1762/A1764 mutasyonlarının fulminant hepatit ve HBeAg fenotiple açık bir ilişkisinin gözlenmediği bildirilmiştir (16). Bu nedenle HBV CP mutasyonlarının sıklığı ve klinik önemleri hala anlaşılmış değildir.

Bu çalışmanın amacı da kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda pre-core ve CP mutasyonlarının sıklığını araştırmak ve bu bulguları hastaların HBeAg durumları ile ilişkilendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar: Kronik HBV enfeksiyonu olan 29 hasta çalışıldı. Bunlardan 21 hastanın serumunda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonrası HBV DNA pozitif olarak saptandı. Yirmi bir hastanın 12'si erkek, 9'u kadın, yaşları 5-65 arasında (ortalama 32.6) değişiyordu. Onbir (%52) hasta HBeAg pozitif, 10 (%48) hasta HBeAg negatif idi (Tablo 1). Kronik hepatit ve siroz tanıları tüm hastalarda karaciğer biyopsisi yapılarak kondu (Tablo 1). Hiçbir hastaya serum örnekleri çalışılmadan önce interferon tedavisi verilmemişti. Tüm hastalarda anti-HCV ve anti-HDV antikorları negatif idi ve hiçbir hastada günde 10 gramdan fazla alkol kullanımı öyküsü yoktu.

Hepatit serolojisi: Hepatit B yüzey antijen (HBsAg), HBeAg, anti-HBe, anti-HCV ve anti-HDV enzim immunoassay (Abbott Laboratuvarları, N. Chicago, IL.) ile test edildi.

DNA ekstraksiyonu: 100 µl serum, final konsantrasyon olarak 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaEDTA, %0.5 SDS, ve 0.5 mg/ml proteinaz K içeren 400 µl tampon ile karıştırıldıktan sonra 50°C'de 2 saat inkübe edildi. Örnekler fenol-kloroform ile 2 kez ekstrakte edildikten sonra 0.3 M sodyum asetat ve etanol ile presipite edildi. Nükleik asit pelletleri 50 µl 1 mM Tris-HCl pH 8.0 ve 0.1 mM Na EDTA içinde yeniden çözüldü.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR): Pre-core/core geni ve CP bölgesini içeren X geni ayrı ayrı reaksiyonlarda farklı primer çiftleri ile çoğaltıldı. Her iki PCR'da da birinci PCR, 1-5 µl DNA ekstresi ile ve toplam 50 µl reaksiyon karışımı (son konsantrasyonlar 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mmol/L MgCl₂, her bir deoksinnükleotid trifosfatdan 0.25 µmol/L, 2.5 U Taq polimeraz-Perkin Elmer, Norwalk, CT. - ve her bir eksternal primerden 15 pmol olmak üzere) kullanılarak yapıldı. Reaksiyon 40 siklus olarak, 94°C'de 1 dakika, 51°C'de (pre-core/core primerleri için) ve 55°C'de (X primerleri için) 1 dakika ve 72°C'de 2 dakika (son siklusda 72°C'de 10 dakika) olarak gerçekleştirildi.

İkinci PCR için 5 ml birinci PCR ürünü, birinci PCR ile aynı kompozisyondaki 45 ml reaksiyon karışımına eklendi. İkinci PCR'ın birinciden yegane farkı internal primerlerin 30 pmol konsantrasyonunda kullanılmaları idi. Dört ml ikinci PCR ürünü, etidyum bromid ile boyanan %1.5 agaroz jelde analiz edildi ve ultraviyole altında görüntülendi. Kros-kontaminasyonu önlemek için Kwok ve Higuchi tarafından önerilen tüm önlemler alındı (17) ve her ölçüme negatif kontrol eklendi.

Pre-core/core geni için eksternal primerler P1 (5'-GAGGAGTTGGGGGAGGAGATT-3', pozisyon 1734-1754) ve P2 (5'-GTAGAAGAATAAGCCC-3', pozisyon 1503-2478), internal primerler P3 (5'-TAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGT-3', pozisyon 1774-1798) ve P4 (5'-ATACTAACATTGACATCCC-3', pozisyon 2455-2436); X geni için eksternal primerler X1 (5'-GCATGCGTGGAACCTTT-3', pozisyon 1232-1248) ve X2 (5'-ATAGCTTGCTGAGTGC-3', pozisyon 1266-1283) ve X4 (5'-CTTTATACGGGTCAATGTC-3', pozisyon 1922-1904) idi.

Direkt dizi analizi: Taq polimerazın oluşturabi-

Tablo 1. HBeAg negatif ve HBeAg pozitif hastaların karaciğer histolojileri, pre-core dizi analizleri ve X primerleri ile alınan sonuçlar.

Hastalar	Cinsiyet	Yaş (Yıl)	Histoloji	Pre-core dizisi			X gen CR
				1858	1896	1899	
HBeAg+							
1	E	42	KH	T	G	GA	+
2	E	20	KH	T	GA	G	+
3	E	26	KH	T	G	G	+
4	K	12	KH	T	G	G	+
5	E	19	KH	T	G	G	+
6	E	10	KH	T	G	G	+
7	K	26	KH	T	G	G	+
8	E	18	KH	T	G	G	+
9	K	15	KH	T	G	G	+
10	E	5	KH	T	G	G	+
11	K	35	KH	T	GA	GA	multipl bandlar
HBeAg-							
1	K	42	KH	T	A	A	+
2	K	65	KH	T	A	G	+
3	K	29	KH	T	A	G	+
4	E	40	KH	T	A	G	+
5	E	57	KH	T	G	G	+
6	E	52	KH+S	T	A	G	-
7	E	45	KH	T	A	G	-
8	E	32	KH	T	A	G	-
9	E	36	KH	T	G	G	-
10	E	52	KH	T	A	G	multipl bandlar

E: erkek, K: kadın, KH: kronik hepatit, S: siroz

leceği hatalardan kaçınmak için her bir serum örneğine iki ayrı PCR uygulandı. Herbir PCR ile çoğaltılan HBV DNA, QIAquick-spin PCR purifikasyon kiti (Qiagen Inc., Chatsworth, CA.) ile purifiye edildi ve daha sonra anti-sense primer P5 (5'-GGAAAGAAGTCAGAAGGCAA-3', pozisyon 1974-1955) ve X4 primerleri ile pre-core ve CP bölgele-
rinin direkt dizi analizleri için kullanıldı. Dideoksi-
nükleotid zincir sonlanması ile dizi analizi, Se-
quenase kiti (version 2.0, US Biochemical, Cleve-
land, OH.) ile gerçekleştirildi. Reaksiyon %6 poli-
akrilamid üre jelde yürütüldü ve otoradyografi-
70°C de 3 günde elde edildi.

SONUÇLAR

Gen bankası ve daha önce yayımlanmış HBV dizi-
leri ile kıyaslanınca, HBVAYWC bizim hastaları-
mızın nükleotid dizisine en yakın olan HBV dizisi
idi. HBVAYWC ile kıyaslanınca ortaya çıkan fark-
lılıklar mutasyon olarak değerlendirildi.

Pre-core: Yirmi bir hastanın tümünde 1858 no.lu
nükleotidde, A 1896 stop kodon mutasyonunun
oluşumuna izin veren T mevcuttu. On bir HBeAg
pozitif hastanın 2'sinde (%18) 28. kodonda wild tip

(WT) ve mutant tipin karışımı (1896. nükleotidde
G ve A'nın herikisinin varlığını gösteren çift band)
mevcutken, kalan 9 (%82) hastada yalnızca WT iz-
lendi. On HBeAg negatif hastanın 8'inde (%80)
stop kodon mutasyonu (A 1896) gözlenirken, 2
(%20) hastada WT mevcuttu. Üç hastadan pre-co-
re bölgesinde sık görülebilen bir diğer mutasyon
olan 1889 no. lu nükleotidde G'den A'ya (kodon
29'da glisin-aspartat) değişim mevcuttu. Bu has-
taların 2'sinde aynı zamanda A 1896 mutasyonu
vardı. Hiçbir hastada başlangıç kodonu, kodon 15
ve pre-core geninin diğer kısımlarında mutasyon
gözlenmedi.

Core promoter: Pre-core primerleri ile PCR son-
rası tek band elde edilen yirmi bir serum örneği-
nin yalnızca 15'inde (%71) X primerleri ile tek
band elde edildi. Bu 15 hastanın 10'u HBeAg poziti-
f, 5'i HBeAg negatifti (Tablo 1). Değişik primer
çiftlerini (hemi-nested X primerleri ve P5) kulla-
narak tekrarlanan PCR'lara rağmen geri kalan 6
hastanın 4'ünde (hepsi HBeAg negatif) PCR nega-
tif iken, diğer 2 hastada ise (biri HBeAg pozitif di-
ğeri HBeAg negatif) agaroz jel elektroforezinde
multipl bandlar vardı.

1. T-A zengin bölge (ATTA, 1752-1755) Bu bölge-

deki değişikliklerin prevalansı HBeAg negatif (%40) ve HBeAg pozitif (%30) hastalarda aynı olmakla beraber, bu iki hasta grubunda farklı nükleotidlerde ortaya çıkan değişiklikler X geninin aynı kodonunda (kodon 127) farklı amino asit mutasyonlarına yol açtı. Üç HBeAg pozitif hastanın tümünde 1752 no.lu nükleotidde A'dan C'ye değişiklik (kodon 127, izolösün-lösün) gözlenirken iki HBeAg negatif hastada 1753 no.lu nükleotidde T'den C'ye değişim (kodon 127, izolösün-treonin) mevcuttu.

2. T-A zengin bölge (TTAAA, 1758-1762) Yalnızca bir hastada (HBeAg negatif) 1762. nükleotidde A'dan T'ye ve 1764. nükleotidde G'den A'ya değişimin birlikteliği görüldü. Bir HBeAg pozitif hastada ise T 1762 tek başına mevcuttu. 1762. nükleotiddeki değişiklik 130. kodonda lizin-metyonin mutasyonuna yol açarken, 1764. nükleotiddeki değişiklik 131. kodonda valin-izolösün mutasyonuna neden olur. Bir diğer HBeAg negatif hastada ise 130. kodonda lizin-glutamin mutasyonuna yol açan 1761 A-C değişikliği söz konusuydu.

3. T-A zengin bölge (TATTA, 1771-1775) Bu bölgede görülen yegane değişiklik 1773. nükleotiddeki T'den C'ye gizli değişimdir (134. kodonda lösün-lösün). Bu değişiklik HBeAg pozitif 4 (%40) hastada, HBeAg negatif 2 (%40) hastada izlendi.

4. T-A zengin bölge (ATAAATT, 1789-1795) Hiçbir hastada bu bölgede değişiklik gözlenmedi.

T-A zengin bölgeler dışında, CP'un diğer bölgelerinde 2 farklı mutasyon daha gözlemlendi: 1768. nükleotidde T'den A'ya (132. kodonda fenilalanin-tirozin) ve 1820. nükleotidde C'den T'ye (149. kodonda asparagin-lösün) değişimleri (Figür 1).

TARTIŞMA

Bu çalışmada HBeAg negatif çoğu hastada (%80) pre-core stop kodon mutasyonu (A 1896) olduğunu bulduk. Bu mutasyonun yüksek oranda görülmesi, Türkiye'de dominant HBV genotipinin 1858 no.lu nükleotidde T içermesi ile ilgilidir. T 1858, 1896 no.lu nükleotidde G-A mutasyonuna izin verir. Bu çalışmada HBeAg pozitif hastaların %18'inde pre-core stop kodon mutasyonu WT ile karışım halinde bulunmuştur. Bu son bulgu sürpriz değildir; çünkü diğer araştırmacılar da daha sonra anti-HBe'ye serokonversiyon gösteren HBeAg pozitif hastalarda A 1896 mutasyonunu saptamışlardır (5-8). İki hastada A 1896 mutasyonuna eşlik eden diğer bir mutasyon mevcuttu: 1899 no.lu nükleotidde G'den A'ya değişim. Bu mutasyonun stop

kodon mutasyonu ile birlikte olabildiği ve "pregenom encapsidation signal"ın stabilitesini daha da artırabileceği bildirilmiştir. Bir HBeAg pozitif hastada da stop kodon mutasyonu olmaksızın 1899 no.lu nükleotidde G ve A'nın karışımı saptanmıştır. Önceki çalışmalarda da izole A 1899'un olabileceği gösterilmiştir; bu mutasyon "pregenom encapsidation signal" de yeni bir baz çiftleşmesi sağlayarak stabiliteyi artırabilir ancak HBeAg üretimi üzerine herhangi bir etkisi olmayabilir (9).

Çalışmamızda, Laskus ve arkadaşlarının sonuçlarına paralel (16), ancak Japon araştırmacılar (12,13) zıt olarak CP bölgesindeki mutasyonların özellikle 1762'deki A-T ve 1764'de G-A değişikliklerinin sık olmadığını bulduk. Tüm hastalar içinde yalnızca HBeAg negatif olan bir hastada T 1762 ve A 1764'ün birlikteliği saptandı. T 1762 ve A 1764'ün birlikteliği, Gen bankasındaki HBV dizilerinin %22'sinde bulunabilmektedir. Bu nedenle, HBeAg negatif fenotiple ilişkili gerçek bir mutasyon olmaktan ziyade bir varyantı temsil edebilir. Bu mutasyonların pre-core RNA transkripsiyonunu etkileyip etkilemediğini ortaya koymak için in vitro çalışmalara gereksinim vardır.

Birinci T-A zengin bölge bir tarafa bırakılırsa, core promoter bölgesindeki değişikliklerin gerek sıklığı gerekse doğasında HBeAg negatif ve pozitif hastalar arasında herhangi bir fark bulamadık. Birinci T-A zengin bölgede 1753 no.lu nükleotidde T'den C'ye değişim yalnızca HBeAg negatif hastalarda saptanırken, 1752. no.lu nükleotidde A'dan C'ye değişim yalnızca HBeAg pozitif hastalarda bulundu. Birinci T-A zengin bölgede 1753-4. nükleotidlerdeki TT yerine GG'ye değişimin pre-core veya pregenomik RNA transkripsiyonunun başlaması ve transkripsiyon düzeyine herhangi bir etkisi olmadığı in vitro çalışmalarla gösterilmekle beraber (15) bizim bulduğumuz değişikliklerin transkripsiyon üzerine etkisi in vitro olarak henüz sınırlanmamıştır. 1752 ve 1753. nükleotidlerdeki değişikliklerin HBeAg durumu ve pre-core RNA transkripsiyon aktivitesi ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak için in vitro çalışmalara gerek vardır.

Bu çalışmada core promoter bölgesinde en sık rastlanan değişiklik 1773. nükleotidde (3. T-A zengin bölge) T'den C'ye değişimdir. Üçüncü T-A zengin bölgedeki mutasyonların pre-core RNA düzeyini azalttığı bildirilmekle beraber söz konusu mutasyonlar 1773-4. nükleotidleri TT'den GG'ye değiştirilerek gerçekleştirilmiştir (15). Bu nedenle 1773'deki izole değişiklikler (T-C), pre-core transkripsiyonu üzerinde etkisiz olabilir. Bu, C1773'ün

Figür 1. *HBeAg* negatif ve *HBeAg* pozitif hastaların core promoter dizileri. T-A zengin bölgelerin dizileri ve X stop kodunu kodlayan nükleotidlerin altı çizilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Bruss V, Gerlich WH. Formation of transmembrane hepatitis B virus e antigen by cotranslation in vitro processing of the viral precore protein. *Virology* 1988; 163:268-275.
2. Ou JH, Lamb O, Rutter WJ. Hepatitis B virus gene function: The precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:1578-1582.
3. Carman WF, Hadziyannis S, McGarvey MJ, et al. Mutation preventing formation of Hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2:588-599.
4. Brunetto MR, Stemler M, Schodel F, et al. Identification of HBV variants which cannot produce precore derived HBeAg and may be responsible for severe hepatitis Ital J Gastroenterol 1989; 21:151-154.
5. Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, et al. Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 1990; 64:1298-1303.
6. Hamasaki K, Nakata K, Nagayama Y, et al. Changes in the prevalence of HBeAg-negative mutant hepatitis B virus during the course of chronic Hepatitis B. *Hepatology* 1994; 20:8-14.
7. Takeda K, Akahane Y, Suzuki H, et al. Defects in the precore region of the HBV Genoma in patients with chronic Hepatitis B after sustained seroconversion from HBeAg to anti-HBe induced spontaneously or with interferon therapy. *Hepatology* 1990; 12:1284-1289.
8. Lok ASF, Akarca US, and Greene S. Predictive Value of precore Hepatitis B virus mutations in spontaneous and interferon-induced Hepatitis B e antigen clearance. *Hepatology* 1995; 21:19-24.
9. Lok ASF, Akarca U, and Greene S. Mutations in the pre-core region of Hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4077-4081.
10. Li J, Tong S, Wen Y, et al. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: Possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *Virology* 1993; 67:5402-5410.
11. Laskus T, Rakela J, and Persing D. The stem-loop structure of the cis-encapsidation signal is highly conserved in naturally occurring Hepatitis B virus variants. *Virology* 1994; 200:809-812.
12. Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, et al. Hepatitis B virus mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* 1994; 68:8102-8110.
13. Sato S, Suzuki K, Akahane Y, et al. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann Intern Med* 1995; 122:241-248.
14. Yuh CH, Chang YL, and Ting LP. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of Hepatitis B virus. *J Virol* 1992; 66:4073-4084.
15. Chen IH, Huang CJ, and Ting LP. Overlapping initiator and TATA box function in the basal core promoter of Hepatitis B virus. *J Virol* 1995; 69:3647-3657.
16. Laskus T, Rakela J, Nowicki MJ and Presing DH. Hepatitis B virus core promoter sequence analysis in fulminant and chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* 1995; 109:1618-1623.
17. Kwok S and Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339:237-238.
18. Feitelson MA, Duan LX, Guo J and Blumberg BS. X region deletion mutants associated with surface antigen-positive Hepatitis B virus infections. *Gastroenterology* 1995; 108:1810-1819.